Biblioteca Digital
F C E N - U B A

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

Tesis Doctoral

Un modelo integrado para el control motor del canto en canarios domésticos

Alonso, Rodrigo

2018-07-05

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:
Alonso, Rodrigo. (2018-07-05). Un modelo integrado para el control motor del canto en canarios domésticos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Alonso, Rodrigo. "Un modelo integrado para el control motor del canto en canarios domésticos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2018-07-05.

EXACTAS UBA
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

Un modelo integrado para el control motor del canto en canarios domésticos

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de física

Rodrigo Alonso

Director de tesis: Dr. Gabriel B. Mindlin.

Consejero de Estudios: Dra. Silvina Ponce Dawson.

Lugar de trabajo: Laboratorio de sistemas dinámicos, departamento de física.

Buenos Aires mayo 2018

A Tito, Gladys y Beatriz

Word Trees font by Fleckhaus & Weigert 2014

RESUMEN

Un modelo Integrado para el Control Motor del Canto en canarios domésticos

El trabajo descripto en esta tesis, se enfoca en el estudio de los mecanismos que subyacen al control motor del canto en canarios domésticos (*Serinus canaria*). Para ello, utilizamos técnicas propias de la dinámica no lineal en la construcción de modelos fenomenológicos del aparato vocal, así como del sustrato neuronal que acciona sobre la periferia. A su vez, el trabajo requirió del desarrollo e implementación de variadas técnicas experimentales, con el objetivo de contrastar empíricamente las predicciones de dichos modelos.

En una primera etapa, estudiamos el funcionamiento del aparato vocal, la *siringe*. Para ello, construimos un modelo biomecánico de baja dimensión de las fuentes sonoras. Este modelo predice que el control de la frecuencia fundamental de las vocalizaciones, emerge de la acción sinérgica entre dos variables fisiológicas: la presión de los sacos aéreos y la tensión labial. Luego, comprobamos esta predicción experimentalmente.

En segundo lugar, estudiamos el sustrato neuronal involucrado en este comportamiento. Con tal fin, construimos un modelo neuronal que representa la actividad promedio de los distintos núcleos involucrados en esta vía. Este modelo, reconcilia distintos resultados experimentales presentes en la literatura y consigue reproducir señales temporales compatibles con los gestos de presión adquiridos experimentalmente. Cabe destacar que el modelo plantea un escenario en el cual el control de las distintas escalas temporales del canto se produce por la acción conjunta de varios núcleos distribuidos en las distintas regiones del cerebro. Luego, implementamos una serie de técnicas electrofisiológicas mediante las que obtuvimos señales neuronales compatibles con las predicciones del modelo.

Finalmente, unimos ambas escalas del problema en un modelo integrador. Básicamente, el modelo extiende la arquitectura neuronal propuesta en el modelo anterior, incorporando los núcleos que controlan la musculatura siríngea. Como resultado del mismo, obtenemos señales temporales asociadas a gestos motores, las cuales alimentan al modelo biomecánico para sintetizar vocalizaciones realistas.

Palabras claves: neurociencia - canto de aves – dinámica no lineal – biomecánica - gestos motores – electrofisiología

ABSTRACT

An Integrated model for Motor Control of Song in domestic canaries

The work described in this thesis is based on the study of the mechanisms underlying motor control of song in domestic canaries (Serinus canaria). For this, we use techniques of non-linear dynamics in the construction of phenomenological models of the vocal apparatus, as well as the neuronal substrate that acts on the periphery. In turn, the work required the development and implementation of various experimental techniques, with the objective of empirically testing the predictions of these models.

In a first stage, we study the functioning of the vocal apparatus, the syrinx. To do this, we built a low-dimensional biomechanical model of the sound sources. This model predicts that the control of the fundamental frequency of vocalizations emerges from the synergistic action between two physiological variables: the air-sac pressure and the tension of the labia. Then, we probed this prediction experimentally.

Secondly, we studied the neuronal substrate involved in this behavior. To this end, we built a neuronal model that represents the average activity of the different nuclei involved in this pathway. This model reconciles different experimental results present in the literature and manages to reproduce temporal signals compatible with pressure gestures acquired experimentally. It is worth mentioning that the model proposes a scenario in which the control of the different time- scales of the song depends on the contribution of several nuclei distributed in the different regions of the brain. Next, we implemented a series of electrophysiological techniques through which we obtained neural signals compatible with the predictions of the model.

Finally, we unify both scales of the problem in an integrative model. The model extends the neuronal architecture proposed in the previous model, incorporating the nuclei that control the syrinx's musculature. Thus, we obtain temporary signals associated with motor gestures, which feed the biomechanical model to synthesize realistic vocalizations.

Keywords: neuroscience - birdsong - non-linear dynamics - biomechanics - motor gestures - electrophysiology

LISTA DE ABREVIATURAS

MTM (membrana timpaniforme media)

MM (membrana medial)

ML (membrana lateral)

LL (labio lateral)

LM (labio medal)

TL (músculo *traqueolateralis*)

ST (músculo *sternotraquealis*)

vS (músculo *siringealis ventralis*)

vTB (músculo *traqueolateralis ventralis*)

dTB (músculo *traqueolateralis dorsalis*)
dS (músculo *siringealis dorsalis*)

MAN (núcleo *Magnocelular del Nidopallium Anterior*)

DLM (núcleo *dorsolateral de la porción medial de Tálamo*)

RA (núcleo *Robusto del Arcopallium*)

HVC (utilizado como nombre propio)

Uva (núcleo *Uvaeforme*)

NIf (núcleo *Interfacial del Nidopalium*)

DM (*núcleo Dorsomedial*)
nXII (núcleo XII)

GTE (Extremo de la Trayectoria de Gestos motores)

BOS (Canto propio, del inglés Bird's Own Song)

CON (Canto de un conespecífico)
REV (Canto reverso)

IA (Área Iniciadora)

ER (área relacionada con la Expiración)

IR (área relacionada con la Inspiración)

Word Template by Hochbaum & Rieger 2014

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis es resultado de varios años de trabajo durante los cuales tuve la suerte de estar acompañado de mucha gente que quiero y admiro. Por eso, consciente de que la lista es demasiado larga, quiero agradecer particularmente a un grupo de personas que fueron muy importantes en esta etapa.

En primer lugar, quiero agradecerle a Gabo Mindlin, mi mentor y director, principal responsable de que haya logrado llegar hasta acá. Tuve la suerte de conocer a Gabo en los primeros años de la carrera y desde ese entonces compartir con él muchísimos momentos que, sin duda, marcaron el tipo de científico que soy y por el camino en el que quiero seguir desarrollándome en el futuro. En este sentido, quiero agradecerte por la generosidad de compartir esta ciencia sin barreras, dónde no importan tanto las disciplinas sino las preguntas científicas. Gracias por alentarme a perseguir mis propias inquietudes y darme la confianza que necesité para animarme a aprender las herramientas necesarias para responderlas. Gracias también por estar siempre dispuesto a prestarme tu oído y, café o mate de por medio, compartir conmigo tantas charlas que me han ayudado a crecer no sólo como científico sino también como persona. Fue un enorme placer trabajar con vos durante todos estos años.

En segundo lugar, quiero agradecer a todas/os mis compañeras/os del *Laboratorio de Sistemas Dinámicos*, del presente y del pasado, por compartir y construir un espacio en el que se trabaja con intensidad en un ambiente por demás amigable y generoso. De todos ellas/os he aprendido mucho y me llevo recuerdos hermosos. Quiero agradecerle en particular a Marcos, que desde mi primer día en el *Labo* estuvo siempre al pié del cañón para explicarme algo, tomar un mate o dar una palabra de aliento en los momentos difíciles. Gracias por tanto Abrazo, medalla y vincha. A Ani, por estar siempre dispuesta a dar una mano, por hacerte el tiempo para responder mis preguntas y por contagiar toda tu energía y vocación por hacer que las cosas funcionen. A Jorge, Zeke, Flor y Yoni, por transmitir el legado de hacer del *Labo* un lugar ameno y colaborativo. Espero haber cumplido mi labor de transmitirlo a los más jóvenes en mis tiempos de *senior*. A Ger y Santi, compañeros contemporáneos del doctorado, con quienes compartí muchas tardes/noches/mañanas en el *Labo* y con quienes construimos una muy linda amistad. Gracias por los cafecitos en la Noriega y el aguante durante estos años.

Quiero agradecer también a mi familia. A mis viejos, Silvia y Álvaro, por apoyarme siempre en todos los proyectos que encaro, por confiar en mí y ayudarme a transitar estos caminos con seguridad. A mis hermanas/o, Santi, Rochi y Belu, que quiero muchísimo, por ser incondicionales. A los mignons, que adoro. A mis tías, Patricia y Laura, por las charlas y los abrazos de oso. A mis abuelas, Gladys y Beatriz, que desde que tengo recuerdo estuvieron

World Trade Law Yearbook © Wolters 2014

siempre presentes acompañando. A mi abuelo Tito, a quien tuve la suerte de disfrutar hasta el último día.

A mis amigos y amigas, familia por elección, que siempre hacen más ameno el camino.

Quiero agradecerle especialmente a Luli. Gracias por bancar mis vaivenes, por apoyarme siempre, por impulsarme a seguir adelante y por sobre todas las cosas, por compartir conmigo cada día con mucho amor.

Por último, quiero agradecer a todo el Departamento de Física, que me recibió con los brazos abiertos. Al CONICET, por permitirme hacer el doctorado y a la Universidad de Buenos Aires, que me formó integralmente como científico.

Por todo esto y mucho más,

MUCHAS GRACIAS

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN 15
1.1 COMPORTAMIENTO MOTOR COMPLEJO 15
1.2 CANTO DE AVES Y LA NEUROETOLOGÍA 16
1.2.1 Ecología y comportamiento (¿Por qué cantan lo que cantan?) 16
1.3 APRENDIZAJE VOCAL: EVOLUCIÓN, SIMILITUDES Y ANALOGÍAS CON EL HABLA HUMANA 17
1.4 ANIMALES MODELO: DIAMANTE MANDARÍN & CANARIO DOMÉSTICO 19
1.5 OBJETIVOS DE ESTA TESIS: 22
2 PERIFERIA 23
2.1 BIOMECÁNICA DESCRIPTIVA 23
2.1.1 Mecanismos de fonación 23
2.1.2 De fuentes y tractos 24
2.1.3 Control motor y propiedades acústicas de las vocalizaciones 26
2.2 BIOMECÁNICA CUANTITATIVA 29
2.2.1 Modelos Dinámicos de Fonación 30
2.3 MODELO CON RESTITUCIÓN NO-LINEAL 34
2.3.1 Curvas de Isofrecuencia 36
2.4 PREDICCIONES Y OBSERVABLES 39
2.4.1 Rol de la Presión de los sacos aéreos en el control de la Frecuencia Fundamental 40
2.5 DATOS EXPERIMENTALES: *SIGNATURAS DE MODELO DINÁMICO SUBYACENTE* 44
2.6 CONSIDERACIONES FINALES 48
3 SISTEMA NERVIOSO 51
3.1 DESCRIPCIÓN ANATÓMICA 52
3.1.1 El circuito AFP 52
3.1.2 Vía Motora 53
3.1.3 Vía Auditiva 54
3.1.4 Un vínculo entre los Circuitos: Selectividad al canto propio 54
3.2 FISIOLOGÍA 55
3.2.1 Modelo del reloj 55
3.2.2 Evidencias y modelos alternativos 57
3.3 ¿CÓMO PODEMOS MODELAR LA ACTIVIDAD NEURONAL? 62
3.3.2 Modelos Aditivos de Redes Neuronales 63
3.4 UN MODELO CIRCULAR PARA EL CONTROL MOTOR DEL CANTO 68
3.4.1 Arquitectura neuronal 69
3.4.2 Resultados teóricos 72

Word Template by Hochbaum & Rüegsegger 2014

3.4.3 Experimentos de enfriamiento del núcleo HVC en canarios *76*
3.5 PREDICCIONES Y OBSERVABLES 78
3.5.1 Heterogeneidades en la actividad de HVC *79*
3.6 OBSERVACIONES PRELIMINARES DE ACTIVIDAD NEURONAL EN HVC 79
3.6.1 Actividad de varias neuronas (multi-unit) *81*
3.6.2 Actividad de neurona única (single-unit) *82*
3.6.3 Métodos para determinar la identidad de neuronas individuales en un registro electrofisiológico *84*
3.6.4 Resumen final e Interpretación de los registros de actividad neuronal *88*
3.7 CONSIDERACIONES FINALES 92
4 MODELO INTEGRADO 95
4.1 ARQUITECTURA NEURONAL 96
4.2 IMPLEMENTACIÓN MATEMÁTICA DEL MODELO NEURONAL 97
4.3 INTEGRANDO ACTIVIDAD NEURONAL Y BIOMECÁNICA 99
4.4 RESULTADOS 100
4.4.1 P0 ..... *101*
4.4.2 P2 ..... *104*
4.4.3 P1 ..... *106*
4.4.4 Pulsátil *108*
4.4.5 Instrucciones Bilaterales *110*
4.5 OBSERVACIONES EXPERIMENTALES: *SIMILITUD ENTRE GESTOS TEÓRICOS Y EXPERIMENTALES* 111
4.6 CONSIDERACIONES FINALES 115
5 CONCLUSIONES 119
6 REFERENCIAS 127
7 APÉNDICES 139
7.1 CUARENTENA Y CONTROL SANITARIO 140
7.2 PRESIÓN DE LOS SACOS AÉREOS 140
7.2.1 Procedimientos quirúrgicos *141*
7.2.2 Setup *142*
7.3 ACTIVIDAD ELECTROMIOGRÁFICA DEL MÚSCULO *SIRINGEALIS VENTRALIS* 145
7.3.1 Procedimientos quirúrgicos *145*
7.3.2 Setup *148*
7.4 ACTIVIDAD SINGLE-UNIT & MULTI-UNITS EN EL NÚCLEO HVC 151
7.4.1 Procedimientos quirúrgicos *152*
7.4.2 Setup *155*
7.5 ESTIMULACIÓN ANTIDRÓMICA 156
7.5.1 Procedimientos quirúrgicos *157*

7.5.2 Setup *159*
7.6 EXPERIMENTO DE COLISIÓN ANTIDRÓMICA 160
7.6.1 Setup *160*
7.7 SIMULACIONES NUMÉRICAS 165
7.7.1 Códigos P0 ..... *165*
7.7.2 Códigos P2 ..... *168*
7.7.3 Códigos P1 ..... *172*
7.7.4 Códigos PULSATIL *176*
7.8 PROGRAMAS DE ADQUISICIÓN DE MATLAB 180
7.8.1 Adquisición de Presión y actividad electromiográfica (EMG) *180*
7.8.2 Adquisición de actividad neuronal (tipo single-units) de HVC y RA *182*

Word Template by Hochbaum & Rieger 2014

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Comportamiento motor complejo

Todo comportamiento adaptativo depende de interacciones entre el sistema nervioso, la periferia y el ambiente (Chiel & Beer, 1997). No obstante, las investigaciones que buscan comprender los mecanismos que subyacen a un comportamiento motor suelen enfocarse en la actividad de neuronas únicas o, en el mejor de los casos, de circuitos neuronales.

Sin embargo, en el marco de la teoría de la evolución, no es posible separar los efectos de cada una de estas partes. De hecho, en los vertebrados existe una coevolución y también un codesarrollo del sistema nervioso y el aparato periférico. Esto genera tanto restricciones como ventajas para el sistema nervioso: por un lado, el sistema nervioso no puede comandar comportamientos que son físicamente imposibles de generar así como, por otro lado, las nolinealidades inherentes al sistema periférico pueden generar comportamientos complejos incluso al ser comandados por instrucciones simples (Chiel & Beer, 1997; Gardner, Cecchi, Magnasco, Laje, & Mindlin, 2001). A su vez, los mecanismos de retroalimentación propioceptiva al igual que de parte del ambiente en el cual el individuo está inmerso, son vitales para el desarrollo de cualquier comportamiento adaptativo (McCasland & Konishi, 1981; Nemeth et al., 2012; T. L. Williams, Bowtell, Carling, Sigvardt, & Curtin, 1995).

El canto de las aves, no escapa a estas generalidades; es un comportamiento motor, complejo, aprendido y evolutivamente relevante para muchas especies. En esta tesis, nos hemos propuesto abordar este comportamiento de manera integradora, teniendo en cuenta no sólo la actividad neuronal involucrada en la producción vocal sino también la biomecánica del aparato fonador.

1.2 Canto de aves y la neuroetología

Las aves son animales por demás interesantes; la complejidad de sus cantos, la destreza con la que vuelan, su colorido plumaje, el hecho de que muchas de ellas migren miles de kilómetros para reproducirse, son sólo algunas de las características que hacen que año tras año miles de observadores de aves se congreguen en distintas partes del mundo para simplemente contemplarlas. Sin embargo, desde la neuroetología, una de estas características ha sido particularmente estudiada: *el canto*.

Desde mediados del siglo pasado, con la creación de los *sonogramas*, el estudio del canto de las aves se ha establecido como una de las principales áreas de la etología (P Marler, 2004). Los sonogramas son una representación gráfica del sonido, en la cual se dibuja el contenido espectral del sonido en función del tiempo, con la intensidad de cada frecuencia denotada en escala de grises (Figura 1.A). Esta tecnología permitió cuantificar ciertas características acústicas del canto de distintos individuos, lo cual dio rigurosidad a algunas nociones que, hasta ese momento, formaban parte del "anecdotario" de los naturalistas, así como a tantas otras que fueron surgiendo a partir del uso de esta herramienta.

1.2.1 Ecología y comportamiento (¿Por qué cantan lo que cantan?)

En pocas palabras, el canto de las aves tiene principalmente dos funciones: por un lado, ejerce un rol importante en la *defensa del territorio* y, por otro lado, es un atributo vital a la hora de *atraer una pareja* y reproducirse (Collins, 2004).

En ambos casos, el canto debe reflejar algún aspecto de la calidad del *cantante* que aumente el éxito reproductivo del individuo, ya sea alejando a otros posibles contrincantes o atrayendo hembras. Los individuos dentro de una especie difieren en los tipos de cantos, y los posibles rivales y potenciales parejas prestan atención a esas diferencias y actúan en consecuencia.

La variación de ciertas características acústicas de los cantos entre los individuos se relaciona con las diferencias en agresividad, calidad del macho y los recursos disponibles. Por ejemplo, machos más grandes pueden producir sonidos de frecuencia más baja debido a que tienen un aparato vocal más grande, mientras que un macho más pequeño simplemente no puede "hacer trampa" produciendo vocalizaciones de frecuencias más bajas (Collins, 2004).

Al usar el canto para juzgar a los rivales y posibles pretendientes, las aves evitan las peleas que perderían y obtienen mejores parejas (P. Marler & Slabbekoorn, 2004). Ejemplo de esto, es el caso de las llamadas *sílabas sexys* en canarios domésticos (*Serinus canaria*). En esta especie, las hembras muestran una marcada preferencia por machos que cantan una serie de trinos que cubren un amplio rango de frecuencias sonoras y son producidos a gran velocidad. Estas *sílabas sexys* requieren de una gran destreza en la coordinación motora por lo que se considera que son

una señal honesta de calidad del macho, motivo por el cual se habría seleccionado esa preferencia en las hembras (Vallet, Kreutzer, Beme, & Kiosseva, 1997).

Cabe destacar, que lo mencionado hasta aquí se refiere a los cantos (o canciones) los cuales se distinguen de otras vocalizaciones, denominadas "llamadas" (o *calls*). En general este tipo de vocalizaciones se observa tanto en hembras como en machos. En la Figura 1.A se muestra el repertorio completo de un pinzón vulgar (*Fringilla coelebs*). A nivel estructural, los cantos son usualmente más largos y más complejos acústicamente, involucrando una variedad de diferentes notas y sílabas ordenadas en secuencias que se repiten estadísticamente; por otro lado, las *llamadas* son a menudo cortas, monosilábicas y con patrones de frecuencia simples. Desde un punto de vista funcional, el significado de las *llamadas* no solo se restringe al cortejo o la contienda con otros machos, sino también alarmar de la existencia de un depredador, el anuncio y el intercambio de alimentos y el mantenimiento de la proximidad social e integración (Peter Marler, 2004b).

Finalmente, existe una distinción de gran importancia para la neuroetología; en las aves oscinas (orden *passeriformes*) el *canto* es aprendido mientras que la mayoría de las *llamadas* son innatas (Peter Marler, 2004a).

1.3 Aprendizaje vocal: evolución, similitudes y analogías con el habla humana

El aprendizaje vocal, es un atributo por demás excepcional en el reino animal. Si bien muchos animales producen vocalizaciones complejas, sólo unas pocas especies adquieren estas vocalizaciones tras un período de aprendizaje (Doupe & Kuhl, 1999).

Los humanos son claramente grandes aprendices vocales. No obstante, dentro de los primates no humanos, si bien hay evidencia emergente de que los factores sociales pueden influir en la variabilidad acústica (Crockford, Herbinger, Vigilant, & Boesch, 2004; Sugiura, 1998), no se ha demostrado que aprendan sus vocalizaciones. Entre los mamíferos, es bien sabido que los cetáceos adquieren su repertorio vocal y muestran una mímica vocal (McCowan & Reiss, 1997); también hay algunos murciélagos que aprenden sus vocalizaciones (Boughman, 1998), lo cual también ocurre en algunas especies de elefantes (Poole, Tyack, Stoeger-Horwath, & Watwood, 2005). En contrapartida, el aprendizaje vocal ha evolucionado en tres grupos de aves: las aves oscinas (orden Passeriformes), loros (Psittaciformes) y colibríes (Apodiformes) (Liu, Wada, Jarvis, & Nottebohm, 2013).

Las aves oscinas representan aproximadamente el 50% de las aves existentes en la actualidad (≅5739 especies). Se encuentran distribuidas en todos los continentes, ocupan casi todos los ecosistemas terrestres y representan la mayor radiación evolutiva identificable dentro de las

aves (Barker, Cibois, Schikler, Feinstein, & Cracraft, 2004). Por este motivo, las aves oscinas se han establecido como principal modelo animal para el estudio del aprendizaje vocal.

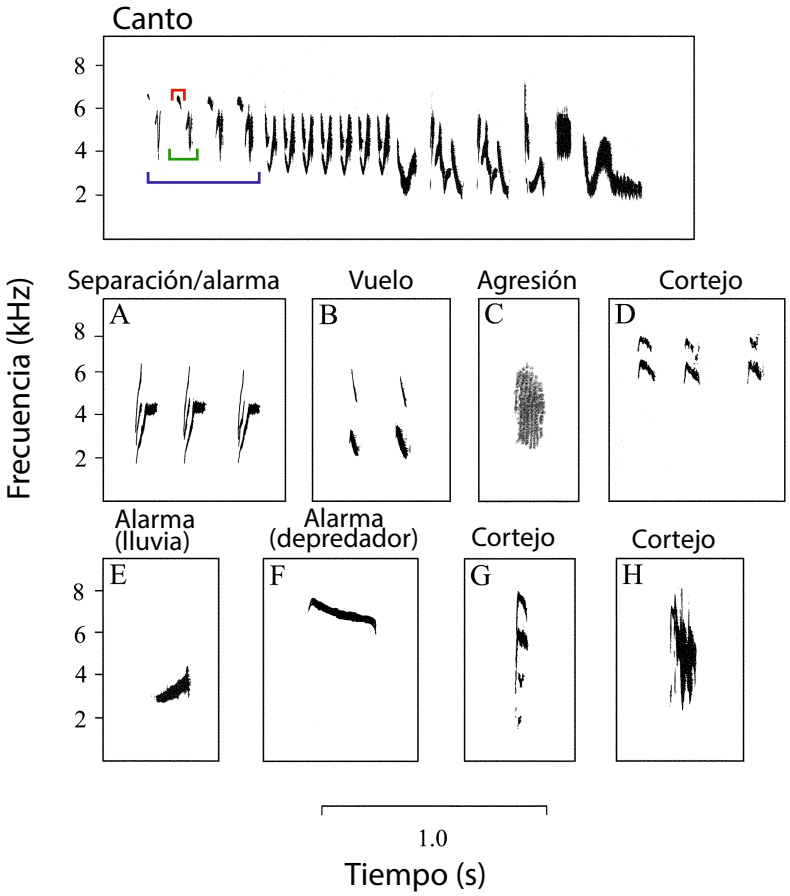


Figura 1.A. Canto y repertorio de *llamadas* del pinzón vulgar (*Fringilla coelebs*). (Panel Superior) Canto del pinzón vulgar, compuesto por una serie de *frases* formadas por *sílabas* distintas: el corchete rojo señala una *nota* que forma parte de una *sílaba* compleja (corchete verde), luego una serie de sílabas forman una *frase* (corchete azul). (Paneles A-H) Repertorio de *llamadas* del pinzón vulgar. En la parte superior de cada recuerdo se muestra el "significado" de cada llamada. Adaptado de Peter Marler, 2004b.

Existen numerosos paralelismos entre la adquisición del habla humana y el canto en las aves. En primer lugar, la fenomenología básica del aprendizaje del canto o del habla es sorprendentemente similar en aves oscinas y humanos. Las vocalizaciones iniciales son inmaduras y diferentes de las de adultos. Las primeras vocalizaciones en bebés son típicamente vocales, seguidas de *balbuceos*: sílabas compuestas por consonantes y vocales que repiten varias veces (por ejemplo: bababa o mamama). Por su parte, las aves oscinas jóvenes producen lo que se conoce como *subcanto* (subsong) en los cuales los juveniles producen una serie desordenada de notas que se diferencian de las sílabas adultas. Luego progresivamente estas vocalizaciones se van moldeando hasta parecerse a las sílabas adultas (*canto plastico*), y finalmente cristalizan un canto estereotipado (*canto cristalizado*).

Otra característica notoria es que, en ambos casos, existe un periodo *sensorial* en la cual los juveniles deben estar expuestos a las vocalizaciones de tutores: tanto en humanos como en aves con audición normal, si durante este período están socialmente aislados producen vocalizaciones anormales (Fromkin et al., 1974; Kroodsma & Miller, 1996). En esta etapa, los individuos "memorizan" una especie de templado de las vocalizaciones adultas. Luego de transcurrido este período, los juveniles comienzan a vocalizar intentando imitar aquellos sonidos a los que fueron expuestos. Este período se conoce como *sensorimotor* (Doupe & Kuhl, 1999). Durante esta fase del aprendizaje es crucial que los individuos puedan escucharse y así moldear sus vocalizaciones de manera que se asemejen a las del tutor (Konishi, 1965; Oller & Eilers, 1988). La separación entre las distintas etapas es muy marcada en las aves, mientras que en el caso de los humanos los períodos se superponen. En éstos últimos, hay una distinción entre percepción y producción de habla universal y las etapas en las cuales los niños presentan selectividad a vocalizaciones del idioma específico de sus tutores.

A su vez, tanto las aves oscinas como los humanos poseen estructuras neuronales específicas asociadas al aprendizaje y al control de las vocalizaciones. En este sentido, si bien existen similitudes entre el rol de las distintas estructuras, dada la gran distancia evolutiva entre los humanos y las aves, éstas sólo pueden considerarse como estructuras análogas.

En resumen, podemos destacar que existen similitudes en cómo la experiencia sensorial se internaliza y se utiliza para moldear las vocalizaciones, lo cual sucede durante un período crítico del desarrollo. Debido a esto, y considerando las analogías funcionales de las estructuras neuronales en humanos y oscinos, se ha propuesto que los mecanismos neuronales involucrados en el aprendizaje pueden ser similares (Doupe & Kuhl, 1999). En la Figura 1.B, se ilustran algunos de los paralelismos en relación al aprendizaje vocal, mencionados en esta sección.

1.4 Animales modelo: Diamante mandarín & Canario doméstico

De todas las especies de oscinos, los canarios (*Serinus canaria*) y los diamantes mandarines (*Taeniopygia guttata*) han sido las más utilizadas para el estudio del aprendizaje y la producción vocal.

Ambas especies son también consideradas mascotas, por lo que son fácilmente criadas y mantenidas en cautiverio. En términos del aprendizaje vocal, las dos especies presentan diferencias; Por ejemplo, los diamantes mandarines aprenden un solo canto, el cual reproducen sin variar a lo largo de su vida. Los canarios, por su parte, aprenden distintos cantos en distintas temporadas reproductivas, por lo que son considerados "open learners" (o de aprendizaje extendido). A su vez, las vocalizaciones de ambas especies difieren considerablemente. Como se puede ver en la Figura 1.C, el canto de los diamantes mandarines se compone de distintas sílabas que conforman motivos los cuales repiten un cierto número de veces (2-4 veces). En

cambio, el canto de los canarios está compuesto por una serie de frases distintas. Cada frase está conformada por sílabas del mismo tipo, que repiten varias veces (de 3 a 30 veces).

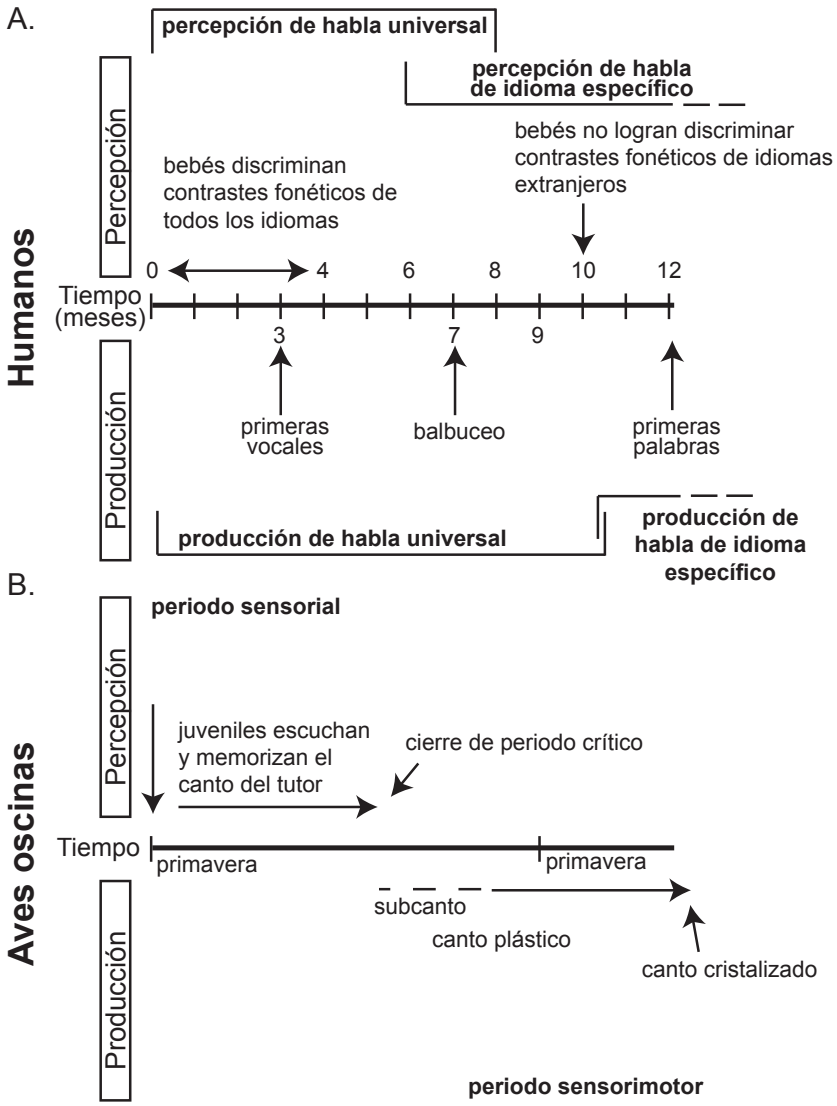


Figura 1.B: Similitudes en el aprendizaje vocal entre aves oscinas y humanos. (A.) Durante el primer año de vida, la percepción del bebé y la producción de sonidos del habla pasan por cambios marcados. (A, arriba) Hitos del desarrollo asociados con escuchar el habla (Percepción); (A, abajo) el tipo de sonidos producidos durante el primer año de un bebé, que conducen a la producción de palabras. En ambos aspectos del desarrollo, los bebés cambian de lenguaje general en los primeros meses a específicos del idioma hacia el final del primer año. (B) Líneas de tiempo similares muestran el aprendizaje *sensorial* temprano de las aves oscinas, seguido por el aprendizaje *sensoriomotor* en el otoño y especialmente la próxima primavera. Adaptado de Doupe & Kuhl, 1999.

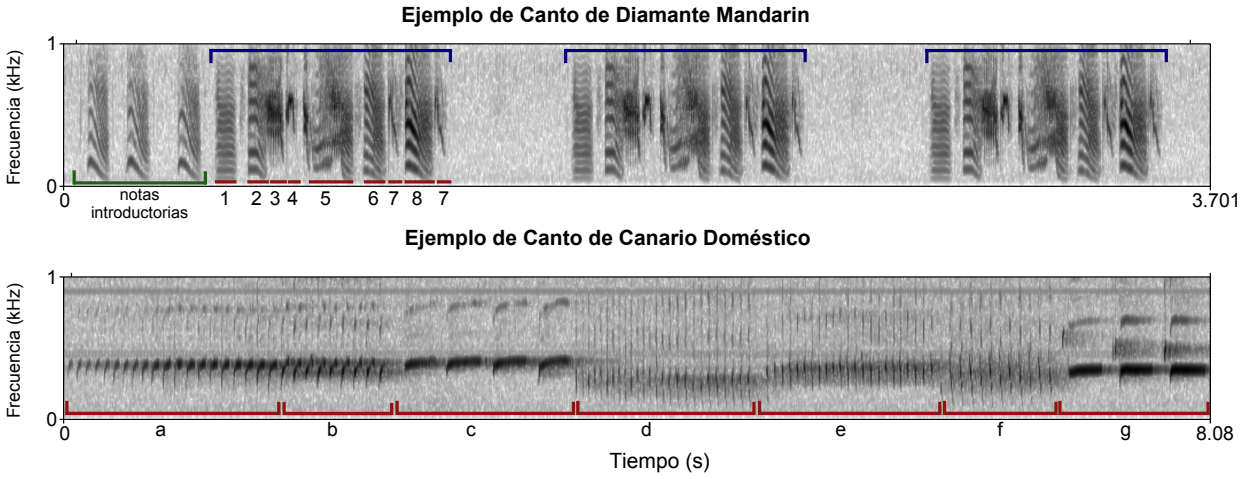


Figura 1.C. Ejemplos de canto de Diamante mandarín y del Canario Doméstico. (Panel superior) Sonograma del canto del Diamante Mandarín. Típicamente el canto comienza con una serie de notas introductorias (corchete verde), seguidas de una serie de sílabas distintas (1-8) ordenadas formando motivos (corchetes azules) que repite varias veces. Las sílabas difieren en contenido espectral, en su mayoría tienen alto contenido espectral (sílabas 1,2,3,5,6 y 8) teniendo algunas más bien tonales (sílaba 4 y 7). (Panel superior) El canto de los canarios se caracteriza por tener distintas frases compuestas de la misma sílaba repetida un cierto número de veces (a-g, corchetes rojos).

Cada especie posee características particulares que la hacen más o menos adecuada a la hora de abordar una pregunta científica (Yartsev, 2017). En efecto, en el campo de la neuroetología hay un principio central denominado principio de Krogh, que dice lo siguiente: *"Para una gran cantidad de problemas, habrá algún animal de elección o algunos de esos animales en los que éstos puedan estudiarse más cómodamente"* (Krogh, 1929). En otras palabras, la elección del modelo de estudio debe ser pregunta-dependiente.

Ahora bien, como resultado del aprendizaje vocal el ave ha de haber consolidado una serie de comandos neuronales que actúan sobre la periferia para producir los gestos motores adecuados y así realizar el canto correcto. Lógicamente, si queremos comprender cuales son los mecanismos asociados al aprendizaje, necesitaremos comprender en primera instancia cuáles son estos gestos motores, cómo estos actúan sobre el aparato fonador, cómo son los patrones neuronales asociados a estos gestos, etc. Es decir, entender los mecanismos que subyacen al control motor de las vocalizaciones.

En este sentido, el canto de los canarios presenta una clara ventaja por sobre el de los diamantes mandarines; esta es la repetición de sílabas. Para poder repetir una misma sílaba los canarios ejecutan un programa motor que requiere de la repetición de gestos motores, lo cual a su vez depende de la reiteración de los patrones neuronales que dirigen la ejecución del comportamiento. Estos patrones estereotipados tanto a nivel periférico, como a nivel central,

facilitan el estudio del sistema motor en su conjunto. Debido a esto, hemos elegido como modelo animal de estudio al canario doméstico.

1.5 Objetivos de esta tesis:

En esta tesis, nos centramos en el estudio de los mecanismos neurofisiológicos que subyacen a la producción vocal en canarios domésticos (*Serinus canaria*). Para ello, abordamos el problema tanto de forma teórica como experimental; a nivel central y a nivel periférico.

Comenzamos estudiando el aparato fonador y los mecanismos biofísicos que rigen su dinámica. Esto requirió de la construcción de un modelo dinámico de las fuentes de sonido y, a su vez, del desarrollo e implementación de distintas técnicas experimentales para medir algunas de las variables fisiológicas del modelo y así testear algunas predicciones del mismo.

Luego, nos dedicamos al estudio del sustrato neuronal involucrado en el control de las vocalizaciones. En primer lugar, estudiamos esta escala del problema de forma teórica, construyendo un modelo fenomenológico cuyas variables son la actividad media de distintos núcleos de la arquitectura neuronal involucrada en la producción vocal. Este modelo consigue reproducir señales temporales compatibles con gestos motores y tiene predicciones concretas sobre los patrones de actividad neuronal asociados al control motor. Luego, implementamos técnicas de electrofisiología para adquirir la actividad neuronal de algunos de los núcleos involucrados en el control motor y así contrastar empíricamente las predicciones del modelo.

Finalmente, unimos ambas escalas en un modelo integrador, donde la actividad neuronal actúa sobre los músculos efectores del comportamiento y como resultado se consigue generar canto sintético realista.

2 PERIFERIA

2.1 Biomecánica Descriptiva

En esta sección haré un breve repaso del funcionamiento del aparato vocal de las aves oscinas, introduciendo distintos conceptos que luego serán necesarios para avanzar hacia una descripción cuantitativa.

2.1.1 Mecanismos de fonación

Una pieza fundamental en la descripción de la biomecánica involucrada en la producción vocal, consistió en el descubrimiento de los mecanismos por los cuales se produce el sonido en las aves. Si bien en este momento hay consenso en la comunidad científica acerca de este proceso, no siempre ha sido el caso (Casey & Gaunt, 1985; F Goller & Larsen, 1997)(Casey & Gaunt, 1985; Elemans et al., 2015; F Goller & Larsen, 1997).

En un principio, el modelo "clásico", suponía que el sonido se produce cuando se establece una vibración cíclica en la membrana timpaniforme media (MTM), debido a la acción de dos fuerzas opuestas: fuerzas de Bernoulli originadas por el flujo de aire, y fuerzas elásticas de restitución de la membrana misma (Greenewalt, 1968). Este mecanismo se asemeja a la generación de sonidos voceados en humanos (Gabriel B. Mindlin & Laje, 2005).

Por otro lado, uno de los modelos alternativos propuestos, postulaba que la física subyacente a las vocalizaciones es análoga a la generación de sonidos en una flauta (Casey & Gaunt, 1985). En este modelo, el sonido se produce cuando las fuerzas elásticas de las membranas y la acción de los músculos siríngeos configuran el aparato vocal de manera tal que se genera un pequeño orificio entre la MTM y el lumen siríngeo, a través del cual el aire fluye.

De esta manera, cuando el ave exhala se crea un gradiente de velocidad dentro del flujo de aire respiratorio, con bajas velocidades cerca de la MTM y altas velocidades en el centro del orificio. Debido a este gradiente, el aire debe enrollarse alrededor de la MTM. Por lo cual, los vórtices se separan periódicamente de la MTM creando así condensaciones periódicas en la columna de aire traqueal dando lugar al sonido (Casey & Gaunt, 1985).

Este modelo, enteramente teórico, fue desestimado luego de los trabajos de Goller y Larsen, en los cuales obtuvieron imágenes endoscópicas de la siringe de distintas aves, mientras vocalizaban. En sus videos se pudo observar que durante la fonación, la membrana medial (MM) y la membrana lateral (ML) se aducen hacia el lumen de la siringe y vibran (F Goller & Larsen, 1997; Larsen & Goller, 2002). Estas fueron las primeras mediciones directas de la fuente sonora. Sin embargo, la resolución de la cámara no permitió describir el detalle de las oscilaciones. A su vez, en otro grupo de experimentos, notaron que, si lesionaban las MTMs o las extraían completamente, las aves podían vocalizar de forma normal, por lo que descartaron a estas membranas como fuentes de sonido (F Goller & Larsen, 1997). Reprodujeron este tipo de experimentos en distintas aves, con distintas morfologías siríngeas.

En su conjunto, estos trabajos proponen que, en las aves oscinas, las vocalizaciones se generan por la oscilación de los labios lateral (LL) y medial (LM), ubicados sobre las paredes del aparato fonador (siringe). Estas oscilaciones son inducidas por el flujo de aire, convirtiendo parte de la energía cinética del aire en energía acústica, de forma muy similar a las oscilaciones de las cuerdas vocales humanas (F Goller & Larsen, 1997; P. Marler & Slabbekoorn, 2004; Gabriel B. Mindlin & Laje, 2005). Tiempo después se logró medir el movimiento de estas membranas con cámaras de alta resolución, comprobando empíricamente la pertinencia del modelo (Elemans et al., 2015).

2.1.2 De fuentes y tractos

Existe una enorme diversidad morfológica en las siringes de las aves. En algunas especies, incluidas palomas y loros, la siringe consta de anillos cartilaginosos modificados cerca del extremo inferior de la tráquea (Figura 2.Ab). En otras especies, como pingüinos, muchos búhos y algunos cucos, la siringe consiste en dos semi-siringes localizadas en los bronquios primarios (Figura 2.Ac). Por otro lado, en muchas aves, que incluyen pero que no se limitan a las aves oscinas, la siringe se encuentra en la unión donde los dos bronquios primarios se unen para formar la tráquea (Figura 2.Aa). Esta siringe, conocida como *traqueobronquial*, incluye cartílagos modificados tanto del extremo superior de cada bronquio como del extremo inferior de la tráquea (P. Marler & Slabbekoorn, 2004; R A Suthers, 2001).

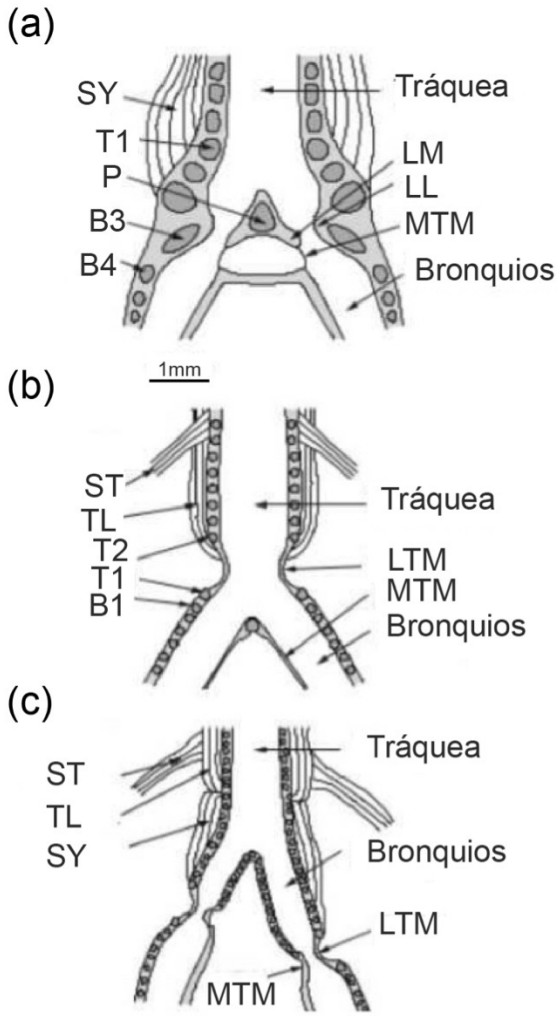


Figura 2.A: Se muestran las secciones ventrales de los 3 tipos de siringes descriptas. (a) Siringe traqueobronquial, con dos fuentes sonoras. Cada una de estas fuentes sonoras está compuesta por un par de labios, labio lateral (LL) y labio medio (ML) y se ubican en la juntura entre los bronquios y la tráquea. Las letras T y B representan los anillos traqueales y bronquiales respectivamente; SY, representa un músculo siríngeo intrínseco y P, el pessulus; MTM es la membrana timpanoforme media. (b) Siringe traqueal, la constricción del lúmen traqueal debido a la membrana lateral timpanoforme (LTM) genera la única fuente sonora. Las letras TL y ST representan los músculos siringeos *Traqueolateralis* y *sternotraquealis*, respectivamente. (c) Siringe bronquial, las fuentes se ubican en los bronquios. Figura adaptada de Mindlin & Laje, 2005.

Esta variedad de formatos que presentan las siringes trae aparejada grandes diferencias anatómicas y fisiológicas. Por ejemplo, si consideramos las fuentes de sonido, observaremos que hay diferencias tanto en términos de cuáles son las membranas que oscilan, como en la posición de las mismas: En las siringes traqueales, las membranas timpaniformes laterales (MTM) son las encargadas de producir los sonidos, por lo que las aves que poseen este tipo de

siringe tienen sólo una fuente de sonido. En las siringes bronquiales, las fuentes sonoras conformadas por las membranas timpaniformes laterales y mediales se ubican sobre los bronquios a distintas alturas respecto de la juntura con la tráquea. Finalmente, las siringes traqueobronquiales se caracterizan por tener dos pares de membranas fonatorias llamados labios lateral (LL) y medial (LM) (R A Suthers, 2001). Este grupo de aves tiene la habilidad de controlar en forma independiente las dos fuentes sonoras, aumentando la riqueza de las vocalizaciones que pueden generar.

Otra diferencia importante se encuentra en la inervación muscular. Existen dos tipos de músculos siríngeos: los llamados intrínsecos, que se originan e insertan en la siringe, y los extrínsecos, con al menos un extremo asociado a otra porción del tracto vocal. En las aves, la diversidad de musculatura siríngea va desde un par de músculos extrínsecos y ningún músculo intrínseco en los vencejos (Familia Apodidae), a una compleja configuración muscular de 5 pares de músculos intrínsecos y 6 pares de músculos extrínsecos, en las siringes de las aves oscinas (R A Suthers, 2001).

En general, un mayor número de músculos permite tener más grados de libertad en la configuración de la siringe para producir diferentes sonidos. Y, de hecho, hay una correlación positiva (leve) entre complejidad acústica del canto y la cantidad de músculos siríngeos (Gaunt, 1983). Sin embargo, existen muchos contraejemplos, siendo el caso más paradigmático el de los loros que con sólo un par de músculos siríngeos consiguen reproducir vocalizaciones de gran complejidad (R A Suthers, 2001).

Por otro lado, la posición de las fuentes, así como el largo de la tráquea, la apertura del pico o el volumen de la cavidad oroesofaríngea, dejarán su impronta en la naturaleza de las vocalizaciones. Estas cavidades forman parte del tracto vocal superior que filtra el sonido producido. La configuración de estos tractos (largo, volumen, etc.) determinan frecuencias de resonancia, que permiten amplificar o atenuar ciertas frecuencias del espectro del sonido (Arneodo & Mindlin, 2009; Perl, Arneodo, Amador, Goller, & Mindlin, 2011). En general, estas propiedades son estáticas y están determinadas por las dimensiones corporales de las aves. Sin embargo, en algunos casos las aves modifican dinámicamente el volumen de estas cavidades durante el canto, resaltando así la *frecuencia fundamental* de las vocalizaciones (Riede, Suthers, Fletcher, Blevins, & Marler, 2006).

2.1.3 Control motor y propiedades acústicas de las vocalizaciones

El inicio y el tempo de la canción está determinado principalmente por los ciclos respiratorios. Estos se inician cuando los músculos expiratorios comprimen los sacos aéreos toráxicos, aumentando la presión de manera que el aire fluya a través de la siringe hacia la tráquea (David S Vicario, 1991). Luego, los músculos inspiratorios expanden el tórax y el abdomen,

reduciendo la presión e invirtiendo la dirección del flujo de aire (P. Marler & Slabbekoorn, 2004).

La mayoría de las especies vocalizan durante la fase exhalatoria del ciclo respiratorio, en la cual el flujo de aire induce oscilaciones en los labios, aunque existen algunos ejemplos que también vocalizan en el ciclo inspiratorio (Franz Goller & Daley, 2001). Sumado a esto, las aves oscinas tienen un mecanismo adicional que permite controlar el inicio y finalización de las vocalizaciones aun cuando el flujo respiratorio supera el umbral de fonación (F Goller & Suthers, 1996). Estas aves pueden controlar de forma independiente la musculatura de cada lado de la siringe a través del nervio hipogloso, pudiendo así generar sonidos diferentes con ambas fuentes (F Goller & Suthers, 1996; R A Suthers, 2001).

Los trabajos de Goller y Suthers, han proporcionado evidencias contundentes acerca del rol de distintos músculos siríngeos en este proceso. Los investigadores monitorearon el flujo de aire en ambos lados de la siringe junto con la presión de los sacos aéreos y la actividad electromiográfica (EMG) de distintos músculos durante el canto del cuitlacoche rojizo (*Toxostoma rufum*). Los resultados arrojados indicaron que los músculos efectores de este mecanismo son el siringealis dorsalis (dS) y el tracheobronchialis dorsalis (dTB), cuya contracción aduce los labios; y el traqueobronquialis ventralis (vTB), junto con el traqueolateralis (TL), que abducen las membranas (F Goller & Suthers, 1996) (Figura 2.B). Cabe aclarar que en términos del control de las vocalizaciones, la contracción de los distintos músculos producen el mismo efecto, es decir, impedir la fonación del lado correspondiente, aunque el modo en que esto ocurre es diametralmente opuesto (F Goller & Suthers, 1996; Gabriel B. Mindlin & Laje, 2005).

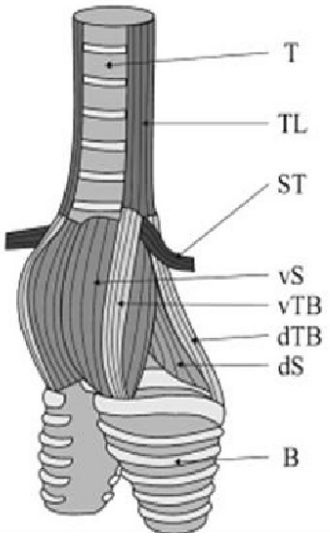


Figura 2.B: Esquema ventro-lateral de la siringe mostrando los músculos siríngeos. El músculo siringealis ventralis (vS) controla en gran parte la frecuencia fundamental de las vocalizaciones; los músculos siringealis dorsalis (dS) y el dorsal traquobronquial (dTB) se

encargan de la adducción del lúmen siríngeo de los labios; los músculos traqueobronquialis ventralis (vTB) y el traqueolateralis (TL) se encargan de la abducción del lúmen; el otro músculo extrínseco es el sternotraquialis (ST); las letras T y B representan la tráquea y los bronquios respectivamente. Figura adaptada de Goller & Suthers, 1996.

Otra característica por demás notoria de las vocalizaciones de las aves, es su sorprendente capacidad de modulación de la frecuencia fundamental (o tono) del sonido. Esta propiedad está vinculada tanto a parámetros fijos que dependen de características anatómicas del animal, como las propiedades viscoelásticas de las membranas o las dimensiones del tracto vocal, así como a parámetros dinámicos como la tensión labial y la presión de los sacos aéreos (R. Alonso, Goller, & Mindlin, 2014; Franz Goller & Riede, 2013; Riede & Goller, 2010).

El rol de los músculos siríngeos en el control de la frecuencia fundamental también fue explorado en los trabajos seminales de Goller y Suthers. En estos estudios, los investigadores encontraron que la frecuencia fundamental de las vocalizaciones del cuitlacoche rojizo se correlaciona positivamente con la actividad electromiográfica del músculo *siringealis ventralis* (vS) (Figura 2.B) (Franz Goller & Suthers, 1996). De esta forma, la contracción del músculo *vS* podría estar modificando la distancia entre los anillos cartilaginosos sobre los cuales se insertan las membranas fonatorias, aumentando la tensión de las mismas (Gabriel B. Mindlin & Laje, 2005).

Por otro lado, el estudio de las vocalizaciones del benteveo (*Pitangus sulfuratus*) proporcionó un claro ejemplo de un mecanismo alternativo de control de frecuencia fundamental en la producción de canto de los pájaros. El benteveo es un suboscino, grupo evolutivamente emparentado con las aves oscinas. El órgano vocal de los benteveos es traqueobronquial con dos fuentes sonoras, pero cuenta con sólo cuatro pares de músculos siríngeos, en comparación con los seis pares en las aves oscinas. En esta especie, las modulaciones de la frecuencia fundamental están altamente correlacionadas con la presión de los sacos aéreos. Por otra parte, al denervar los músculos de la siringe, la fuerte correlación entre la frecuencia fundamental y los patrones de presión del saco aéreo se mantiene sin cambios. Esta sorprendente falta de control de frecuencia por los músculos siríngeos (y gran correlación con la presión) en los benteveos contrasta fuertemente con lo reportado en las aves oscinas (A Amador, Goller, & Mindlin, 2008).

Recapitulando, se puede decir que el control motor de las vocalizaciones es un proceso sumamente complejo que requiere de la coordinación de una gran cantidad de músculos siríngeos y respiratorios, cuyos roles y contribuciones a distintas propiedades acústicas pueden diferir en distintas especies (P. Marler & Slabbekoorn, 2004).

2.2 Biomecánica Cuantitativa

En la sección anterior, introdujimos de manera cualitativa los mecanismos básicos por los cuales se producen las distintas vocalizaciones en las aves oscinas. Resumidamente, el sonido se produce cuando un gesto respiratorio establece un flujo de aire que induce oscilaciones en las membranas fonatorias. Al mismo tiempo, la contracción de los músculos siríngeos modificará la configuración de estas membranas dando lugar a cambios en las propiedades acústicas del canto. Finalmente, las mismas serán filtradas cuando el sonido atraviese el tracto superior hacia el pico (Gabriel B. Mindlin, 2017a).

No obstante, para entender en profundidad cuáles son los mecanismos involucrados en la generación del canto, una descripción cualitativa de la biomecánica resulta, al menos, limitada. El motivo es sencillo, la dinámica de la siringe y en particular de las membranas fonatorias, es altamente no-lineal. Por esta razón, resulta sumamente difícil predecir qué características acústicas tendrá el sonido producido aun conociendo la actividad de un conjunto de músculos involucrados en el control motor de las vocalizaciones (Gabriel B. Mindlin, 2017a). Ahora bien, ¿cómo podemos discernir qué características acústicas están explícitamente codificadas en las instrucciones neuronales que comandan la producción vocal? O, dicho de otro modo, ¿cómo podemos determinar cuánta de la complejidad acústica observada emerge de instrucciones neuronales simples que operan sobre un dispositivo altamente nolineal?

El abordaje de este tipo de preguntas requiere del pasaje de una representación conceptual del funcionamiento del aparato fonador motivada por estudios anatómicos y fisiológicos, a una descripción *cuantitativa* de la biomecánica involucrada. El lenguaje natural para este tipo de enfoque es el de la *dinámica no lineal*. Por tal motivo, en el Laboratorio de Sistemas Dinámicos, se han desarrollado distintos *Modelos Dinámicos de Fonación*. Los mismos fueron propuestos tanto para humanos como para aves con el objetivo de estudiar los mecanismos involucrados en la generación de sonidos complejos y de caracterizar el rol del aparato periférico en este proceso (Arneodo & Mindlin, 2009; Assaneo & Trevisan, 2013; Assaneo, Trevisan, & Mindlin, 2013; Gardner et al., 2001; Laje & Mindlin, 2005; G B Mindlin, Gardner, Goller, & Suthers, 2003; Gabriel B. Mindlin, 2017a).

En el marco de esta tesis, estudiamos el aparato fonador del canario doméstico (*Serinus canaria*); y en particular, las contribuciones de algunos parámetros fisiológicos (como la presión de los sacos aéreos y la tensión del músculo *siringealis ventralis*) en el control de la frecuencia fundamental del canto. Para ello, en este capítulo, presentaré un modelo dinámico de fonación que describe el funcionamiento de la siringe. Luego, describiré los resultados de este modelo en términos de isofrecuencias y, finalmente, propondré un método para testear la pertinencia de este modelo con mediciones experimentales de presión de los sacos aéreos.

2.2.1 Modelos Dinámicos de Fonación

En las aves oscinas, los sonidos se producen debido a la inyección periódica de aire hacia la tráquea ejercida por gestos respiratorios. Este flujo se puede describir matemáticamente de la siguiente manera:

$$q = \rho A v \,,$$

dónde el término *q* representa el flujo de aire, ρ la densidad, *A* el área del lumen y *v* la velocidad del aire. Asimismo, la dinámica de las fluctuaciones de densidad del aire inducida por el flujo inyectado a la tráquea, estará dada por:

$$\frac{\partial^2 \rho}{\partial t^2} - {c_0}^2 \nabla^2 \rho = \frac{\partial q}{\partial t} .$$

Esta ecuación describe la propagación de una onda de sonido en un fluido. El término c_0 es la velocidad del sonido, ∇ es el vector gradiente, que indica en qué dirección varía más rápidamente el campo de densidades; finalmente, el término $\frac{\partial q}{\partial t}$ da cuenta de la variación temporal del flujo de aire que atraviesa la siringe hacia la tráquea. Esta dinámica depende del área del lumen (*A*), que es el producto de la longitud transversal de las membranas fonatorias (constante) y una variable que describe el movimiento de estas membranas. Debido a esto, el modelo que se describe a continuación, se centrará en describir las oscilaciones de las membranas fonatorias que actúan como fuente sonora (Gardner et al., 2001; Gabriel B. Mindlin, 2017a; Titze, 1988).

Uno de los primeros modelos dinámicos de membranas fonatorias fue propuesto por Ingo Titze a fines de la década de los 80 (Titze, 1988). Allí, en el marco del estudio de las cuerdas vocales humanas, el autor describió dos tipos de oscilaciones: una oscilación lateral (perpendicular a la dirección del flujo de aire) y una oscilación vertical sobre los bordes de las membranas (paralela al flujo). La particularidad de estos modos oscilatorios es que no son independientes, sino que actúan de manera coordinada permitiendo la transferencia de energía del flujo de aire hacia las membranas; lo que produce *oscilaciones autosostenidas* (Titze, 1988) (Figura 2.C). Este modelo se conoció como el "modelo de aleteo" (o *flapping model*) por la similitud con el movimiento de las alas de un ave. Sorprendentemente, este tipo de oscilaciones también fue observada experimentalmente en las siringes de las aves (Elemans et al., 2015; F Goller & Larsen, 1997), por lo cual se ha podido extrapolar estos modelos a vocalizaciones de oscinos (R. Alonso et al., 2014; Gardner et al., 2001; Gabriel B. Mindlin, 2017b).

En su versión más elemental, el modelo de *aleteo* describe a cada membrana como una masa sujeta a un resorte que se encuentra embebida en un medio viscoso. De este modo, si aplicamos las ecuaciones correspondientes a las leyes de Newton para cada una de estas masas, y

llamamos *x* a la posición media de una masa respecto al centro de separación entre ambas membranas, obtenemos lo siguiente:

$$m\ddot{x} + k(t)x + B\dot{x} = f(x, \dot{x}, t) \quad \text{(I)}$$

donde *m* representa a la masa, *k(t)* a la fuerza de restitución elástica y *B* el coeficiente de disipación viscosa; $x, \dot{x}$ y $\ddot{x}$ corresponden al desplazamiento medio de la masa, la velocidad y la aceleración, respectivamente, *f* un forzante y *t* al tiempo (Titze, 1988).

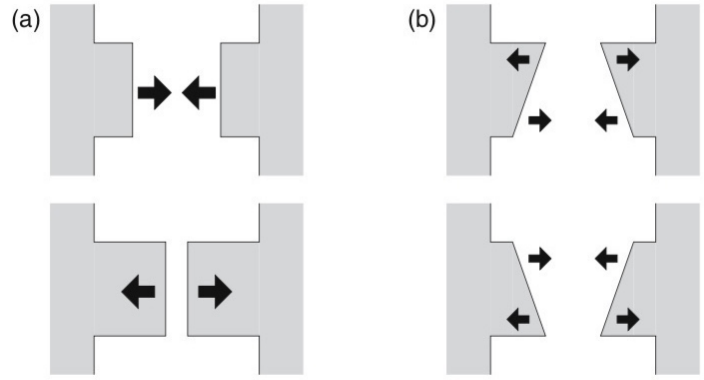


Figura 2.C. Modelo de aleteo (*flapping model*) (a) Oscilación lateral y (b) Oscilación vertical. Extraído de Mindlin & Laje, 2005.

Ahora bien, una característica fundamental de estos modelos es la existencia de *oscilaciones autosostenidas*. ¿Cómo ocurre la transferencia de energía necesaria para que se produzca este fenómeno? ¿cómo es la coordinación entre ambos modos oscilatorios?

Veremos más adelante que la naturaleza del forzante será la responsable de este efecto. Sin embargo, como primera aproximación, podemos hacer una descripción cualitativa de lo que sucede: cuando expiramos, la presión en los bronquios es mayor a la presión atmosférica, lo cual establece un flujo de aire hacia el exterior. En esta situación, si las membranas forman un perfil convergente, la presión promedio entre las membranas será esencialmente la presión bronquial, y la presión por encima de las membranas la atmosférica (Gardner et al., 2001; Titze, 1988). Entonces, si los dos modos están coordinados de manera tal que cuando las membranas se alejan presentan un perfil convergente; habrá una fuerza, ejercida por la presión interlabial, actuando en la dirección del movimiento lateral de las membranas. En tal caso, si la presión bronquial es lo suficientemente grande, el flujo podrá ejercer un trabajo sobre las membranas que supere la pérdida por disipación, generando *oscilaciones autosostenidas*.

Esta descripción intuitiva puede formalizarse con la ayuda de modelos matemáticos de la biomecánica fonatoria. Como mencioné anteriormente, en estos modelos, se propone una descripción de la dinámica de las cuerdas vocales a través de la posición media de los labios (*x(t)*), respecto a la mitad de la separación entre las membranas. Esta variable permite describir el modo de oscilación lateral, pero no captura el movimiento de la onda vertical. Por lo tanto,

para poder caracterizar el complejo movimiento de *aleteo* se propone explícitamente, una restricción sobre la cinemática de los labios (Titze, 1988).

En efecto, si consideramos a los labios como una masa unitaria y describimos la posición de los extremos superior e inferior de las membranas (también respecto a la mitad de la separación de los labios) como a_1 y a_2, respectivamente, podemos escribir esta restricción de la siguiente manera:

$$a_1 = a_{10} + x + \tau\dot{x}$$

$$a_2 = a_{20} + x - \tau\dot{x} \quad \text{(II)}$$

dónde las constantes a_{10} y a_{20}, representan la configuración de los labios cuando están relajados, el parámetro τ el tiempo que tarda en viajar la onda vertical y la variable $\frac{dx}{dt}$ la velocidad de la posición media de los labios.

Dada esta condición, cuando los labios se están separando ($\dot{x} > 0$), el extremo inferior se aleja más del valor medio que el superior ($a_1 > a_2$) entonces, si esto sucede en ambos labios el perfil que se forma en el espacio interlabial será convergente. Contrariamente, cuando los labios se acercan ($\dot{x} < 0$), la posición de los extremos será la opuesta ($a_1 < a_2$), por lo que el perfil será divergente. En la Figura 2.D(c), se muestra una representación de ambos modos actuando coordinadamente.

Basándonos en esta configuración de las membranas, podemos calcular la *presión interlabial promedio* como:

$$P_{inter} = P_{sub}\left(1 - \frac{a_2}{a_1}\right) \text{(III)}$$

dónde P_{sub} corresponde a la presión de los sacos aéreos por debajo de los labios (Gardner et al., 2001). Asimismo, la fuerza que ejerce la presión va a estar dada por el producto de la *presión interlabial promedio* y el área transversal de las membranas fonatorias (a_{labial}):

$$f_{inter} = P_{inter} a_{labial} \quad \text{(IV)}$$

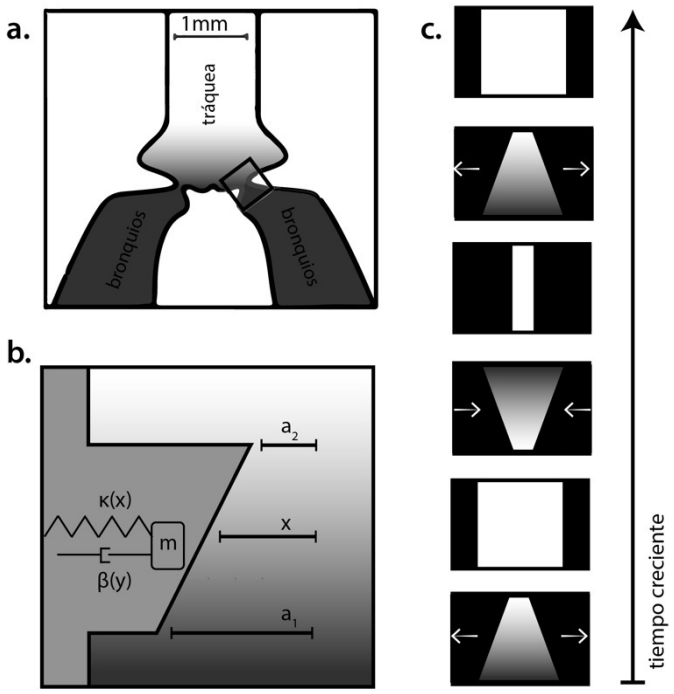


Figura 2.D: Diagrama de siringe y movimientos de los labios. (a) Esquema de sección transversal de siringe traqueobronquial, el recuadro marca la juntura entre los bronquios y la tráquea, donde se encuentran las membranas fonatorias. (b) Diagrama de una de las membranas fonatorias, con las variables utilizadas en los modelos de fonación. (c) Dinámica que presentan las membranas fonatorias cuando se encuentran oscilando. Se observan los dos modos oscilatorios actuando coordinadamente. El gradiente de color gris representa la variación de presión de aire. Adaptado de *Gardner et al., 2001*.

Entonces, utilizando (II) y (III), podemos calcular P_{inter} cuando los labios se están alejando con perfil convergente, o acercando con perfil divergente. Luego, dada una cierta área labial (constante) obtenemos la fuerza que ejerce dicha presión en cada caso (IV). Finalmente, valiéndonos de lo anterior, podremos verificar que la fuerza ejercida por la presión interlabial actúa en la dirección del movimiento ($\dot{x}$). Así pues, si consideramos a esta magnitud como el forzante (*f*) de la ecuación (I), cuando ésta fuerza supere a la fuerza de disipación viscosa ($f>B$) se producirá una transferencia de energía del flujo a las membranas, dando lugar a *oscilaciones autosostenidas*.

Recapitulando, si agregamos a la expresión (I) la fuerza interlabial como forzante, tendremos:

$$m\ddot{x} + k(t)x + B\dot{x} = a_{lab}P_{sub}\left(1 - \frac{a_2}{a_1}\right) \text{ (V)}$$

Si aproximamos $\left(1 - \frac{a_2}{a_1}\right) \sim \dot{x}$ y llamamos $\beta(t) \approx a_{lab}P_{sub}$, podemos incorporar la fuerza interlabial al término disipativo constante, obteniendo:

$$m\ddot{x} = -k(t)x + (\beta(t) - B)\dot{x} \text{ (VI)}$$

Este sistema presenta soluciones oscilatorias siempre que *k(t)*>0 y $(\beta(t) - B) > 0$. No obstante, para reproducir el tipo de oscilaciones observadas en la siringe necesitaremos incorporar a esta descripción otras fuerzas que actúan sobre las membranas fonatorias de las aves oscinas.

2.3 Modelo con Restitución No-Lineal

En esta sección, exploramos la dinámica de un modelo físico propuesto para un labio siríngeo, donde diferentes fuerzas impulsan una masa unitaria (*m=1*) que representa el labio (R. Alonso et al., 2014; Ana Amador & Mindlin, 2008; G B Mindlin et al., 2003; Titze, 1988). Las fuerzas son: (i) la restitución elástica, que depende del desplazamiento del labio de su posición de equilibrio, (ii) la disipación lineal (proporcional a la velocidad labial), que incluye una contribución negativa que representa la transferencia de energía desde el flujo de aire a la masa, (iii) la disipación no lineal, que es responsable de delimitar las oscilaciones y representa el colapso de los labios contra las paredes o el uno contra el otro, y (iv) fuerzas que representan la abducción y aducción activa .

Este modelo se diferencia de versiones previas para vocalizaciones de canarios (Gardner et al., 2001; Laje, Gardner, & Mindlin, 2002; G B Mindlin et al., 2003) principalmente, en la inclusión de un término no lineal en la restitución elástica. Esta nolinealidad ha sido utilizada en modelos de fonación en otras especies como el benteveo (*Pitangus sulfuratus*), para dar cuenta de la correlación observada entre la frecuencia fundamental y la presión (Ana Amador, Goller, & Mindlin, 2008); o en modelos de vocalizaciones de Diamante Mandarín (*Taeniopygia guttata*), para explicar la relación existente entre el contenido espectral y la frecuencia fundamental de las vocalizaciones (J. D. Sitt, Amador, Goller, & Mindlin, 2008). Como veremos a continuación, esta incorporación modifica notablemente la estructura de las soluciones y, por tanto, genera una serie de predicciones que se diferencian de los modelos previos utilizados en canarios.

Dicho esto, si describimos la dinámica de la posición media de los labios como un todo (*x*), consideramos el fenómeno de *aleteo* en la expresión de la disipación lineal y agregamos las otras fuerzas involucradas, podemos escribir el sistema dinámico propuesto para las membranas fonatorias de la siguiente manera:

$$\dot{x} = y$$

$$\dot{y} = -k(t)\gamma^2(x - \epsilon x^3) - [\beta(t) - B]\gamma y - cx^2\gamma y + \gamma^2 f_{add}(t) - \gamma^2 f_{abd}(t)\,.$$

En este conjunto de ecuaciones, *κ(t)* representa el coeficiente de restitución elástica y [β (t) – B] el coeficiente de disipación negativa. El modelo incluye un término cúbico en la restitución (ϵx^3), un término de disipación no lineal (cx^2y) y dos fuerzas independientes de la posición *(x)* y de la velocidad (*y*): la fuerza de aducción (f_{add}) y la fuerza de abducción (f_{abd}). El coeficiente γ

es un factor de escala de tiempo. En este modelo, hay dos escalas de tiempo bien separadas. Los parámetros $\kappa(t)$ y $[\beta(t) - B]$ fluctúan en las escalas de tiempo de las sílabas (en el orden de 100 ms), mientras que $x=x(t)$ presentarán oscilaciones con frecuencias en el rango de kHz.

El término de disipación negativa producto de la fuerza que ejerce el flujo de aire sobre los labios, es proporcional a la presión de los sacos aéreos (Laje & Mindlin, 2005) y debe superar un umbral para que comiencen las oscilaciones. Por otro lado, al aumentar el valor de la restitución elástica ($k(t)$), aumenta la frecuencia de las oscilaciones. Entonces, dado que la restitución elástica dependerá de la tensión de los labios siríngeos, los cuales se estiran al contraerse el músculo *siringealis ventralis* (vS) (ver sección 2.1.3), uno se inclina a pensar en su actividad como un control analógico de la frecuencia fundamental de las vocalizaciones. De igual manera, la presión de los sacos aéreos puede considerarse como un interruptor digital de encendido y apagado para el inicio de cada vocalización (Franz Goller & Suthers, 1996). A su vez, las fuerzas de aducción ($f_{add}(t)$) y abducción ($f_{abd}(t)$), representan la acción de músculos siríngeos que controlan la apertura del lumen interlabial, como el músculo *traqueobronquialis ventralis* (vTb) y *tranqueobronquialis dorsalis* (dTb), respectivamente. Los cuales actúan como un control del inicio y finalización de las vocalizaciones, independiente a la actividad de los otros gestos motores (ver sección 2.1.3) (F Goller & Suthers, 1996).

Las no linealidades, por otro lado, son inevitables en un modelo operacional para la producción de canto en aves. Una vez que la posición de equilibrio pierde estabilidad, las oscilaciones labiales están limitadas. Los labios laterales y medial pueden colisionar entre sí o con las paredes que los contienen, perdiendo energía, ya que la salida de la posición de equilibrio es lo suficientemente grande (y el término aumenta con el cuadrado de la distancia). El término de disipación no lineal en nuestro modelo es el término de orden más bajo capaz de describir ese efecto (Laje & Mindlin, 2005; Lucero & Schoentgen, 2013). Hay otras no linealidades que pueden desempeñar un papel en el funcionamiento de la siringe. En el modelo presentado anteriormente, utilizamos un término no lineal para la restitución. La restitución debe ser modelada como una función impar de la variable que describe la salida del cuerpo oscilante del equilibrio. Por lo tanto, incluimos un término no lineal en la restitución para explicar la saturación de las oscilaciones.

Una vez que se incluye la no linealidad en nuestro modelo, no es posible separar los roles de la presión del saco aéreo y la tensión labial en la determinación de la frecuencia fundamental de la fonación. Ambos participan sinérgicamente para lograr una característica acústica determinada.

2.3.1 Curvas de Isofrecuencia

Para develar cómo la tensión κ y la presión β participan en la determinación de la frecuencia fundamental, trazamos curvas de *isofrecuencia*: curvas en el espacio de parámetros (κ, β) tales que el modelo da lugar a oscilaciones de una dada frecuencia.

Comenzando con el caso ε = 0, c = 1, es posible encontrar un régimen en el cual las líneas de *isofrecuencias* puedan calcularse analíticamente. En efecto, si despreciamos los términos de aducción y la abducción activa, nuestro modelo puede escribirse como

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \kappa\gamma^2 x - \beta\gamma\frac{dx}{dt} + \gamma x^2\frac{dx}{dt} = 0 \ .$$

Para $\beta\gamma \gg 1$ y $\frac{\kappa\gamma}{\beta} \ll 1$, la ecuación describe la dinámica de un oscilador de relajación. Entonces, si hacemos un cambio de variables, $v = \frac{dx}{dt} + \beta\gamma(\frac{x^3}{3\beta} - x)$, podemos reescribir el sistema de la siguiente manera:

$$\frac{dx}{dt} = \beta\gamma\left[\frac{v}{\beta\gamma} - \left(\frac{x^3}{3\beta} - x\right)\right],$$

$$\frac{d}{dt}\left(\frac{v}{\beta\gamma}\right) = -\frac{\kappa\gamma}{\beta}x$$

Para caracterizar la dinámica de un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias, suele ser útil calcular las curvas en las cuales las derivadas temporales de las variables son nulas; las llamadas *nulclinas*. En un sistema bidimensional como el anterior, estas curvas estarán dadas por $\frac{dx}{dt} = 0$ y $\frac{d}{dt}\left(\frac{v}{\beta\gamma}\right) = 0$. Entonces si definimos $V \equiv \frac{v}{\beta\gamma}$, la dinámica del sistema estará determinada por la estructura de la *nulclina* $V = \left(\frac{x^3}{3\beta} - x\right)$.

En este caso, cualquier condición inicial (excepto el origen) convergerá rápidamente, casi horizontalmente hacia la *nulclina*. Luego, lentamente se arrastrará cerca de ella hasta que llegue a uno de sus puntos de inflexión, para saltar rápidamente a la otra rama de esta *nulclina* cúbica. Si despreciamos los tiempos necesarios para los saltos, el período de oscilación se puede aproximar al doble del tiempo que el sistema se arrastra cerca de cualquiera de las ramas (Strogatz, 1994). Entonces, obtenemos:

$$T = \frac{\beta}{\kappa\gamma}(3 - 2ln2),$$

por lo que la frecuencia de las oscilaciones puede aproximarse por $\varpi \approx \frac{\kappa}{\beta}$.

Por lo tanto, las curvas de isofrecuencia en el espacio (*β, κ*) son líneas rectas con pendiente positiva. Entonces, dada esta estructura de isofrecuencias, los gestos de presión y tensión necesarios para lograr una característica acústica determinada deben coordinarse de manera

precisa. Por ejemplo, si un pájaro canta una sílaba de frecuencia fundamental constante mientras disminuye la presión ($\frac{d\beta}{dt} < 0$), necesitará que la tensión labial también disminuya adecuadamente de forma tal de mantenerse dentro de una misma isofrecuencia (en el espacio β, κ).

El análisis anterior es válido para valores altos de presión, ya que la separación de escalas de tiempo lentas y rápidas requiere que $\frac{\kappa\gamma}{\beta} \ll 1$. De hecho, para comprender el comportamiento del sistema para valores bajos de presión se debe realizar un enfoque diferente. El motivo es el siguiente: para valores de $\beta \to 0$, el sistema deja de oscilar. Entonces, a medida que disminuimos la presión, el sistema se acerca a lo que llamamos una *bifurcación*. Es decir, una zona del espacio de parámetros en la que ocurren cambios cualitativos en las soluciones del sistema.

Este tipo de bifurcación se conoce como bifurcación de *Hopf* (o Andronov-Hopf) y se produce cuando cambia la estabilidad del sistema de manera tal que pasa de tener un punto fijo atractor a uno repulsor junto a un ciclo límite, generándose órbitas periódicas. En este caso, las oscilaciones nacen con amplitud cero y frecuencia bien definida (Strogatz, 1994).

Dicho esto, para un sistema dinámico en la proximidad de una bifurcación, es posible realizar una serie de cambios de coordenadas, que eliminan todos los términos no resonantes, llevando al sistema a una versión "simplificada", cuya dinámica es conocida. Este procedimiento algorítmico se conoce como *reducción a la forma normal* (Guckenheimer & Holmes, 2013). A continuación, utilizaremos este algoritmo para obtener la frecuencia de las oscilaciones para el sistema cerca de la bifurcación.

Recapitulando, si tomamos el sistema dinámico propuesto sin las fuerzas de aducción y abducción, tendremos:

$$\frac{d^2x}{dt^2} + \kappa\gamma^2(x - \epsilon x^3) - \beta\gamma\frac{dx}{dt} + \gamma x^2\frac{dx}{dt} = 0.$$

Si entonces, re-escaleamos el tiempo $t = \Gamma\tau$, con $\tau = 1/(\gamma\sqrt{\kappa})$, el sistema quedará de la siguiente manera:

$$\frac{dx}{d\tau} = y,$$

$$\frac{dy}{d\tau} = -(x + \epsilon x^3) + \frac{\beta}{\sqrt{\kappa}}y - \frac{1}{\sqrt{\kappa}}x^2 y.$$

Por otro lado, si definimos las siguientes variables complejas (z,z*) como

$$\begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ i & -i \end{pmatrix}\begin{pmatrix} z \\ z^* \end{pmatrix},$$

podemos realizar un cambio de variables de manera de conservar sólo los términos resonantes, lo que lleva a escribir el sistema como

$$\frac{dz}{d\tau} = \left(\frac{\beta}{\sqrt{\kappa}} + i\right) z + \left(\frac{3}{2}\epsilon i - \frac{1}{2\sqrt{\kappa}}\right) z|z^2| \,,$$

que en términos de un módulo y una fase puede expresarse de la siguiente manera:

$$\frac{d\rho}{dt} = \gamma\beta\rho - \frac{1}{2}\gamma\rho^3 \,,$$

$$\frac{d\phi}{dt} = \gamma\sqrt{\kappa}\left(1 + \frac{3}{2}\epsilon\rho^2\right).$$

Esto nos permite describir las curvas de isofrecuencia. La dinámica oscilatoria ocurre cuando $\rho^2 = \beta$, y, por lo tanto, para un valor dado de la frecuencia (ω), la isofrecuencia correspondiente será

$$\omega = \gamma\sqrt{\kappa}(1 + 3\epsilon\beta) \,.$$

Esto implica que en el espacio (β, κ) cerca de la bifurcación en la que nacen las oscilaciones, las isofrecuencias comienzan con una pendiente negativa siempre que $\varepsilon \neq 0$; cuanto mayor es el valor de frecuencia, mayor es la pendiente en valor absoluto. Si por el contrario $\varepsilon = 0$, las isofrecuencias nacerán con pendiente nula, es decir dependerán sólo del valor de κ.

Los dos regímenes discutidos anteriormente son cualitativamente diferentes (Figura 2.E). El cambio en la pendiente conlleva diferencias importantes en el control motor. Por ejemplo, si la tensión se mantiene constante durante la fonación en el primer caso la frecuencia de las vocalizaciones disminuirá a medida que aumente la presión. En el segundo caso, la frecuencia fundamental de las vocalizaciones se correlacionará positivamente con la presión. Las distintas no linealidades presentes en el sistema son responsables de diferentes efectos. Por lo que, dependiendo de las regiones del espacio de parámetros en que esté operando el ave tiene que coordinar delicadamente las instrucciones del sistema motor para lograr una característica acústica determinada.

Para verificar estas predicciones acerca de las pendientes de las isofrecuencias realizamos una integración numérica del modelo con restitución lineal (ε=0) y con restitución no-lineal (ε=0.3), para un amplio rango de los parámetros *k* y β. El resultado de esta integración se puede observar en la Figura 2.E, a continuación.

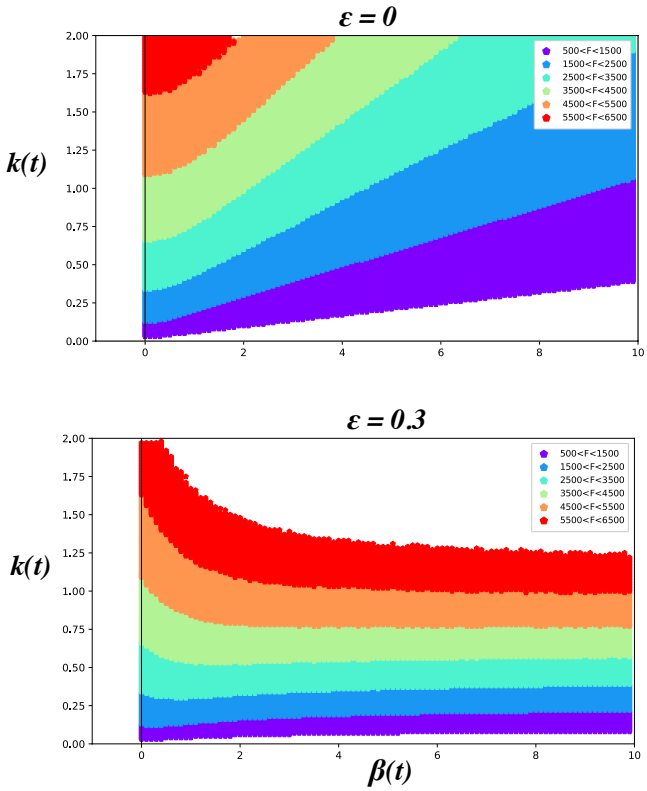


Figura 2.E: Diagramas de Isofrecuencia. (Panel superior) Modelo con Restitución Lineal ($\epsilon = 0, c = 2, \gamma = 27000$). (Panel inferior) Modelo con Restitución No Lineal (($\epsilon = 0.3, c = 2, \gamma = 27000$))

2.4 Predicciones y Observables

Una característica notable de los modelos cuantitativos es su capacidad predictiva. Incluso, en algunos casos es posible calcular de manera analítica las soluciones del sistema dando lugar a predicciones concretas. En este sentido, en la sección anterior calculamos el efecto del agregado de un término cúbico (ϵx^3) en el término de restitución elástica, lo cual da lugar a cambios dramáticos en la estructura de las isofrecuencias (Figura 2.E). Estos diagramas dan cuenta de la relación existente entre los pares ($\beta(t)$ y $\kappa(t)$) y la frecuencia del sonido producido. Este vínculo es cualitativamente distinto para cada modelo; en el primero, la presión correlaciona negativamente con la frecuencia (manteniendo la tensión constante), mientras que en el segundo ocurre lo contrario.

Ahora bien, dado que sólo podemos obtener mediciones directas de uno de estos parámetros (la presión de los sacos aéreos), para poder dilucidar cuál de estos modelos es más adecuado para describir la producción vocal en canarios será necesario encontrar variables experimentales que reflejen algún aspecto de las predicciones de los mismos. Dicho de otro modo, necesitaremos contrastar las predicciones de cada modelo con propiedades del sistema que puedan ser medidas; los *observables*.

2.4.1 Rol de la Presión de los sacos aéreos en el control de la Frecuencia Fundamental

La presión de los sacos aéreos puede ser adquirida mediante una serie de procedimientos quirúrgicos que se detallan en el Apéndice 1. Brevemente, la presión del saco aéreo se registra mediante la inserción de una cánula flexible en el saco aéreo ventral del ave. El extremo libre de la cánula se conecta a un transductor de presión, que se monta sobre la espalda del ave. Por su parte, el sonido de las vocalizaciones se registra por un micrófono direccional ubicado en frente a la jaula, dentro de una caja de aislación acústica. Luego, ambas señales son amplificadas de manera tal de poder ser adquiridas por una placa de conversión analógico-digital.

A modo ilustrativo, en la Figura 2.F se muestra un ejemplo prototípico de una señal de presión asociada a un canto particular de un canario, junto con el sonograma correspondiente.

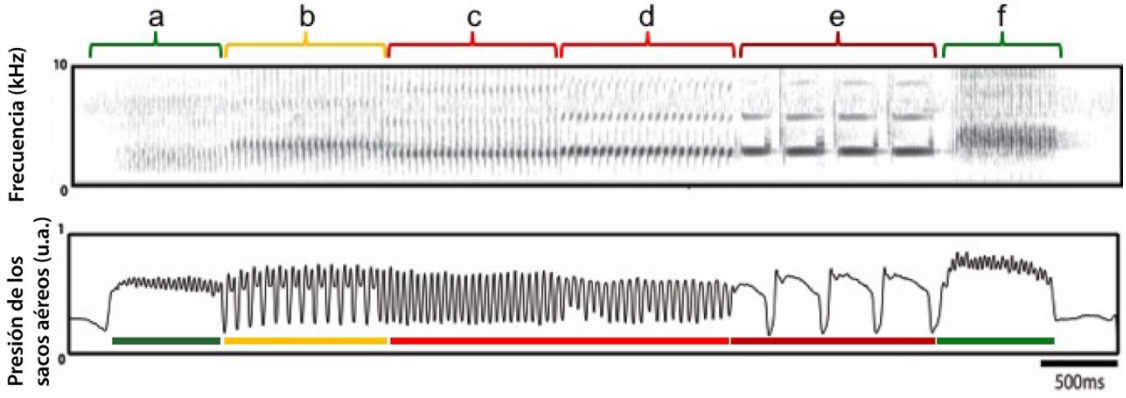


Figura 2.F: Gestos de Presión de los Sacos Aéreos de canarios (*Serinus canaria*). (Panel superior) Sonograma de canto de canario. Las llaves de colores corresponden a distintas sílabas (a-f). (Panel inferior) Gestos de presión de los sacos aéreos, mientras el ave vocaliza. Las barras de color corresponden a distintos tipos de gestos: pulsátiles (verde), P2 (amarillo), P1(rojo) y P2(rojo oscuro). Notar que un mismo gesto de presión puede dar lugar a sílabas diferentes (llaves c y d).

Una característica particular de los canarios es que generan una enorme diversidad de sílabas con gestos respiratorios que se pueden clasificar en cuatro patrones básicos (Alliende, Méndez, Goller, & Mindlin, 2010; Marcos A. Trevisan, Mindlin, & Goller, 2006): Los patrones pulsátiles (Figura 2.F, líneas verdes) consisten en pulsos de presión expiratoria sostenida, que muestran pequeñas modulaciones donde cada pico se corresponde con una sílaba. La secuencia que llamamos de período 1 (P1), consiste en oscilaciones que son de naturaleza cuasi armónica (Figura 2.F, línea roja clara). A su vez, un período 2 (P2) es un patrón en el que los pulsos son aproximadamente dos veces más largos que los de P1 y en los que cada pulso expiratorio típicamente muestra una modulación de presión con un mínimo relativo (Figura 2.F, línea amarilla). Finalmente, los patrones del período 0 (P0) son expiraciones sostenidas que utilizan para generar silbidos tonales; Son gestos expiratorios que generalmente contienen un pico de

presión breve seguido de un segundo pulso expiratorio largo casi constante hasta el final, donde la amplitud disminuye abruptamente (Figura 2.F, línea roja oscura).

El canto de un canario está compuesto por distintas frases (Figura 2.F). Cada frase se forma por un mismo tipo de sílaba que el ave repite un cierto número de veces. La diversidad de sílabas presentes en el repertorio típico de esta especie se caracteriza por una variedad de modulaciones de frecuencia (barridos ascendentes, barridos descendentes, sonidos de frecuencia constante, etc.). Se ha propuesto que dicha diversidad podría generarse por distintas diferencias de fase entre los gestos de presión de los sacos aéreos y de tensión labial (Gardner et al., 2001).

Por su parte, la tensión labial puede obtenerse a partir de la medición de electromiogramas del músculo *siringealis ventralis* (Apéndice 1) (Döppler, Bush, Goller, & Mindlin, 2018; Franz Goller & Suthers, 1996).

No obstante, dada la gran complejidad de las mediciones, la adquisición de ambos parámetros (presión - tensión) de manera simultánea es sumamente difícil, por lo que la caracterización y cuantificación precisa de las contribuciones de cada gesto motor en la modulación de la frecuencia fundamental permanece aún sin resolverse (Elemans et al., 2015). Por lo pronto, para intentar develar la estructura de isofrecuencias subyacente a la producción vocal de esta especie a partir de los gestos de presión, necesitaremos valernos de otra característica sobresaliente del canto de los canarios: *la repetición de sílabas*.

Para replicar una misma sílaba, el ave reproduce de manera estereotipada los mismos gestos motores. Sin embargo, en cada iterada introduce pequeñas variaciones en los mismos (Figura 2.F, panel inferior). Entonces, si estas mínimas variaciones de los parámetros correspondientes a la presión y la tensión no están correlacionadas, las mismas se traducirán en pequeños cambios en propiedades acústicas que podremos cuantificar. La hipótesis implícita en esta afirmación, es que el ave no compensa las pequeñas variaciones de un parámetro con cambios en otros gestos de manera de mantener una cierta característica acústica. Por lo tanto, si estas variaciones son inherentes a la ejecución de un programa motor, se traducirán en variaciones leves en el sonido producido.

Entonces, si asumimos que estas variaciones son independientes, podemos usar las fluctuaciones presentes en los gestos respiratorios para develar la organización de las isofrecuencias mediante la exploración de distintas áreas del espacio de parámetros alrededor de valores específicos, cuyas isofrecuencias tengan pendientes distintas en ambos modelos.

En consecuencia, construimos tres conjuntos de trayectorias en el espacio de parámetros del Modelo con Restitución No Lineal, que se muestran en la Figura 2.G. Cada conjunto está compuesto por seis subconjuntos de 19 trayectorias. Cada subconjunto supone una diferencia de fase promedio entre la tensión y la presión (es decir, una trayectoria elíptica en el espacio de

parámetros). Las 19 trayectorias del subconjunto se generan cuando se agrega ruido a las componentes de presión y de tensión de la elipse básica.

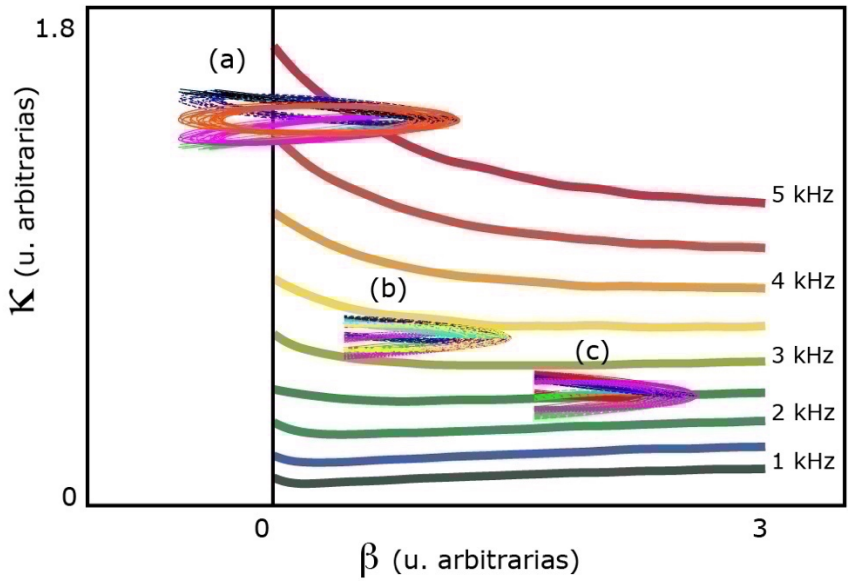


Figura 2.G: Curvas de Isofrecuencia del Modelo con Restitución No Lineal en el espacio de parámetro (β,κ), junto con 3 conjuntos de trayectorias utilizadas para general sílabas sintéticas. Observe que cada conjunto penetra en regiones cualitativamente diferentes del espacio de parámetros donde las isofrecuencias tienen pendientes negativas, cero o positivas. Las isofrecuencias y trayectorias se calcularon utilizando el modelo presentado previamente (sección 2.3) con ε = 0.3, c = 2 y γ=27000. Para cada conjunto generamos seis subconjuntos diferentes con 19 repeticiones cada uno, lo que lleva a los mismos β_{max} y κ_{max}. Cada trayectoria se genera utilizando funciones periódicas con una diferencia de fase entre *β(t)* y *κ(t)* de 0, -π/4, -π/2, π/2, π, y 3/4π, respectivamente. Dentro de cada trayectoria, se agregaron fluctuaciones aleatorias (hasta 20% de su amplitud) a *β(t)* y *κ(t)*. Para producir sílabas sintéticas con valores de *β* grandes, como los conjuntos (b) y (c), agregamos una función cuadrada periódica f_{add} = 1.0 para los valores de *β*<0.6 y *β*<1.8, respectivamente. Este parámetro representa la acción de los músculos que previenen la fonación mediante la aducción de los labios. Parámetros de las trayectorias: (a) β=0.3+0.7cos(20π), κ = κ_{0a}+0.05cos(20π + θ); (b) β=0,6+0,7cos(20π), κ=κ_{0b}+0,05cos(20π + θ); (c) β=1.8+0.7cos(20π), κ=κ_{0c}+0.05cos(20π + θ). κ_{0a}, κ_{0b} y κ_{0c} son ligeramente diferentes dentro de los subconjuntos para alcanzar el mismo β_{max}, κ_{max}.

De esta manera, generamos con cada una de las trayectorias en el espacio de parámetros, un sonido que corresponde a una sílaba sintética. Luego identificamos para cada sílaba el tiempo en que el parámetro *β* alcanzó su máximo (β_{max}) e inspeccionamos las propiedades espectrales del segmento de sonido de 1024 puntos alrededor de este tiempo, para registrar la frecuencia

fundamental. Debido al ruido introducido, el máximo de presión será ligeramente diferente para cada trayectoria dentro de un subconjunto. Esto, junto con las fluctuaciones en la tensión, simula la variación biológica de los parámetros fisiológicos en el proceso de repetir un tipo de sílaba. Bajo la hipótesis de que las fluctuaciones de la tensión son aleatorias, trazar la frecuencia fundamental de los segmentos seleccionados en función de la presión máxima, reflejará la naturaleza de las isofrecuencias. Este par de medidas teóricas (β_{max} - Frecuencia Fundamental) pueden ser registradas en mediciones experimentales de presión y canto, por lo que serán nuestros *observables*.

Ahora bien, las predicciones del modelo dependerán de la zona del espacio de parámetros. De hecho, en una región donde las isofrecuencias presentan una pendiente negativa en el espacio (β, κ), la correlación entre frecuencia y presión debe ser positiva ya que las exploraciones más grandes en la presión se intersectarán con las frecuencias correspondientes a valores mayores. De manera similar, en una región del espacio de fases que presenta isofrecuencias de pendiente positiva, la correlación entre frecuencia y presión debe ser negativa.

En la Figura 2.H, se muestra la frecuencia fundamental en función de los máximos del parámetro β_{max}, para los distintos conjuntos de trayectorias presentadas en la Figura 2.G. Para cada conjunto, los 6 subconjuntos de trayectorias fueron analizado de manera independiente. Como era de esperarse, de acuerdo a la zona del espacio de parámetros que se despliegan las distintas trayectorias, las pendientes de las rectas podrán ser positivas, negativas o nulas.

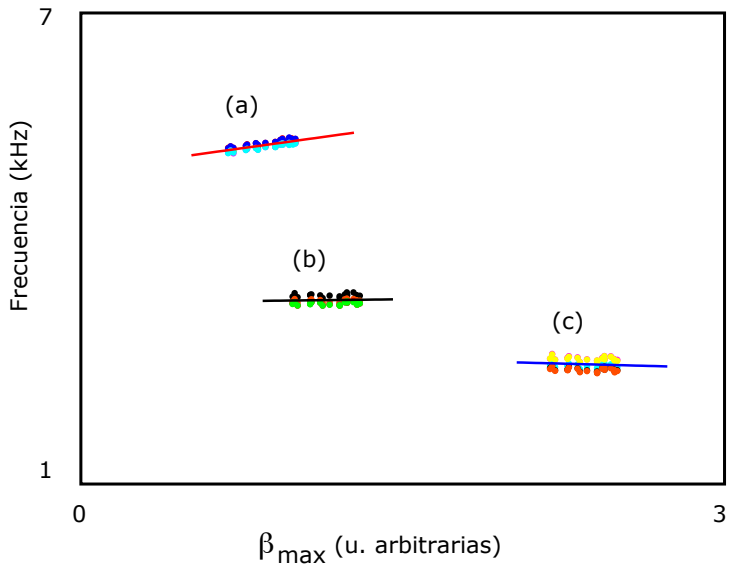


Figura 2.H: Predicciones y Observables del modelo. Frecuencia fundamental vs. β_{max} de los tres conjuntos de trayectorias expuesto en la Figura 2.G. Regresiones Lineales: (a) $f(x) = 379.03x + 4992.66, \sigma = 47.781$; (b) $g(x) = 27.61x + 3310.85, \sigma = 43.24$; (c) $h(x) = -69.79x + 2586.43, \sigma = 62.55$.

2.5 Datos Experimentales: *Signaturas de modelo dinámico subyacente*

Para develar la estructura de las isofrecuencias que subyacen a la producción vocal en canarios, registramos la presión de los sacos aéreos en tres individuos mientras realizaban el canto. Una vez que obtuvimos grabaciones simultáneas de presión y canto, seleccionamos sílabas repetidas dentro de frases que presentaran un número constante de máximos de presión. La razón para restringir nuestro análisis a estos patrones es que los patrones de presión en los canarios presentan una estructura más rica que una simple oscilación armónica. De hecho, se ha demostrado que poseen las mismas características topológicas que las de un sistema no lineal forzado periódicamente (L. M. Alonso, Alliende, Goller, & Mindlin, 2009; M A Trevisan, Mendez, & Mindlin, 2006). Por lo tanto, en algunos casos la variabilidad puede traducirse en la desaparición de un máximo en el gesto de presión. Al requerir que el número de máximos en un patrón de presión permanezca constante, determinamos que estamos explorando la vecindad de una región específica del espacio de parámetros. En la Figura 2.I, resumimos los métodos experimentales utilizados. Para cada ave, utilizamos grabaciones de presión y sonido del repertorio silábico completo, grabadas el mismo día. En cada una de estas grabaciones, las sílabas se caracterizaron en términos de frecuencia inicial, frecuencia final y frecuencia silábica. Para cada máximo de presión, seleccionamos una ventana temporal de 1024 puntos alrededor del tiempo del máximo y computamos la frecuencia fundamental. Luego para cada segmento analizado graficamos la frecuencia fundamental contra la presión máxima. Finalmente, para cada tipo de sílaba, usamos un análisis de regresión lineal para describir la relación entre presión máxima y frecuencia fundamental.

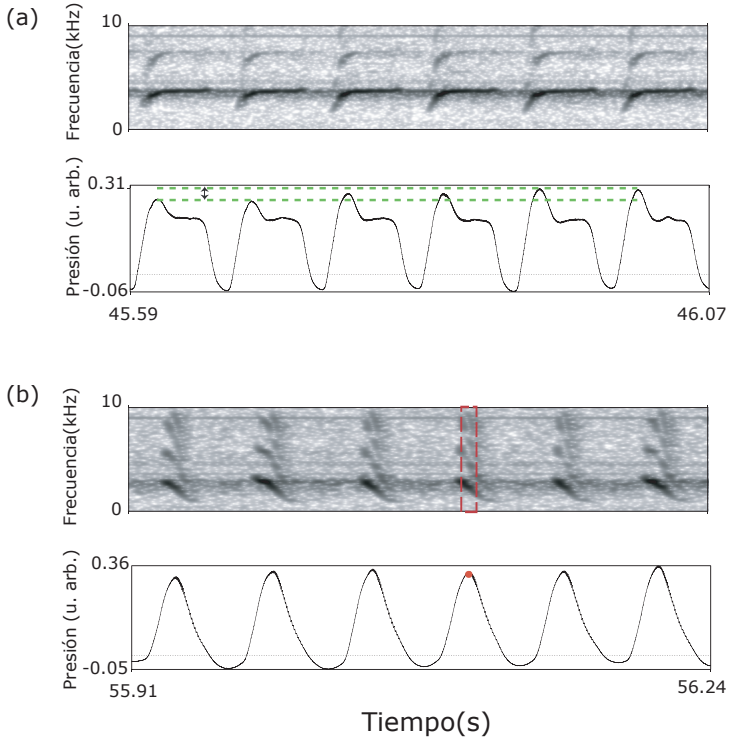


Figura 2.I. Ejemplos de datos experimentales de registros simultáneos de canto y presión en un canario doméstico (*Serinus canaria*). (a) (Primer panel) Sonograma de una sílaba de tipo P2. (Segundo panel) Gesto de presión de la sílaba correspondiente. Las líneas punteadas denota el rango en que pueden variar los máximos de presión. (b) Representación esquemática de los métodos experimentales. (Tercer panel) Sonograma de una sílaba de tipo P1. (Cuarto panel) Gesto de presión. El punto rojo indica un máximo de presión, el recuadro rojo muestra la ventana temporal en la cual se calculó la frecuencia fundamental (1024 puntos alrededor del tiempo en que se registra el máximo de presión).

Analizamos 1555 sílabas, correspondientes a 31 tipos de sílabas, producidas por tres pájaros. Los resultados se resumen en la Tabla 1. En la Figura 2.J, mostramos los resultados de los tres canarios.

Encontramos que, para las frecuencias altas, hubo una pendiente positiva sistemática en la relación entre la frecuencia fundamental y la presión máxima del saco aéreo, consistente con la signatura de las pendientes negativas de las curvas de isofrecuencia en esa región del espacio de parámetros (ver Figura 2.E(b)). En el Canario número 1 (Figura 2.J(a)), no hubo ningún tipo de sílaba que presentara un ajuste con una pendiente negativa significativa (5%). Lo mismo ocurre con el Canario 2 (Figura 2.J(b)), donde los dos tipos de sílabas con pendiente negativa corresponden a ajustes no significativos. En cambio, el Canario 3 (Figura 2.J(c)) presenta dos tipos de sílabas con regresiones lineales significativas de pendientes negativas, ambas de baja frecuencia fundamental.

Por otro lado, si inspeccionamos las isofrecuencias de la Figura 2.G podemos ver que, para frecuencias comparables, las pendientes pueden ser diferentes. Por ejemplo, a 4 kHz, encontramos pendientes negativas para $\beta < 2$, mientras que para valores mayores de β las pendientes son cercanas a cero. Las pendientes pueden ser positivas para valores pequeños de la frecuencia si los valores de β son lo suficientemente grandes (este es el caso de la isofrecuencia correspondiente a 2 kHz si β>0.5).

En relación a los datos experimentales, sólo una de las aves analizadas (Canario 1) presentó tanto sílabas de alta frecuencia y baja presión, así como una sílaba a baja frecuencia y alta presión, cubriendo una amplia gama de pendientes. Esto nos permite probar la hipótesis de que las pendientes se correlacionan positivamente con la presión promedio. En la Figura 2.K, mostramos para el Canario 1 las pendientes en función de la frecuencia promedio. Los valores de la regresión se describen en el pie de figura.

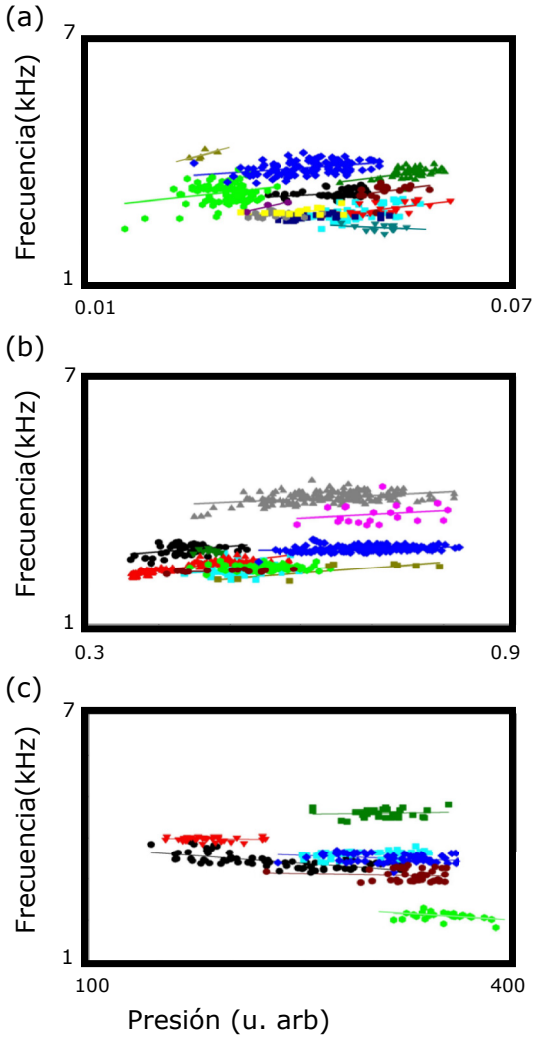


Figura 2.J: Resultados experimentales: Frecuencia Fundamental vs. Presión máxima. (a) Canario 1, (b) Canario 2 y (c) Canario 3. Los valores de las regresiones y los parámetros estadísticos se resumen en la Tabla 1.

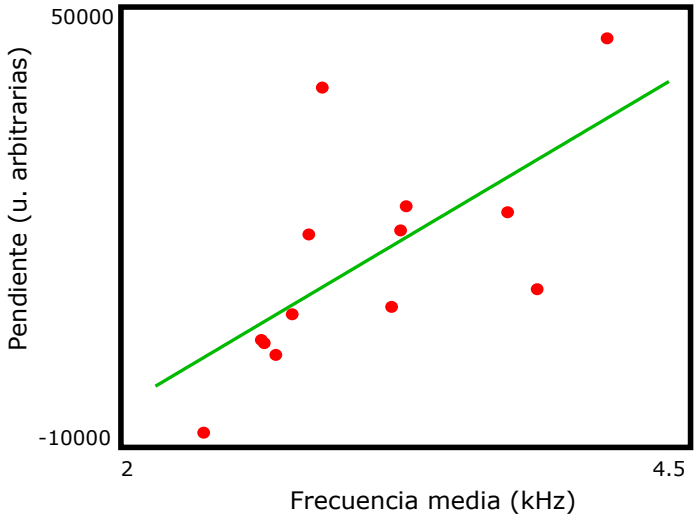


Figura 2.K: Correlación positiva entre pendiente y frecuencia promedio para las vocalizaciones del Canario 1. Los ejes verticales muestran las pendientes (frecuencia / presión) del ajuste lineal presentado en la Figura 2.J(a) (ver la Tabla 1 para más detalles). Ejes horizontales: frecuencia fundamental promedio de las sílabas. Cada punto rojo corresponde a una sílaba particular. La línea verde ilustra la regresión lineal. Parámetros de ajuste: f(x) = 18.42x - 41 304.8, R^2 = 0.4319.

En resumen, en el caso de vocalizaciones tonales como las de los canarios, se ha sugerido que los sonidos se generan cuando los labios comienzan a oscilar en una bifurcación de Hopf (Gardner et al., 2001; G B Mindlin et al., 2003; Gabriel B. Mindlin, 2017a). Hemos visto que un modelo simple de fonación con disipación no lineal y restitución no lineal se puede llevar a una forma normal de Hopf. Este análisis permite caracterizar las curvas de isofrecuencia en la vecindad de las bifurcaciones.

Para un amplio rango de κ, las curvas de isofrecuencia tienen pendientes negativas. Sin embargo, para valores finitos del parámetro β cerca de la bifurcación, y para valores de κ suficientemente bajos, las pendientes de isofrecuencia son positivas, lo que refleja la importancia relativa de los términos no lineales en el problema (véase la Figura 2.E).

Como las pendientes negativas (positivas) de las curvas de isofrecuencia implican pendientes positivas (negativas) en los ajustes de los gráficos de frecuencia fundamental vs. presión, concluimos que nuestros datos de los canarios son consistentes con un mecanismo de fonación no lineal en el que está presente una restitución no lineal.

Canario 1	Sílaba	Símbolo Color	Pendiente	Significancia	R^2	n
	1	Círculo negro	9140	0.0086	0.14	49
	2	Cuadrado cian	25094	<0.0001	0.35	61
	3	Triángulo rojo	19021	0.0003	0.44	25
	4	Hexágono verde claro	19553	0.0065	0.07	99
	5	Diamante azul	11784	<0.0001	0.15	101
	6	Triangulo verde oscuro	22047	<0.0006	0.24	45
	7	Hexágono rojo oscuro	22776	0.0556	0.13	19
	8	Cuadrado Azul oscuro	4790	0.0055	0.13	29
	9	Triángulo cian oscuro	-7991	0.36	0.07	14
	10	Hexágono gris	2608	0.74	0.01	14
	11	Triángulo amarillo oscuro	45633	0.23	0.43	5
	12	Hexágono violeta	39344	0.19	0.91	3
	13	Cuadrado azul	8151	0.095	0.17	17
Canario 2						
	1	Círculo negro	1359	0.0088	0.11	63
	2	Cuadrado cian	1040	0.163	0.05	39
	3	Triángulo rojo	2085	<0.0001	0.78	137
	4	Hexágono verde claro	-4.9	0.978	0	111
	5	Diamante azul	297.9	0.0008	0.06	174
	6	Triángulo verde oscuro	-513.4	0.7	0.02	11
	7	Círculo rojo oscuro	306.3	0.043	0.28	15
	8	Cuadrado amarillo oscuro	1368	0.0059	0.68	9
	9	Triángulo gris	814	<0.0001	0.18	159
	10	Hexágono rosa	921	0.33	0.05	21
Canario 3						
	1	Círculo negro	-2.5	<0.0001	0.45	71
	2	Cuadrado cian	1.42	0.0005	0.21	55
	3	Triángulo rojo	-0.21	0.66	0.006	33
	4	Hexágono verde claro	-1.83	0.0526	0.13	29
	5	Diamante azul	-1.14	0.011	0.1	64
	6	Cuadrado verde oscuro	0.44	0.6	0.008	34
	7	Diamante rojo oscuro	-0.53	0.61	0.006	43
	8	Triángulo verde oscuro	0.6	0.74	0.03	6

Tabla 1: Regresiones Lineales de datos experimentales de Presión máxima y Frecuencia Fundamental.

2.6 Consideraciones finales

Comenzamos este capítulo introduciendo de manera cualitativa el funcionamiento de la siringe de las aves oscinas. Esta descripción tiene grandes limitaciones a la hora de intentar comprender cómo interactúan distintos gestos fisiológicos para controlar algunas propiedades acústicas del

canto, como la frecuencia fundamental. Debido a esto avanzamos hacia una descripción cuantitativa de la biomecánica, proponiendo un modelo dinámico de baja dimensión capaz de describir el comportamiento de las membranas fonatorias en las aves oscinas. Este modelo tiene predicciones específicas acerca del rol de distintos parámetros fisiológicos en el control de propiedades acústicas del canto.

En primer lugar, estudiamos estas predicciones de manera teórica, calculando analíticamente las pendientes de las curvas de isofrecuencia (sección 2.3.1) y luego numéricamente, integrando para un amplio rango de parámetros las ecuaciones del modelo (Figura 2.E). Ambos modelos se diferencian sustancialmente de los propuestos originalmente por Goller y Suthers, ya que proponen que la frecuencia fundamental de las vocalizaciones emerge de la acción sinérgica de (al menos) dos parámetros fisiológicos: la tensión labial y la presión de los sacos aéreos. A su vez, las predicciones de cada uno de estos modelos difieren significativamente. En el modelo con restitución lineal ($\varepsilon=0$) las isofrecuencias nacen con pendiente nula y luego adquieren una pendiente positiva. En cambio, en el modelo con restitución no-lineal ($\varepsilon\neq0$) las isofrecuencias nacen con pendiente negativa y a medida que aumenta el parámetro β se vuelven positivas.

Ahora bien, para poder testear estas predicciones experimentalmente fue necesario, por un lado, realizar un conjunto de experimentos para medir la presión de los sacos aéreos (ver Apéndice 1) y por otro, "construir" un observable que permita develar la estructura de las isofrecuencias. Utilizando este observable pudimos construir confianza sobre la pertinencia del modelo con restitución no lineal, cuyas predicciones se correspondieron con los resultados experimentales obtenidos (Figura 2.J y Figura 2.K, Tabla 1).

En su conjunto, lo expuesto hasta aquí muestra cómo a partir de la interacción entre el modelado teórico y la experimentación podemos estudiar procesos biológicos complejos dónde distintos parámetros fisiológicos interactúan de manera no-trivial. Este abordaje es interdisciplinario por naturaleza y, como veremos en los próximos capítulos, puede ser implementado para estudiar problemas biológicos en distintas escalas como, por ejemplo, en el estudio de circuitos neuronales involucrados en la producción vocal.

SISTEMA NERVIOSO

Independientemente de la historia evolutiva de cada especie, todos los vertebrados comparten una organización general del cerebro que consta de cinco regiones básicas: (i) la médula espinal dentro de la columna vertebral, (ii) el rombencéfalo enfrente de ella, (iii) el mesencéfalo, (iv) el tálamo y (v) el cerebro anterior, con el cerebelo ubicado en la parte superior del rombencéfalo (P. Marler & Slabbekoorn, 2004). A su vez, en lo que se refiere a la lógica de codificación de la información, y a pesar de las obvias diferencias en cuanto a capacidades cognitivas, todos ellos poseen un plan de conectividad básica común. La información sensorial tanto del mundo exterior como la información propioceptiva, viaja *rio arriba* desde las células sensoriales hacia la médula espinal y el tallo cerebral hasta el cerebro anterior, donde esta información es procesada. En contraparte, las neuronas que comandan el movimiento forman una red cuya información es transmitida en el sentido opuesto ("*rio abajo*")(P. Marler & Slabbekoorn, 2004).

Estos vínculos, así como tantos otros, permiten conocer características que son transversales a varios grupos evolutivos (Goldman & Nottebohm, 1983; Yartsev, 2017). La biología, y la neuroetología en particular, se nutre de esta propiedad de la naturaleza para el estudio del comportamiento animal (Yartsev, 2017).

En este sentido, las aves ofrecen una gran ventaja para quienes estudiamos control motor dado que en todas estas estructuras las neuronas se encuentran agrupadas formando núcleos anatómicamente distinguibles (Nottebohm, Stokes, & Leonard, 1976). Esto permitió realizar un mapa de conectividad que sirve como "hoja de ruta" para entender la funcionalidad de los distintos circuitos y cómo estos interactúan para llevar adelante un programa motor complejo y aprendido, como es el canto.

El sistema del Canto

En los años 70s, los trabajos de Fernando Nottebohm y colaboradores comenzaron a develar la compleja red de núcleos neuronales involucrados en la producción vocal (Nottebohm et al., 1976). Desde ese entonces (y sostenidamente en el tiempo) se han producido descubrimientos fascinantes en cuanto a estructura, función y evolución del cerebro de las aves.

2.7 Descripción Anatómica

En lo que respecta a la anatomía podemos distinguir tres circuitos involucrados en la producción vocal en las aves oscinas: la **Vía Auditiva**, la **Vía Motora** y el **circuito AFP** (de las siglas *Anterior Forebrain Pathway*). En la Figura 0.A se muestra un esquema de la sección sagital de un cerebro oscino junto con los núcleos que forman parte de los distintos circuitos.

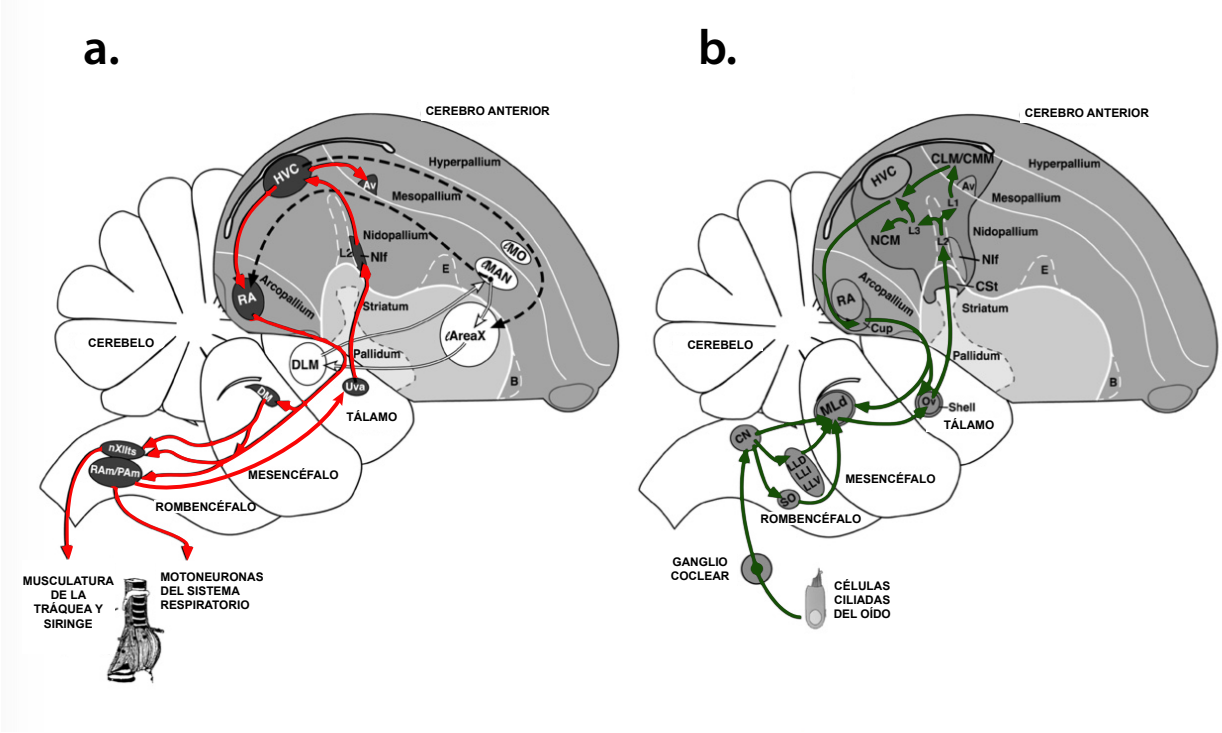


Figura 0.A: Esquema de sección sagital de cerebro de un ave oscina. (a.) Las flechas rojas marcan las conexiones entre los núcleos involucrados en el control motor (vía motora). Las flechas blancas corresponden al circuito AFP. Las líneas punteadas muestran las conexiones entre ambos circuitos. (b.) Las flechas verdes denotan las conexiones entre los núcleos involucrados en la audición (vía Auditiva). Adaptado de (Reiner, Perkel, Mello, & Jarvis, 2004).

2.7.1 El circuito AFP

Este circuito está asociado al aprendizaje vocal. Está integrado por los núcleos Área X y el núcleo *Magnocelular del Nidopallium Anterior* o MAN del telencéfalo (ubicado en el cerebro

anterior), y por el núcleo *dorsolateral de la porción medial de Tálamo* o DLM, ubicado en el Tálamo.

El circuito tiene por un lado una organización cíclica dónde la información circula en el sentido MAN - Área X - DLM – MAN (Figura 0.A- flechas blancas). Por otro lado, proyecta sobre el circuito de la Vía Motora. Este vínculo se da por medio de una vía aferente, con proyecciones que van desde lMAN (porción lateral de MAN) a RA (*núcleo Robusto del Arcopallium*), y por una vía eferente que recibe sinapsis del núcleo HVC (utilizado como nombre propio) hacia el Área X (Reiner et al., 2004) (Figura 0.A- flechas punteadas).

El vínculo con el aprendizaje vocal se describió a partir de lesiones bilaterales en distintos núcleos en aves juveniles y adultas. En estos estudios se observó que independientemente de la edad, las aves podían cantar algunas de las vocalizaciones ya adquiridas pero que el proceso de aprendizaje se veía interrumpido (P. Marler & Slabbekoorn, 2004; Nottebohm et al., 1976).

Por ejemplo, al lesionar la porción lateral del núcleo Área X (*l*Area X) durante el periodo sensitivo del aprendizaje en diamantes mandarines, observaron que las aves mantenían el *canto plástico*. Por otro lado, al lesionar la porción lateral de MAN (*l*MAN), el canto se volvía estereotipado rápidamente, y las aves no conseguían aprender nuevos cantos. Si, por el contrario, se lesionaba *l*MAN o *l*AreaX en aves adultas, el canto ya adquirido no se veía alterado (P. Marler & Slabbekoorn, 2004).

2.7.2 Vía Motora

Como su nombre lo indica esta vía es la encargada de generar y coordinar los distintos gestos motores que actúan sobre la musculatura de la periferia para producir las distintas vocalizaciones, ya sean aprendidas o innatas. Los experimentos fundacionales del área sobre los núcleos de la vía motora han sido concluyentes respecto al rol de los mismos. En estos estudios, se realizaron lesiones bilaterales (es decir, en ambos hemisferios) en diversos núcleos que hoy conforman la vía motora y luego se analizó el impacto de estas lesiones en la producción vocal.

Brevemente, cuando se lesionó tanto HVC como RA, las aves fueron incapaces de producir las vocalizaciones aprendidas (Nottebohm et al., 1976). Cuando se lesionó Uva (núcleo *Uvaeforme*) o NIf (*Núcleo Interfacial del Nidopalium*), las aves lograron vocalizar varias de las sílabas aprendidas pero el orden (o sintaxis) se veía modificada (H. Williams & Vicario, 1993). Por último, luego de las lesiones en núcleos del DM (*núcleo Dorsomedial*) y en nXII (*núcleo XII*), las aves perdieron completamente la capacidad de vocalizar (Nottebohm et al., 1976). Estos experimentos muestran que existe una diferencia en la organización de los núcleos; algunos de ellos están involucrados en la generación de vocalizaciones innatas y otro subgrupo es responsable de las vocalizaciones aprendidas. En particular, las vocalizaciones innatas

podrían ser procesadas sólo por estructuras basales mientras que las aprendidas requieren de la acción de la mayoría de los núcleos de la vía motora.

En la Figura 0.A se muestran en rojo las conexiones de los distintos núcleos de esta vía.

2.7.3 Vía Auditiva

El procesamiento del sonido comienza en las células ciliadas del oído (o *hair cells*) dónde los estímulos sonoros son traducidos a señales eléctricas. Las células ciliadas están organizadas formando un mapa tonotópico a lo largo del epitelio sensorial de la cóclea (Hudspeth, 1997) y proyectan hacia núcleos sensoriales del rombencéfalo (*CN* y *LL*).

Luego la información se transmite, con distinto grado de procesamiento, a través de distintos núcleos en el mesencéfalo (*MLd*), del tálamo (*Ov*), hasta el telencéfalo (*L1, L2,L3,* llamado en conjunto *Field L*) (Reiner et al., 2004). *Field L* inerva otros núcleos auditivos y actúa como *entrada* a los circuitos del sistema del canto a través de la inervación a HVC (Kelley & Nottebohm, 1979).

2.7.4 Un vínculo entre los Circuitos: *Selectividad al canto propio*

De todos los núcleos involucrados en alguno de los tres circuitos, HVC ha sido seguramente el más estudiado. Los motivos son varios. Por un lado, su posición en el cerebro es muy accesible; está situado en el extremo superior del telencéfalo y tiene gran tamaño, por lo que resulta ideal para realizar registros electrofisiológicos. Por otro lado, y quizás la razón más importante, HVC forma parte de los tres circuitos (Kelley & Nottebohm, 1979; Nottebohm et al., 1976; Reiner et al., 2004; Stokes, Leonard, & Nottebohm, 1974). En este sitio converge la información auditiva con las representaciones motoras del canto. En efecto, sus neuronas tienen actividad motora asociada a la producción del canto y a su vez, su actividad puede ser licitada por estímulos auditivos de su propio canto (o BOS del inglés Bird's Own Song) (Margoliash, 1986; McCasland & Konishi, 1981; Yu & Margoliash, 1996). Esta *selectividad al canto propio*, emerge durante el aprendizaje y se mantiene durante la adultez (Nick & Konishi, 2005; Solis & Doupe, 1997). Más aún, se ha observado que las neuronas de HVC tienen los mismos patrones de actividad cuando el ave está cantando y o escuchando su propio canto (Prather, Peters, Nowicki, & Mooney, 2008).

Debido a todas estas propiedades, algunas compartidas con otros núcleos de la vía motora, HVC se ha convertido en el núcleo preferido para estudiar la integración *sensorimotora* (Ana Amador, Boari, & Mindlin, 2017). Finalmente, he de destacar otra singularidad de gran importancia para el desarrollo de esta tesis: la selectividad al canto propio en el núcleo HVC se observa también en animales anestesiados (Margoliash, 1986).

2.8 Fisiología

Esta sección describe el funcionamiento de la Vía Motora asociado al control de las vocalizaciones. Para ello, en la sección anterior, hemos mencionado los distintos núcleos que participan de este comportamiento; Una red que ha sido caracterizada en los años 70 y de la cual hemos aprendido mucho mediante lesiones bilaterales en los distintos núcleos y la posterior pérdida de ciertas características del canto.

Sin embargo, entender el código por el cual estos núcleos generan los patrones motores necesarios para vocalizar, requiere de procedimientos experimentales más sofisticados. Debido a esto, el conocimiento en este tema se ha nutrido del desarrollo de novedosas técnicas experimentales que fueron aplicadas, en primer lugar, en los núcleos del telencéfalo. Esto ha generado un sesgo en la interpretación de los datos, asignando jerarquías en el funcionamiento de la Vía Motora. Con todo, si bien existe un modelo bastante establecido, su veracidad y precisión está aún en discusión.

A continuación, haré una reseña acerca del modelo *más establecido* con sus virtudes y debilidades. Luego, continuaré por proponer un tipo de modelado de la actividad neuronal y discutir su pertinencia para este problema en particular, y para finalizar, describiré un modelo alternativo con sus predicciones y algunos datos experimentales que lo soportan.

2.8.1 Modelo del reloj

El modelo del reloj fue desarrollado fundamentalmente a partir de observaciones hechas en Diamantes Mandarines (*Taeniopygia guttata*). La construcción del modelo en cuestión se valió de dos grandes innovaciones experimentales: el desarrollo de micromotores para realizar mediciones crónicas de actividad de neuronas individuales (*single-units*) en aves cantando, y el enfriamiento localizado de núcleos (*cooling*), en particular en HVC y RA. Ambas técnicas fueron desarrolladas y utilizadas en primer lugar sobre el núcleo HVC, lo cual ha generado una tendencia a asignarle un rol fundamental al mismo.

Los registros de neurona única en HVC revelaron que, en el canto de los Diamantes Mandarines, las neuronas que proyectaban a RA disparaban *ráfagas* (burst) de actividad de manera estereotipada, temporalmente asociados a motivos. Estas neuronas se encontraban activas sólo una vez durante el canto y sin *relación aparente con características acústicas y/o motoras*. En la Figura 0.B(a) se muestra un ejemplo de estas mediciones.

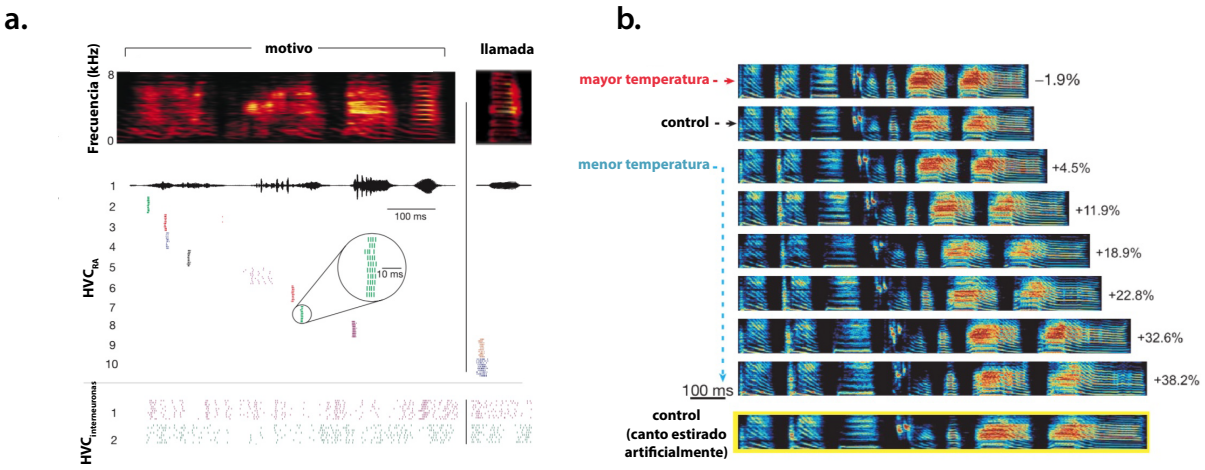


Figura 0.B: Experimentos fundacionales del Modelo del Reloj. (a) Actividad de neuronas únicas del núcleo HVC en Diamantes mandarines cantando. El esquema superior muestra un sonograma del canto. Debajo se muestra el sonido (presión acústica) y luego los spikes de distintas neuronas de HVC que proyectan a RA ($HVC_{(RA)}$) e interneuronas (HVC inter), alineadas con el canto. Extraído de Hahnloser, Kozhevnikov, & Fee, 2002. (b) Experimentos de enfriamiento en HVC. Se muestran sonogramas representativos del canto de un individuo para distintas condiciones en las cuales se manipula la temperatura de HVC. Extraído de (Long & Fee, 2008).

La actividad registrada en HVC, los llevó a hipotetizar que este núcleo actuaba como un Reloj, generando con cada *ráfaga* una representación rala del tiempo sobre el núcleo RA y los subsiguientes núcleos *rio abajo* en la vía motora (Fee, Kozhevnikov, & Hahnloser, 2004).

Tiempo después, Long y colaboradores desarrollaron la técnica de *enfriamiento*. Nuevamente, realizaron sus experimentos en Diamantes mandarines, manipulando la temperatura del núcleo HVC. La racionalidad de este experimento residía en que, si HVC controlaba todas las escalas temporales del canto, enfriar este núcleo implicaría que el canto ocurriera más lento. En efecto, eso fue lo que observaron (Figura 0.B(b)): al enfriar HVC bilateralmente, el canto se estiraba. A su vez, si lo calentaban ligeramente, el canto se aceleraba. Estos resultados le dieron soporte al Modelo del Reloj, ya que las observaciones eran congruentes con las predicciones del modelo (Long & Fee, 2008).

Resumidamente, el modelo postula que existe una jerarquía establecida entre los distintos núcleos involucrados en el control motor. En este modelo, HVC actúa como un reloj cuya unidad de tiempo está dada por disparos de sus neuronas proyectoras a RA cada 10ms. Luego, en RA se activarían ciertos circuitos que finalmente van a proyectar hacia los núcleo del rombencéfalo para inervar a los músculos de la periferia (Fee et al., 2004; Hahnloser et al., 2002b; Troyer, 2013).

Este enfoque de arriba hacia abajo del control motor, es coherente con una mirada tradicional de la neurociencia, dónde se considera al cerebro (y más precisamente al telencéfalo) como un especie de "director de orquesta", dejando a la periferia el rol de ejecutar sus comandos para producir la "pieza musical". En la Figura 0.C, se muestra una representación conceptual de este modelo.

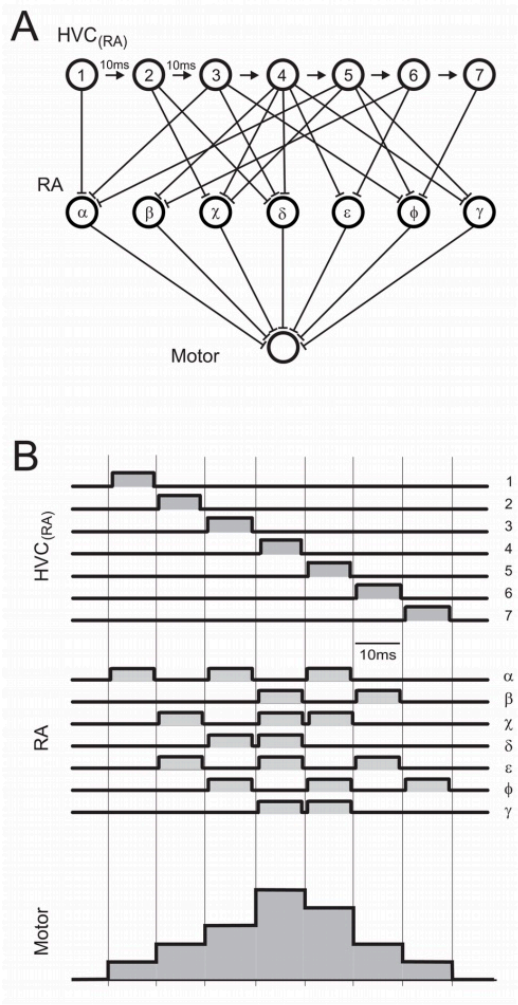


Figura 0.C: Modelo del reloj. (A) Cada neurona HVC(RA) dispara por única vez durante el motivo, activando a una serie de neuronas en el núcleo RA (aproximadamente un 10% de las neuronas de RA). Luego esta actividad converge en un patrón motor. (B) Una representación de los patrones de actividad durante la generación de un tipo de sílaba en particular (arbitraria). Extraído de (Fee et al., 2004)

2.8.2 Evidencias y modelos alternativos

Con el correr de los años fueron surgiendo evidencias experimentales que irían en contra del Modelo del Reloj. Muchos de estos experimentos involucraron la utilización de las mismas tecnologías de medición/manipulación de la actividad de HVC, pero utilizada en otros núcleos o en otras especies de oscinos.

Por ejemplo, en los experimentos de Schmidt y colaboradores se utilizaron electrodos de baja impedancia para medir actividad de varias neuronas (*multi-unit*) de HVC en ambos hemisferios mientras las aves cantaban. En estos estudios, encontraron que la actividad de HVC no sólo se encontraba altamente sincronizada en ambos hemisferios, sino que estaba temporalmente asociada al comienzo de sílabas y a los silencios entre sílabas (M. F. Schmidt, 2003) (Figura 0.D).

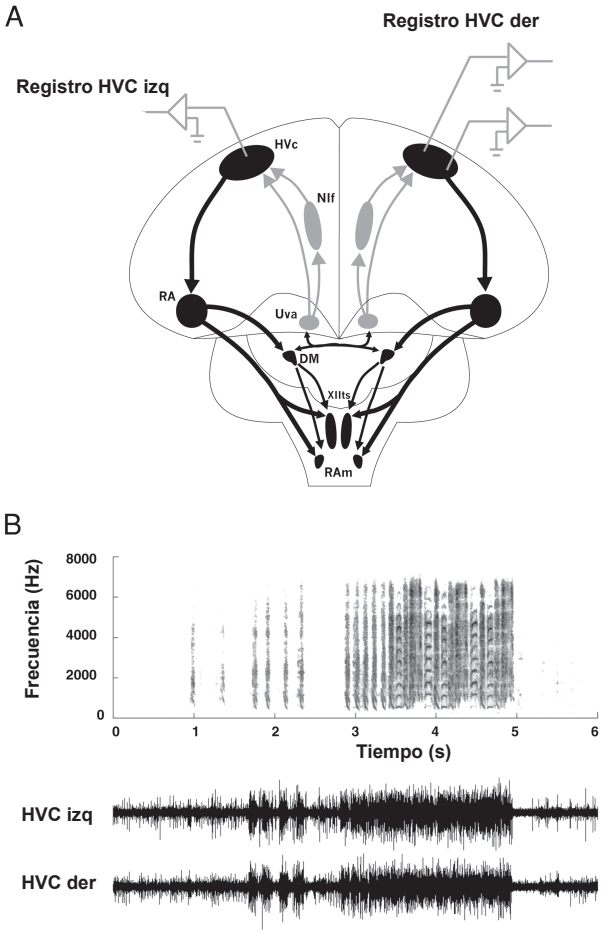


Figura 0.D: Sincronización en HVC en Diamantes Mandarines. (A) Esquema de (parte) del circuito de la Vía Motora. (B) Sonograma del canto de un Diamante Mandarín. Debajo, registro de actividad de varias neuronas (multi-units) en HVC bilateral, en Diamantes Mandarines cantando. Extraído de (M. F. Schmidt, 2003).

Esto se diferencia del modelo del reloj en dos cuestiones: 1) Se observan heterogeneidades en los patrones de actividad en HVC, asociados a transiciones acústicas, y 2) Muestran sincronización entre ambos núcleos lo cual, dado que HVC no proyecta de manera directa a su contraparte en el otro hemisferio, requiere que la sincronización deba producirse por *entradas* comunes a HVC.

Tiempo después, Schmidt y colaboradores encontraron que esta sincronización interhemisférica se produce a partir de una ruta ascendente que va de núcleos del rombencéfalo y mesencéfalo (en particular Pam y DM), a través del núcleo talámico Uva, hacia el núcleo HVC contralateral (Ashmore, 2005; Ashmore, Renk, & Schmidt, 2008; M. F. Schmidt, 2003; Marc F. Schmidt, 2008). En su conjunto, estos trabajos proponen una mirada dónde la periferia interviene en el control motor de las vocalizaciones, lo cual se contrapone con el modelo del reloj.

Asimismo, en relación a la primera observación, los trabajos de Amador y colaboradores profundizaron sobre la idea de la existencia de heterogeneidades en HVC. En estos trabajos se realizaron mediciones crónicas de actividad tipo *single-units* (neurona única) en HVC en Diamantes Mandarines tanto en aves comportándose como en aves dormidas, donde se evaluó la *respuesta selectiva al canto propio* (Ana Amador, Perl, Mindlin, & Margoliash, 2013). La ventaja de poder hacer este experimento en ambas condiciones es que ahora podían registrar la actividad mientras el ave cantaba y compararla con la *selectividad* asociada a estímulos auditivos. Estos estímulos fueron el canto propio del animal y una versión sintética del mismo, producida con *modelos biomecánicos del aparato vocal* (como los que se detallan en la sección 2.3).

En este trabajo, los investigadores observaron que las aves respondían al *canto sintético* con aproximadamente la misma intensidad que al canto propio (Ana Amador et al., 2013). Esto fue un resultado novedoso, ya que se trataba de una validación experimental al modelado dinámico de la periferia. Por otro lado, dado que estos modelos se construyen a partir de parámetros dinámicos, en particular de la presión de los sacos aéreos y la tensión de los músculos siríngeos, pudieron interpretar las heterogeneidades de los patrones de actividad neuronal en términos de estos gestos motores. De hecho observaron que las neuronas proyectoras se excitaban y las interneuronas eran suprimidas a unos pocos milisegundos de un *extremo de la trayectoria de los gestos motores (GTEs)* (Ana Amador et al., 2013).

En la Figura 0.E se muestran dos ejemplos extraídos del trabajo de Amador y colaboradores. En ellos se muestran los cantos sintéticos generados a partir de modelo biomecánico, alimentado por gestos motores, junto con la actividad de neuronas proyectoras o interneuronas. Como se puede ver en la figura los disparos de las neuronas proyectoras y los mínimos de la actividad de interneuronas se encuentran alineados con instancias significativas de los gestos motores (máximos, mínimos o transiciones).

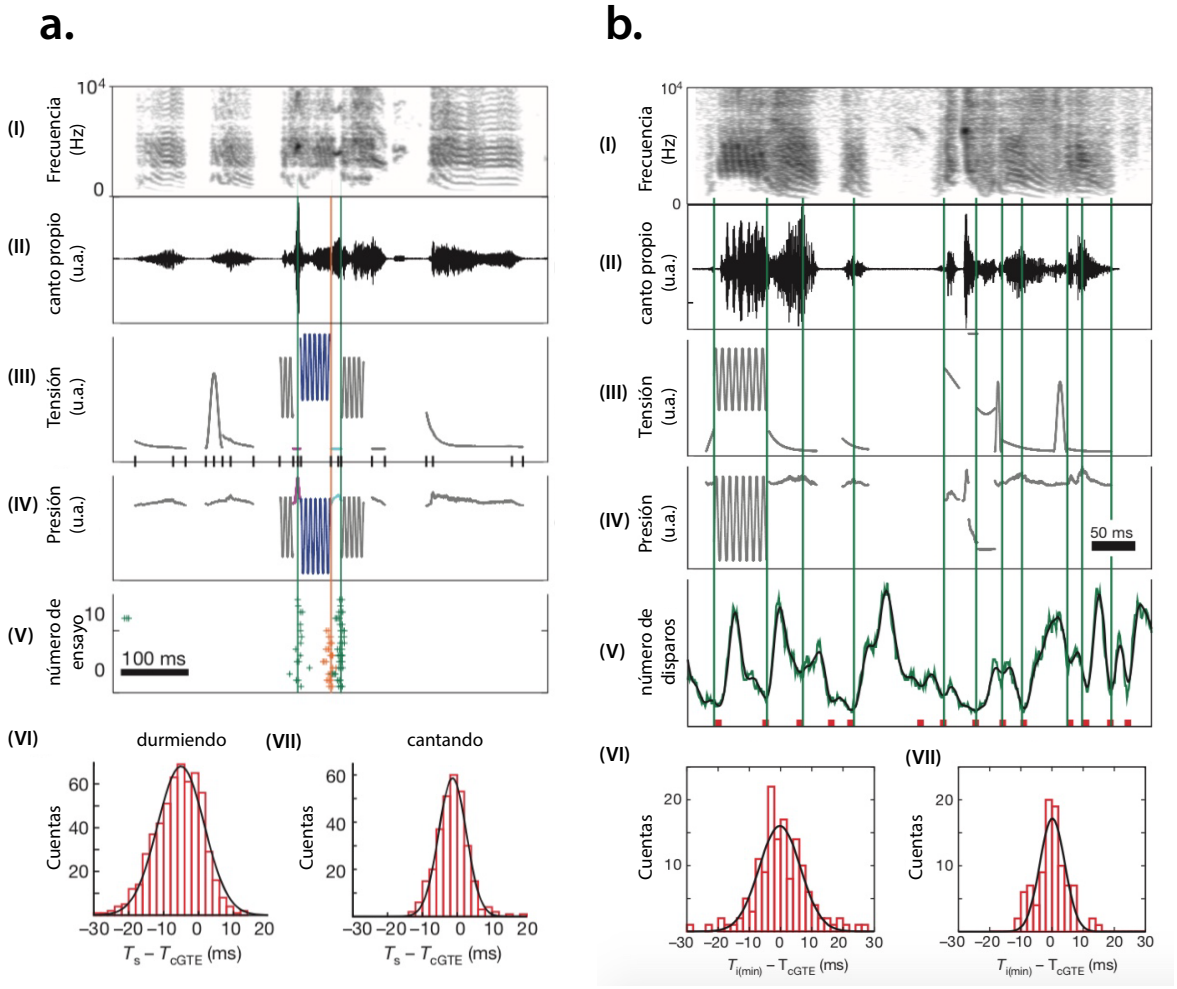


Figura 0.E: Actividad de Neuronas Proyectoras e Interneuronas y su relación con los gestos motores. (a.) Paneles superiores, sonograma (I) y oscilograma de canto sintético (II) de Diamante mandarín. (III y IV) Gestos motores utilizados para generar el canto sintétic; tensión y presión respectivamente. (V) *Raster plots* de la actividad de neuronas proyectoras. Cada cruz corresponde a un tren de disparos, los colores indican neuronas distintas. Las lineas verticales marcan los GTEs (*extremos de la trayectoria de los gestos motores*) en los que disparan estas células. (VI) Distribución de diferencias de tiempo entre cada disparo (*Ts*) y el tiempo del GTE más cercano (TcGTE) (*n=14 HVC_p*, 5 aves). (VII) Mismo análisis, pero para aves cantando (*n=5 HVC_p*, 2 aves). (b.) Sonograma (I), oscilograma (II) y gestos motores (III y IV), idem panel (a). (V) Número de disparos para una interneurona HVC_i (Bin de 10ms, 20 repeticiones; línea verde), suavizada. Los cuadrados rojos indican los mínimos de las interneuronas y las líneas verticales la posición del GTE más cercano. (VI) Distribución de diferencias de tiempo entre cada mínimo ($T_{i(min)}$) y el tiempo del GTE más cercano (TcGTE) (*n=15 HVC_i*, 5 pájaros). (VII) Mismo análisis, pero para aves cantando (*n=10 HVC_i*, 3 aves). Extraído de (Ana Amador et al., 2013).

Esta heterogeneidad observada por Amador y colaboradores, además de cuestionar la hipótesis de que HVC dispara uniformemente, cuestiona el rol premotor de HVC. De hecho, en el modelo del reloj se propone que los disparos en HVC controlan la generación de los gestos motores (Figura 0.C), por lo que se requiere que exista un retraso (*delay*) entre la actividad de HVC y el gesto motor (Fee et al., 2004; Troyer, 2013), lo cual es incompatible con lo observado por Amador et al, 2013.

Otro cuestionamiento al modelo vino de revisitar los experimentos de *enfriamiento*, ya que se observó que si el tempo de la canción fuera controlado por una cadena de disparos en HVC, el enfriamiento local del núcleo debería haber causado un mayor estiramiento que el observado experimentalmente (Hamaguchi, Tanaka, & Mooney, 2016). A su vez, al enfriar el núcleo Uva el *tempo* también se hace más lento (Hamaguchi et al., 2016), lo cual es compatible con un escenario dónde el control de los tiempos se da de manera distribuida entre distintos núcleos de la vía motora y no está sólo codificado por la actividad de HVC (Ana Amador et al., 2017).

En esta dirección, en el Laboratorio de Sistemas Dinámicos, se aplicó la técnica de enfriamiento local del núcleo HVC, pero en canarios domésticos (*Serinus canaria*). Estos experimentos mostraron que al enfriar HVC, el *tempo* de la canción se enlentece a medida que disminuye la temperatura hasta un valor crítico a partir del cual el canto sufre cambios cualitativos como el rompimiento de ciertas sílabas (Goldin et al., 2013). Como he mencionado anteriormente (sección 2.4), los canarios tienen gestos motores simples que repiten varias veces formando frases. En particular, los gestos de presión pueden ser clasificados en 4 categorías con topologías diferentes (Marcos A. Trevisan et al., 2006). Sorprendentemente, los experimentos de *enfriamiento* mostraron que a partir de un valor crítico de temperatura, se produce un rompimiento de las sílabas (y del gesto de presión) preferentemente en sílabas de tipo P2 y P0 (Goldin et al., 2013).

En resumen, estos experimentos ponen en evidencia algunas falencias del *modelo del reloj*. No obstante, ninguno de los trabajos anteriormente mencionados propone un modelo operacional capaz de reproducir los datos fisiológicos recopilados. Esto nos llevó a construir un modelo computacional que represente la actividad de los distintos núcleos involucrados en la producción vocal cuyas predicciones fueran compatibles con las observaciones anteriormente mencionadas.

Con esta motivación en mente describiré a continuación, cómo construir un modelo computacional cuyas variables representen la actividad media de distintos núcleos involucrados en la producción vocal, capaz de reproducir los distintos gestos de presión de canarios. La importancia de este modelo es que, por un lado, refleja una conectividad integrada dónde los núcleos del tronco cerebral interactúan con los núcleos telencefálicos
para dar lugar a los distintos gestos motores (Ashmore et al., 2008; M. F. Schmidt, 2003; Marc

F. Schmidt, Ashmore, & Vu, 2004) . Por otro lado, retoma la idea de la existencia de heterogeneidades en la actividad de HVC, permite tener simultaneidad entre HVC y las transiciones de gestos motores (Ana Amador et al., 2013) y reproduce los patrones de rompimiento de los gestos de presión al enfriar HVC (Goldin et al., 2013).

2.9 ¿Cómo podemos modelar la actividad neuronal?

En primer lugar, he de notar que la *filosofía* detrás de esta pregunta implica que a pesar de la enorme complejidad del cerebro existen mecanismos dinámicos que describen propiedades generales del cerebro. Por ejemplo, se ha estimado que el cerebro humano tiene del orden de 10^{11} neuronas cuyos axones cubren una distancia de unos 10000km (Murre & Sturdy, 1995); En una neurona pueden converger estímulos de muchas otras, y a su vez, algunas neuronas mandan información a otras tantas (divergencia) (Hoppensteadt & Izhikevich, 1997); Existen distintos tipos de neuronas, con morfologías completamente diferentes (Cajal, 1995), y también con funcionamientos disímiles. Algunas están funcionalmente polarizadas e integran la información que reciben a través de las dendritas, la procesan en el soma y responden a esos estímulos a través de potenciales de acción que viajan por sus axones. Así como también hay neuronas que carecen de dendritas o axones, o que no generan potenciales de acción.

Sin embargo, a pesar de esta enorme complejidad, el cerebro es también un sistema redundante y robusto (Aerts, Fias, Caeyenberghs, & Marinazzo, 2016; Alstott, Breakspear, Hagmann, Cammoun, & Sporns, 2009); Con propiedades que son transversales a distintos organismos como por ejemplo, la existencia de ritmos neuronales (Buzsáki & Watson, 2012), o los mecanismos de plasticidad neuronal que subyacen a los procesos de aprendizaje (M. A. Lynch, 2004). Son este tipo de propiedades generales las que permiten construir modelos de actividad neuronal. Aunque, la elección de qué características del sistema debemos tener en cuenta y qué detalles podremos obviar, no es trivial.

El modelado matemático propone una metodología para entender los distintos procesos que ocurren en la naturaleza y así pasar de las meras descripciones a modelos predictivos con observables, que puedan testearse experimentalmente. Aunque no existe una separación estricta entre los distintos tipos de modelos, en general podremos distinguir entre *modelos empíricos o fenomenológicos* y *modelos detallados o exhaustivos*.

En los últimos, se intenta realizar una caracterización rigurosa de un proceso, utilizando toda la información neurofisiológica disponible. Las predicciones de estos modelos suelen ser muy precisas. No obstante, cuanto más se caracteriza el sistema, más sofisticado y matemáticamente complejo se volverá el modelo (Hoppensteadt & Izhikevich, 1997). Los modelos empíricos, por su parte, intentan reflejar un puñado de características neurofisiológicas relevantes para el

problema en cuestión. Suelen estar motivados por observaciones empíricas y, a diferencia de los modelos detallados, intentan ser lo más simples posibles (Hoppensteadt & Izhikevich, 1997).

En el marco de esta tesis utilizaremos modelos fenomenológicos para describir el funcionamiento de la vía motora en el control de las vocalizaciones de aves oscinas. Las predicciones de estos modelos serán las actividades medias de distintos núcleos, algunas de las cuales se traducirán en gestos motores que actúan sobre el sistema periférico.

2.9.1.1 Primeros Principios vs. Fenomenología

La escala desde la cual se pueden describir los procesos es otra cuestión que debe analizarse antes de construir un modelo. Un camino posible es construir modelos de variables microscópicas, como ser la dinámica de las corrientes iónicas involucradas en la generación de un potencial de acción (Hodgkin & Huxley, 1952). O, en el otro extremo, los modelos de variables macroscópicas como los de actividad neuronal de larga escala, que describen la actividad colectiva de millones de neuronas (Breakspear, 2017).

Ahora bien, es evidente que la actividad macroscópica que registramos por resonancia magnética funcional (fMRI) o electroencefalogramas (EEG), emerge de los potenciales eléctricos de neuronas individuales. Sin embargo, aún falta un camino analítico para derivar modelos de actividad colectiva desde los potenciales de neuronas individuales.

A pesar de avances recientes en teorías de campo medio (L. M. Alonso et al., 2009; Ott & Antonsen, 2008; Roulet & Mindlin, 2016), aún no existe una teoría que dé cuenta de la mecánica estadística de los sistemas fuera del equilibrio. Esto afecta particularmente a la neuroetología, cuyo objetivo es entender cuáles son las bases neurofisiológicas subyacentes al comportamiento animal. El cual es producto de la actividad colectiva de miles de neuronas y de su interacción con la biomecánica periférica y el ambiente.

El desafío es entonces, construir modelos empíricos de actividad media de muchas neuronas, cuyas predicciones puedan ser testeadas experimentalmente, quedando a la espera del desarrollo de una teoría que permita ir desde *primeros principios* a la *fenomenología*.

2.9.2 Modelos Aditivos de Redes Neuronales

Los modelos neuronales propuestos en esta tesis fueron construidos a partir de *"bloques"*. Cada uno de estos bloques representa la actividad promedio de una población de neuronas, expresada matemáticamente de la siguiente manera:

$$\dot{\boldsymbol{x}}_{\boldsymbol{i}} = -\boldsymbol{x}_{\boldsymbol{i}} + \boldsymbol{S}\left(\boldsymbol{\rho}_{\boldsymbol{i}} + \sum_{\boldsymbol{j}=\boldsymbol{1}}^{\boldsymbol{n}} \boldsymbol{c}_{\boldsymbol{ij}}\, \boldsymbol{x}_{\boldsymbol{j}}\right),\ \boldsymbol{x}_{\boldsymbol{i}} \in \mathbb{R},\ \boldsymbol{i} = \boldsymbol{1}, \dots, \boldsymbol{n}, \quad (1)$$

$\dot{x}_i$ representa la tasa de variación temporal de la actividad promedio de la i-ésima población de neuronas (cantidad promedio de disparos) en el tiempo ($\dot{x}_i = \frac{dx_i}{dt}$); ρ_i denota el input externo

que recibe el núcleo en cuestión; los coeficientes c_{ij} describen el peso de las sinapsis que recibe del núcleo *j*-ésimo. La función de saturación *S*, es una función sigmoidea con la forma:

$$S(y) = \frac{1}{1+e^{-y}} \qquad (2)$$

Esta función tiende a 0 cuando $y \to -\infty$ y cuando $y \to +\infty$ la función tiende a 1. De esta manera, si el argumento de la función *S* es positivo, $\dot{x}_i$ aumenta. Contrariamente, si el argumento es negativo, $\dot{x}_i$ disminuye (Hoppensteadt & Izhikevich, 1997).

Ahora bien, ¿cual es el *vínculo fenomenológico* de estas ecuaciones dinámicas con la actividad real de un grupo de neuronas? Intentaré dar una respuesta intuitiva primero.

Cuando una neurona recibe una entrada (o input) excitatoria lo suficientemente potente (*supra umbral*), ocurre una depolarización y se produce un potencial de acción (o un tren de potenciales de acción) que viaja hacia los axones terminales. Si, por el contrario, la entrada no es lo suficientemente fuerte (*sub umbral*), la excitación no logra superar el umbral de disparo y el potencial decae. Por otro lado, si recibe un estímulo inhibitorio, la neurona se hyperpolariza e impide que se produzcan potenciales de acción.

Esta caracterización, que es sin dudas incompleta y en algunos casos falsa, ilustra una propiedad ubicua en el sistema nervioso: la existencia de neuronas excitatorias e inhibitorias, cuya comunicación se da mediante un código binario de la presencia o ausencia de disparos. Esta es una de las propiedades fenomenológicas que ilustran estos modelos aditivos.

Formalmente, la dinámica de estas poblaciones está regida por las soluciones estacionarias del sistema (*puntos fijos*) en las cuales los valores de *x* (presencia/ausencia de disparos) se mantienen constantes, es decir dónde $\dot{x} = 0$. Si describimos esto para una población particular, tendremos

$$x = S(\rho + cx) \quad \textbf{(3)}$$

Notamos que existen un conjunto de valores de *x, ρ y c* para los cuales se cumple esta igualdad. Si consideramos que *x* está acotada entre 0 y 1 (ausencia o presencia de disparos) y fijamos $c \neq 0$, podemos analizar qué sucede al variar ρ.

Si $\rho \to -\infty$, la actividad va a tender a 0 ($x \to 0$), contrariamente si $\rho \to +\infty$ la actividad va a tender a 1 ($x \to 1$). Si bien esto es cierto, corresponde a los valores extremos de input excitatorio o inhibitorio, quedando por estudiar la dinámica para valores intermedios de ρ, que es más interesante.

Podemos expresar esta igualdad gráficamente (Figura 0.F) tomando la intersección entre las curvas $y = x$ e $y = \frac{1}{1+e^{-(\rho+cx)}}$, para $0 \leq x \leq 1$, el parámetro $c>0$ fijo y variando el parámetro ρ.

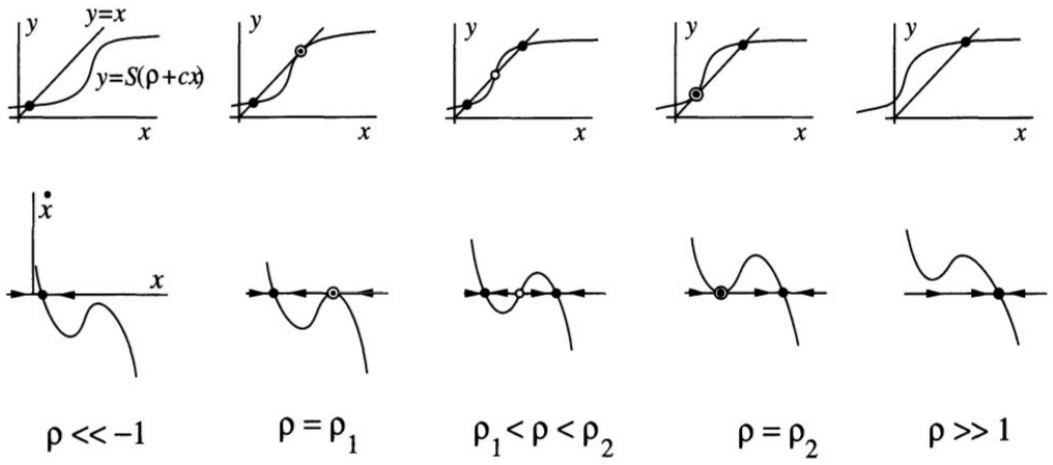


Figura 0.F: Puntos estacionarios del modelo aditivo. Paneles superiores muestran las intersecciones entre las curvas $y = x$ e $y = \frac{1}{1+e^{-(\rho+cx)}}$, para valores decrecientes de ρ. Los paneles inferiores muestran el espacio de fases del modelo aditivo para los distintos valores de ρ (Extraído de (Hoppensteadt & Izhikevich, 1997).

Notamos que hay valores intermedios de ρ para los cuales existen más de un punto fijo. Para ilustrar esto, en los paneles inferiores de la Figura 0.F, se muestra el *espacio de fases*, diagramas en los cuales se plotea *x* en función de $\dot{x}$.

En los extremos ρ>>1 y ρ<<-1, tenemos que las soluciones (*x*) tienden a los puntos fijos atractores ($x \to 1$, o, $x \to 0$ respectivamente). En los casos intermedios ($\rho_1 < \rho < \rho_2$) para los cuales hay 3 puntos fijos, los valores de *x* a los cuales tiende el sistema, dependerán de las condiciones iniciales: Para cada caso el signo de $\dot{x}$ (+/-) refleja el punto fijo al cual van a tender las soluciones (flechas sobre la línea horizontal).

Por otro lado, podemos observar que a medida que ρ decrece, dos puntos fijos se acercan hasta que colisionan y se *"destruyen"* (si ρ aumenta, "*nacen"*), quedando un solo punto fijo atractor. Estos cambios cualitativos en las soluciones del sistema se llaman *bifurcaciones,* siendo esta en particular una bifurcación *nodo-silla* (saddle-node).

Ahora bien, en este ejemplo el coeficiente *c,* que representa el peso de la conectividad, está fijo. Si permitimos que este parámetro varíe (al igual que el parámetro ρ) tendremos un conjunto de soluciones para los cuales ocurre esta bifurcación. Es decir, los valores de *c(x)* y *ρ(x)* para los cuales *nacen* o se *destruyen* dos puntos fijos.

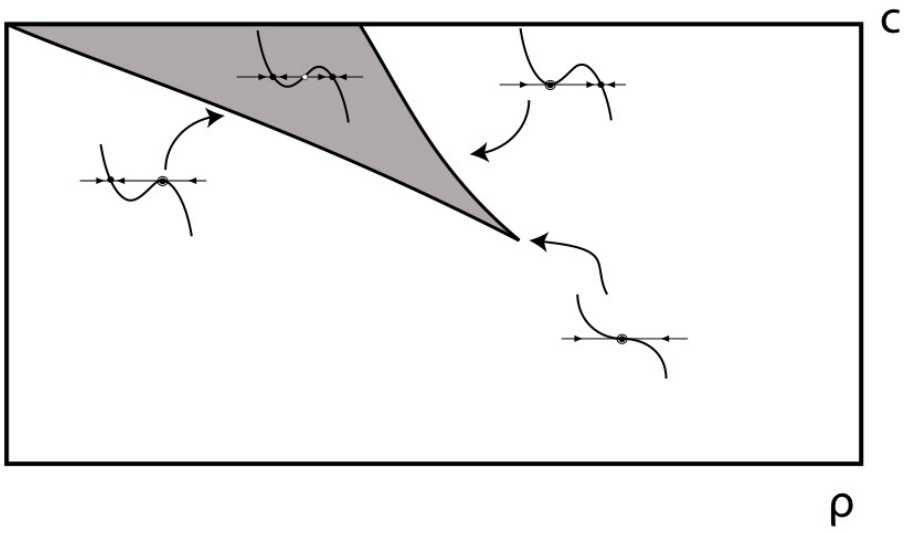


Figura 0.G: Diagrama de bifurcaciones del modelo aditivo. En la zona sombreada (área gris) existe una coexistencia de 3 puntos fijos. Las líneas negras denotan las bifurcaciones nodo-silla. El vértice que se forma cuando ambas curvas se unen, se llama bifurcación cúspide (*cusp bifurcation*).

En este tipo de bifurcaciones, se cumple la ecuación **(3)** y la condición de tangencia entre las dos curvas (por ejemplo, en la Figura 0.F $\rho=\rho_1$ y $\rho=\rho_2$), es decir que sus derivadas tengan la misma pendiente en el entorno al punto estacionario:

$$1 = \frac{c}{(1+e^{-(\rho+cx)})^2} e^{-(\rho+cx)} \qquad \textbf{(4)}$$

De **(3)** y **(4)** podemos despejar *ρ(x)* y *c(x)*

$$c(x) = \frac{1}{x(1-x)} \qquad \textbf{(5)}$$

$$\rho(x) = \ln\left(\frac{x}{1-x}\right) - \frac{1}{1-x} \quad \textbf{(6)}$$

Si graficamos **(5)** y **(6)** para valores de *x* entre 0 y 1, podremos construir el diagrama de bifurcaciones de la Figura 0.G. La gracia de este diagrama es que permite visualizar las distintas soluciones del sistema y más aún, sirve para hipotetizar distintas trayectorias de los parámetros (*c* y *ρ*) para los cuales ocurren cambios cualitativos en las soluciones del sistema. Por ejemplo, supongamos que tenemos una población que se encuentra inicialmente en reposo en el punto fijo de $x \to 0$ (margen superior izquierdo) y aumenta el parámetro ρ. Al cruzar la bifurcación *saddle-node* (área gris), surgen dos soluciones estacionarias más, pero dadas las condiciones iniciales, la solución está en un punto fijo atractor y no cambiará de estado. Sin embargo, si el parámetro ρ aumenta lo suficiente como para volver a cruzar la bifurcación *saddle-node,* el punto fijo atractor se destruye y el sistema va a tender al otro punto fijo atractor y comenzará a

disparar ($x \to 1$). De igual manera, si decrece el *input* ρ, el sistema continuará "prendido" hasta tanto cruce la segunda bifurcación, retornando al estado inicial, en un proceso de *histéresis*.

Por otro lado, podemos notar en la Figura 0.G, que las curvas se unen en un punto dónde $\rho(x) = c(x)$ en el cual hay un solo punto fijo atractor. Esta bifurcación se conoce como cúspide (o *cusp*).

Como mencioné anteriormente, los modelos fenomenológicos están motivados por algunas de las propiedades de un sistema neuronal, siendo en parte *caricaturas* de un sistema con una dinámica más compleja. En este sentido, los modelos aditivos ilustran la existencia o ausencia de actividad neuronal. Sin embargo, si se agregan otros "bloques" con las mismas características, las propiedades dinámicas del sistema son más ricas, apareciendo por ejemplo, oscilaciones.

Si agregamos a la ecuación **(1)**, un nuevo *bloque* obtenemos un oscilador neuronal de Wilson-Cowan:

$$\begin{cases} \dot{x_\iota} = \mu_x(-x_i + S\left(\rho_{xi} + \sum_{j=1}^{n} a_{ij}x_j - \sum_{j=1}^{n} b_{ij}y_j\right)) \\ \dot{y_\iota} = \mu_y(-y_i + S\left(\rho_{yi} + \sum_{j=1}^{n} c_{ij}x_j - \sum_{j=1}^{n} d_{ij}y_j\right)) \end{cases}, \quad x_i, y_i \in \mathbb{R} \qquad \textbf{(7)}$$

Tenemos entonces dos poblaciones de neuronas acopladas, con una distinción implícita: están separadas en excitatorias ($\dot{x}$) e inhibitorias ($\dot{y}$). A su vez, por completitud, agregamos los parámetros μ_x y μ_y que representan las (distintas) escalas temporales que pueden afectar la dinámica de cada población.

Al aumentar la dimensionalidad del sistema ($f(x) \to f(x,y)$), incrementamos la complejidad de las soluciones. En este sentido, la dinámica de estos sistemas tendrá, además de las bifurcaciones anteriores (*nodo-silla y cúspide*), otras que involucran el surgimiento o la destrucción de órbitas periódicas (Strogatz, 1994).

Procediendo de manera similar al caso 1D, podemos calcular las bifurcaciones de este sistema bi-dimensional. En la Figura 0.H, se muestra un diagrama de bifurcaciones del modelo de Wilson-Cowan para las variables ρ_x y ρ_y.

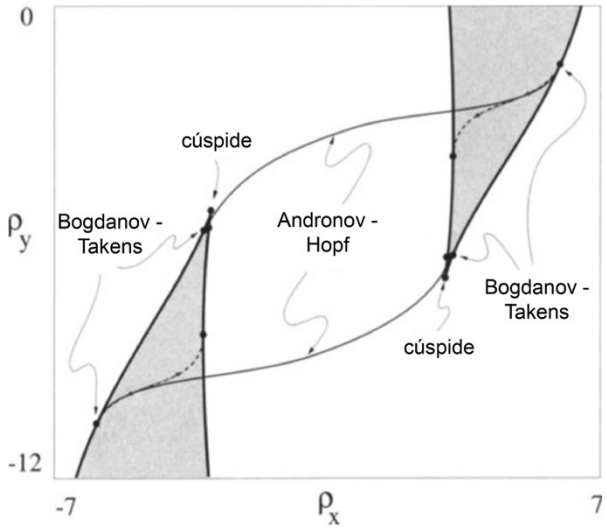


Figura 0.H: Diagrama de bifurcaciones del modelo de Wilson-Cowan. Las flechas representan las curvas o puntos en los cuales ocurren las distintas bifurcaciones. Extraído de (Hoppensteadt & Izhikevich, 1997).

Podemos observar que existen distintos tipos de bifurcaciones. Sin embargo, a los fines de esta tesis, nos centraremos en la bifurcación de *Andronov-Hopf* (para una discusión exhaustiva de la Figura 0.H, leer Borisyuk & Kirillov, 1992).

La bifurcación de *Andronov-Hopf* (o *Hopf*), se corresponde con el surgimiento de un ciclo límite (una órbita periódica en el espacio de fases), a partir de la pérdida de estabilidad de un punto fijo. Las oscilaciones que surgen de esta bifurcación nacen con amplitud cero y frecuencia fija. En el diagrama de la Figura 0.H, las soluciones periódicas se darán cuando los parámetros ρ_x y ρ_y se encuentren en la zona comprendida entre las dos bifurcaciones de Hopf y las de *nodo-silla*. Del mismo modo, por debajo (y por arriba) de las bifurcaciones de Hopf las soluciones tendrán las mismas características que las discutidas para el modelo de una dimensión (Ecuación **(1)**).

Fenomenológicamente, esta bifurcación representa la emergencia de actividad periódica en una red neuronal compuesta por neuronas excitatorias e inhibitorias. Lo cual es, en definitiva, otra característica ubicua en la dinámica del cerebro. El modelo presentado a continuación, está compuesto por una serie de "bloques", que representan la actividad promedio de distintos núcleos de la Vía Motora.

2.10 Un modelo Circular para el control Motor del canto

El modelo que presento a continuación fue diseñado de manera tal que fuera compatible con distintas observaciones experimentales tanto a nivel neuronal como a nivel de los gestos motores. A su vez, se requirió que la arquitectura neuronal del modelo fuera compatible con las

conexiones anatómicas reportadas para las aves oscinas (Ashmore, 2005; M. F. Schmidt, 2003; Marc F Schmidt, 2009).

2.10.1 Arquitectura neuronal

El modelo se apoya en los trabajos de Trevisan y colaboradores en los cuales muestran que un modelo neuronal simple puede reproducir los patrones de presión utilizados por los canarios durante la producción del canto (Marcos A. Trevisan et al., 2006). Este modelo consiste en un oscilador neuronal (de Wilson-Cowan) con una población excitatoria, una población inhibidora y una entrada periódica (forzante). Siguiendo este trabajo, el primer componente de nuestro modelo es una población excitatoria acoplada a una inhibitoria, y requerimos que la actividad de la población excitatoria se ajuste a los patrones de presión medidos (L. Alonso, Alliende, Goller, & Mindlin, 2009; Marcos A. Trevisan et al., 2006). Esta población excitatoria representa la actividad de un conjunto de neuronas motoras que proyectan sobre los músculos expiratorios. Sin embargo, la dificultad para obtener mediciones electrofisiológicas durante el canto de los núcleos del rombencéfalo como Ram, que controla el impulso expiratorio, nos impide establecer asociaciones más específicas con estas áreas y, por lo tanto, en nuestro modelo lo definimos como un área genérica relacionada con la expiración o ER (del inglés *expiratory related*). En la Figura 0.I se muestra un patrón de presión típico del canario doméstico, junto con las soluciones del sistema dinámico propuesto.

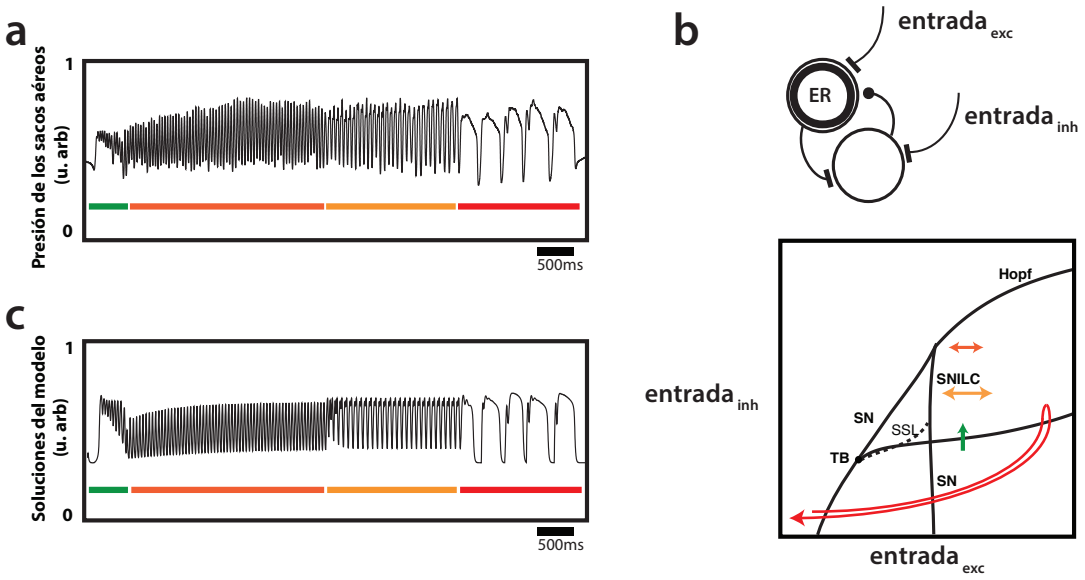


Figura 0.I: Origen dinámico de los patrones de presión de los canarios. (a) Serie temporal de presión de los sacos aéreos del canto producida durante el canto de un canario. (b) Diagrama de oscilador neuronal propuesto para reproducir los gestos de presión. Debajo, el diagrama de bifurcaciones del modelo. ER representa una población excitatoria acoplada a una población inhibitoria. (c) Soluciones del modelo propuesto. Las barras de

colores representan los distintos tipos de patrones de presión, generados por distintas incursiones en el espacio de parámetros (flechas de colores en Diagrama de Bifurcación).

Otra observación experimental sobre la cual se construyó este modelo, fue la existencia de actividad en el núcleo telencefálico HVC (en particular de neuronas proyectoras a RA) coincidente con el inicio de las sílabas (Ana Amador et al., 2013). La manera en que obtuvimos esta simultaneidad fue a partir de incluir en el modelo un núcleo que proyecta tanto hacia HVC como hacia los núcleos respiratorios. Llamamos a este núcleo área iniciadora o IA (*initiating area*). Nuevamente, la falta de registros electrofisiológicos de núcleos del tronco encefálico impide la asociación directa con un núcleo de la vía motora. Sin embargo, existen evidencias indirectas que indicarían que IA podría corresponderse con la actividad del núcleo DM de la vía motora. La racionalidad de esta hipótesis se basa en que, en aves no oscinas, que carecen de los núcleos telencefálicos tanto de la vía motora como del circuito AFP, el núcleo DM está presente y proyecta sobre los núcleos respiratorios (Pam y Ram). En estas aves (que no producen cantos complejos y aprendidos), DM está involucrado en la generación de vocalizaciones innatas (Liu et al., 2013). A su vez, estimulaciones en el núcleo DM licitan la producción vocalizaciones simples en diamantes mandarines (D S Vicario & Simpson, 1995).

En nuestro modelo, la actividad de IA consiste de ráfagas de disparos, que representamos matemáticamente como una función cuadrada de unos pocos milisegundos de duración. Esta actividad "estimula" directamente al área ER y manda una copia eferente hacia el telencéfalo a través del núcleo talámico Uva, rumbo a HVC. El tiempo que tarda en viajar hasta HVC está expresado matemáticamente con un *retardo* respecto al estímulo que llega a ER. De esta manera la actividad de HVC ocurre de manera simultánea a la actividad de ER, que representa la presión de los sacos aéreos.

Finalmente, el estímulo iniciado en IA, llega al núcleo RA. Al igual que ER, RA está representado por una población de neuronas excitatorias e inhibitorias. En este núcleo la señal de HVC es procesada, para luego proyectar hacia el núcleo ER, cerrando el circuito. En la Figura 0.J se muestra la arquitectura neuronal propuesta.

Cabe destacar que la construcción de este modelo fenomenológico tuvo como objetivo reproducir los patrones de presión observados en canarios. Debido a esto, incluimos en la descripción el menor número de núcleos necesarios para reproducir estos gestos y requerimos que su actividad fuera compatible con las observaciones mencionadas anteriormente (sección 2.8.2).

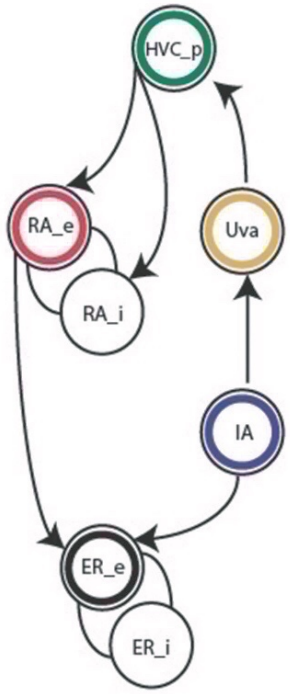


Figura 0.J: Arquitectura neuronal propuesta para el modelo circular propuesto. Cada círculo representa un núcleo. IA, área iniciadora; ER_e subpoblación de neuronas excitatorias del área expiratoria, ER_i subpoblación de neuronas inhibitorias; HVC_p, neuronas proyectoras a RA; RA_e y RA_i subpoblación excitatoria e inhibitoria de RA, respectivamente.

Matemáticamente, el modelo se describe de la siguiente manera:

$$\frac{de_{er}}{dt} = 149.5\left(-e_{er} + S(-7.5 + \alpha_{eer,ra}e_{ra} + \alpha_{eer,F}F + 10e_{er} - 10i_{er})\right)$$

$$\frac{di_{er}}{dt} = 149.5\left(-i_{er} + S(-11.5 + \alpha_{ier,ra}e_{ra} + 10e_{er} + 2i_{er})\right)$$

$$\frac{de_{ra}}{dt} = 20\left(-e_{ra} + S(\rho_{e,ra} + \alpha_{era,Fd}F_d + \alpha_{era,Fd2}F_{d2} + \alpha_{era,ra}e_{ra} + \beta_{era,ra}i_{ra})\right)$$

$$\frac{di_{ra}}{dt} = 20\left(-i_{ra} + S(\rho_{i,ra} + \alpha_{ira,Fd}F_d + \alpha_{ira,Fd2}F_{d2} + \alpha_{ira,ra}e_{ra} + \beta_{ira,ra}i_{ra})\right)$$

dónde las variables e_{er}, i_{er}, e_{ra}, i_{ra} corresponden a la actividad promedio de las neuronas excitatorias e inhibitorias de los núcleos ER y RA, respectivamente.

Los parámetros $\alpha_{i,j}$ y $\beta_{i,j}$ representan el *peso sináptico* de la conexión excitatoria entre el núcleo *i*-ésimo y el *j*-ésimo. De igual forma, $\beta_{i,j}$ representa el *peso sináptico* de la conexión inhibitoria. Estos parámetros dan cuenta de la intensidad de interacción entre los distintos núcleos, por lo tanto un valor mayor de $\alpha_{i,j}$ (o $\beta_{i,j}$) representa un acople mayor entre ambas poblaciones. En

términos biológicos esta medida estaría reflejando la cantidad de proyecciones entre cada núcleo que se licitan, lo cual puede variar para cada gesto fisiológico.

F es una función cuadrada que describe la actividad del núcleo IA. Esta actividad constituye una de las entradas al núcleo ER. F_d es también una función cuadrada con un retraso (o delay) respecto de F. En nuestras simulaciones F_d y F_{d2} representan las ráfagas de actividad en el núcleo HVC. El retraso de la actividad de estas variables representa el tiempo que tarda en llegar el impulso F de IA hacia HVC. Estos pulsos representan ráfagas de actividad y la amplitud de la función cuadrada se fijó en 10 (unidades arbitrarias).

El parámetro ρ representa una componente continua de actividad basal del núcleo HVC que afecta la dinámica de RA. Esta componente continua representa la actividad homogénea propuesta para las neuronas proyectoras de HVC (Fee et al., 2004; Hahnloser et al., 2002b; G. F. Lynch, Okubo, Hanuschkin, Hahnloser, & Fee, 2016), a su vez los pulsos de actividad *(F_d y F_{d2})* reflejan las heterogeneidades observadas en transiciones de los gestos motores (Ana Amador et al., 2013; M. F. Schmidt, 2003).

Al integrar numéricamente estas ecuaciones obtendremos señales temporales que representan la actividad promedio de cada uno de los núcleos propuestos.

2.10.2 Resultados teóricos

Los canarios generan diferentes sílabas utilizando patrones de presión que pueden ser separados en 4 categorías: i) Pulsátiles, ii) Periodos 1, iii) Periodos 2 y iv) Periodos 0 (ver capítulo 2) (Alliende et al., 2010; Marcos A. Trevisan et al., 2006). Los patrones pulsátiles consisten de pulsos expiratorios sostenidos con pequeñas modulaciones montadas sobre un nivel de flujo continuo (Figura 0.I, línea verde). Cada una de estas modulaciones genera un pulso de sonido. Estos gestos son generados para las vocalizaciones de mayor frecuencia silábica (>30Hz). Los gestos de este tipo suelen estar seguidos de patrones de menor frecuencia silábica (entre 15 y 25Hz), que llamamos P1 (o de Periodo 1). Estos últimos se caracterizan por tener una dinámica similar a las oscilaciones armónicas (Figura 0.I, línea naranja). El tercer patrón característico son las oscilaciones tipo P2 (o de Periodo 2). Estos patrones tienen el doble del largo de los P1 y se reconocen por poseer un mínimo local entre dos máximos, aunque la altura relativa de los máximos puede cambiar. La frecuencia silábica de estas oscilaciones ronda entre los 6 y 12 Hz (Figura 0.I, línea amarilla). Finalmente, las soluciones llamadas P0 (Periodo 0) son los gestos de presión de mayor duración (frecuencia silábica <6Hz), se distinguen por ser pulsos expiratorios largos (del orden de los 200ms). Típicamente contienen un pequeño pulso, seguido de un gesto expiratorio largo casi constante (aunque suele tener un pequeño decaimiento) hasta que decrece abruptamente hacia el final de la sílaba. Los canarios

utilizan este tipo de gestos para reproducir sonidos tonales como silbidos (Figura 0.I, línea roja oscura).

En la Figura 0.K se muestran las soluciones del modelo circular para algunos de los núcleos que forman parte de la arquitectura minimal propuesta. El modelo fue construido de manera tal que la actividad de los núcleos expiratorios (ER), reproduzca los gestos de presión.

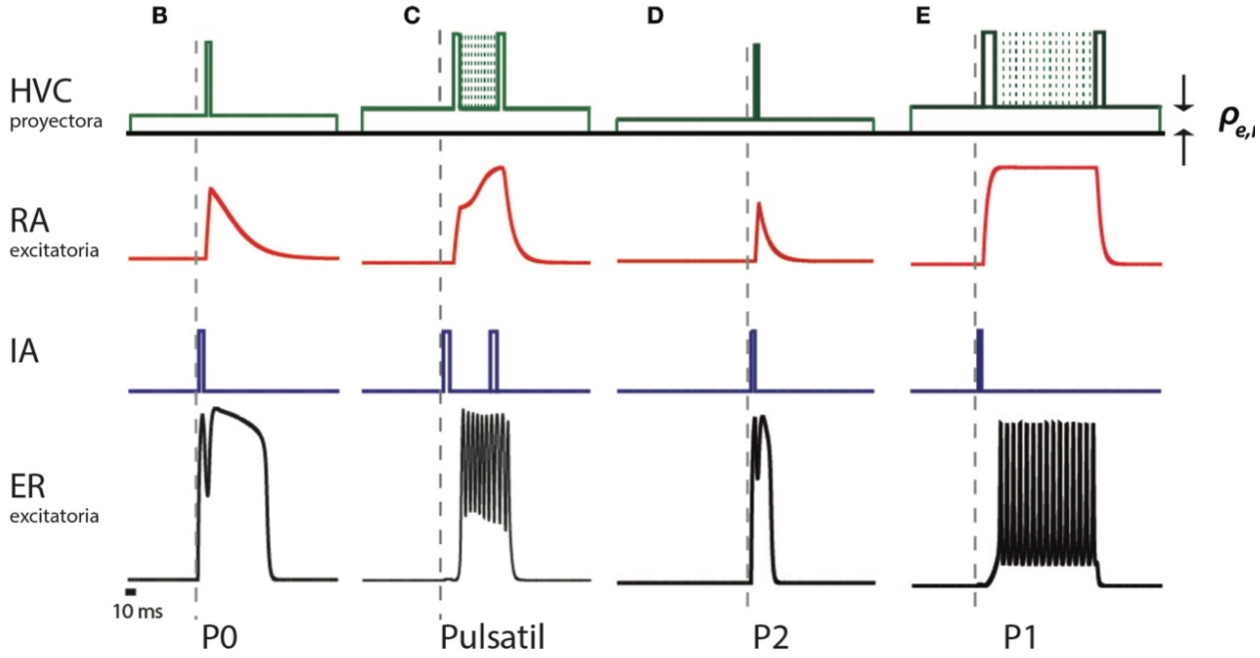


Figura 0.K: Resultados teóricos de las actividades de los distintos núcleos.

2.10.2.1 P0

En nuestro modelo, las soluciones de tipo P0 se pueden reproducir de la siguiente manera: La población excitatoria del área ER recibe primeramente un pulso breve de actividad de 20 ms (representada por *F*) del área IA (círculo azul en la Figura 0.J). Este pulso, también se envía *río* arriba hacia el telencéfalo, llegando a HVC (Figura 0.J, círculo verde). Este pulso activa HVC para luego transmitirse a RA con un *retraso* de 10 ms, a través de neuronas proyectoras HVC-RA. En el modelo, este retraso está representado por *Fdelayed*.

El núcleo RA tiene un subconjunto de poblaciones excitatorias e inhibitorias que procesan el input de HVC y generan una salida. Está salida constituye un segundo impulso que recibe el área ER (e_{ra} dentro en el argumento de la función sigmoidea, en la primera ecuación del modelo). Los parámetros que definen la conectividad interna de RA y su conectividad con otras regiones cerebrales se eligieron de modo tal que la actividad RA seguida al input de HVC, consista en un crecimiento brusco seguido de un decaimiento exponencial (el trazo rojo en la Figura 0.K). De esta forma, el área ER recibe dos entradas: un estímulo directo y una copia procesada de este estímulo desde el telencéfalo (RA).

El estímulo directo (*F*) es responsable del primer pico en la actividad de ER y la copia procesada por las estructuras telencefálicas (HVC-RA), produce la modulación lenta característica de estos patrones (Figura 0.K, trazo negro).

Los parámetros para los núcleos expiratorios ER son: $(\alpha_{\mathrm{eer,F}}, \alpha_{\mathrm{eer,ra}}, \alpha_{\mathrm{ier,ra}}) = (1{,}10{,}0)$. Los parámetros para las neuronas de RA son: $(\rho_{\mathrm{e,ra}}, \alpha_{\mathrm{era,Fd}}, \alpha_{\mathrm{era,Fd2}}, \alpha_{\mathrm{era,ra}}, \beta_{\mathrm{era,ra}}) = (-3{,}5{,}0{,}6{,}-3)$ y

$(\rho_{\mathrm{i,ra}}, \alpha_{\mathrm{ira,Fd}}, \alpha_{\mathrm{ira,Fd2}}, \alpha_{\mathrm{ira,ra}}, \beta_{\mathrm{ira,ra}}) = (-6{,}0.05{,}0{,}6{,}6)$.

2.10.2.2 Pulsátil

Estos gestos respiratorios consisten en rápidas oscilaciones de baja amplitud superpuestas a un pulso de presión expiratorio sostenido. Para su iniciación, el modelo requiere de un pulso del área iniciadora IA de 50ms de duración. Este pulso actúa tanto como entrada a ER, como a los núcleos telencefálicos. Sin embargo, para este tipo de gestos (a diferencia de los del tipo P0) el acople entre IA y ER ($\alpha_{eer,F}$) es débil, por lo que esta actividad no se manifiesta de manera inmediata en la dinámica de ER. Por otro lado, el pulso llega a la población excitatoria de RA (RA_e, Figura 0.K, trazo rojo) con un cierto retardo (expresado en *Fd*). Este pulso excitatorio activa a la población de RA que a su vez proyecta sobre ER generando el pulso característico de tipo pulsátil. Un cierto tiempo después, se requiere que haya un segundo pico en HVC que proyecte sobre la población inhibitoria de RA (RA_i), de manera que la actividad de RA_e decaiga y el gesto de presión finalice. En el modelo, este segundo pico de actividad está expresado en *Fd2*.

Cabe destacar que el segundo pulso (que actúa como entrada en la población inhibitoria de RA) podría ser el resultado de la dinámica intrínseca de HVC, o podría ser una respuesta tardía a actividad en el IA. En esta implementación, ambos pulsos se originan en la IA. El intervalo de tiempo entre *Fd2* y *Fd* será responsable de la duración del segmento. A su vez, en estas simulaciones, no estamos considerando actividad periódica adicional en HVC, aunque se obtendrían soluciones similares siempre que su frecuencia sea del orden de la frecuencia de las oscilaciones inducidas en la red respiratoria (Figura 0.K(E), líneas punteadas verdes).

Los parámetros utilizados en las simulaciones fueron: $(\alpha_{eer,F}, \alpha_{eer,ra}, \alpha_{ier,ra}) = (0.25{,}10{,}6)$ para las poblaciones expiratorias y $(\rho_{e,ra}, \alpha_{era,Fd}, \alpha_{era,Fd2}, \alpha_{era,ra}, \beta_{era,ra}) = (-5.25{,}15{,}0{,}10{,}-10)$ y

$(\rho_{i,ra}, \alpha_{ira,Fd}, \alpha_{ira,Fd2}, \alpha_{ira,ra}, \beta_{ira,ra}) = (-12{,}0{,}25{,}10{,}2)$ para la red neuronal que representa la actividad de RA.

2.10.2.3 P2

El modelo también puede reproducir gestos de tipo P2 que son pulsos expiratorios que muestran un mínimo local, con una duración aproximadamente dos veces mayor que la encontrada en los patrones más simples, cuasi-armónicos (P1). La amplitud relativa de los máximos locales puede variar en diferentes sílabas generadas por los patrones tipo P2.

En nuestra implementación de la solución P2, el rápido crecimiento del pico es el resultado de la activación directa de ER desde IA, por un pulso de 20 ms. Después de este breve pulso, la actividad decae hasta que llega la entrada proveniente del telencéfalo, 22 ms después de la primera. La diferencia entre estas soluciones y las del tipo P0 es que la actividad de RA no es lo suficientemente fuerte como para conducir el área ER al punto fijo "encendido" y, por lo tanto, su contribución al patrón expiratorio es una pequeña modulación en presión (comparar las trazas rojas para B y D en la Figura 0.K). Como antes, la clave para reproducir este patrón es un forzante dual que llega al área ER, (1) el directo del IA y (2) el procesado por el telencéfalo.

En esta implementación, utilizamos $(\alpha_{eer,F}, \alpha_{eer,ra}, \alpha_{ier,ra}) = (1{,}10{,}0)$ para el sistema expiratorio. Por su parte, la red neuronal que describe al núcleo RA para la generación de esta sílaba fue modelada utilizando los siguientes parámetros:

$(\rho_{e,ra}, \alpha_{era,Fd}, \alpha_{era,Fd2}, \alpha_{era,ra}, \beta_{era,ra}) = (-7{,}2{,}0{,}3.5, -5)$ y

$(\rho_{i,ra}, \alpha_{ira,Fd}, \alpha_{ira,Fd2}, \alpha_{ira,ra}, \beta_{ira,ra}) = (-4.5{,}0.05{,}0{,}16{,}6)$.

Si cambiamos ligeramente estos parámetros, modificaremos las formas del patrón de presión, lo que permite simular las diferencias observadas en la amplitud relativa entre los máximos en los patrones de presión registrados.

2.10.2.4 P1

En un canto típico de un canario, los gestos de presión de tipo P1 suelen seguir a gestos de tipo pulsátil. Frecuentemente, las aves comienzan una frase cantando frases de alta frecuencia silábica y la disminuyen progresivamente hasta producir sílabas de tipo P1. Debido esto, a la hora de simular estos gestos, intentamos buscar un mecanismo que representara una pequeña desviación del utilizado para generar los patrones pulsátiles.

En nuestras simulaciones el pulso iniciador de IA dura 40ms. Al igual que en los gestos pulsátiles, el acople entre IA y ER es pequeño, por lo que no se observa una modulación inmediata de la actividad respiratoria. Luego, este pulso llega a HVC y activa el núcleo de manera tal que genera un pulso de actividad de mayor duración. Este último activa la población excitatoria de RA con mayor intensidad que en los gestos pulsátiles, alcanzando una amplitud que se mantiene constante. Esta actividad de RA genera oscilaciones en el área ER.

Del mismo modo que en las soluciones pulsátiles, para detener las oscilaciones se necesita un pulso que active a la población de neuronas inhibitorias de RA, de manera que decaiga la amplitud (F_{d2}). Asimismo, una activación periódica de HVC permitiría tener mejor control sobre la frecuencia silábica de las oscilaciones, aunque su presencia no es necesaria para generar este tipo de soluciones.

Para finalizar, notamos que, en el marco de este modelo, para pasar de soluciones pulsátiles a las del tipo P1 sólo se requiere de un aumento la activación de RA. Por lo tanto, es parsimonioso suponer que durante el canto se produce un proceso continuo que comienza con soluciones pulsátiles y luego de un cambio menor en los parámetros se produce una transición hacia soluciones de tipo P1(Figura 0.K (C-E), trazas rojas).

Los parámetros utilizados para estas simulaciones fueron los siguientes:
ER: $(\alpha_{eer,F}, \alpha_{eer,ra}, \alpha_{ier,ra}) = (0.25,4.65,4.5)$

RA: $(\rho_{e,ra}, \alpha_{era,Fd}, \alpha_{era,Fd2}, \alpha_{era,ra}, \beta_{era,ra}) = (-5.25,35,0,10,-10)$ y

$(\rho_{i,ra}, \alpha_{ira,Fd}, \alpha_{ira,Fd2}, \alpha_{ira,ra}, \beta_{ira,ra}) = (-12,0,25,10,2)$.

Los pulsos F,F_d y F_{d2} fueron de 40,140 y 100 ms, respectivamente.

2.10.3 Experimentos de enfriamiento del núcleo HVC en canarios

Una característica fundamental del modelo circular es que los gestos motores surgen a partir de la acción conjunta de los distintos núcleos de la vía motora, los cuales están distribuidos en las distintas regiones del cerebro. En este modelo, no hay jerarquías entre los núcleos, por lo que es necesaria la contribución de cada uno de ellos para la generación del patrón de presión adecuado. En este sentido, se diferencia sustancialmente del modelo del reloj, el cual postula que HVC está encargado de controlar todas las escalas temporales del canto. Esta idea fue apoyada por los experimentos de enfriamiento del núcleo HVC realizados en Diamantes mandarines (*Taeniopygia guttata*), en los cuales observaron que los cantos se *estiraban* al enfriar el núcleo (ver sección 2.8.1) (Long & Fee, 2008).

Estos experimentos fueron revisitados por Goldin y colaboradores en canarios domésticos (*Serinus canaria*). Los resultados de estos experimentos fueron distintos a los predichos por el modelo del reloj, ya que además de estiramiento los investigadores observaron la ruptura de ciertas sílabas (Goldin et al., 2013).

Ahora bien, en un modelo circular, el efecto de enfriar HVC no es trivial. En nuestras simulaciones, asumimos que el efecto de la reducción local de la temperatura en HVC tiene al menos dos efectos. En primer lugar, ralentiza los procesos biofísicos que controlan la dinámica dentro de HVC. Esto implica específicamente el estiramiento de las ráfagas que se producen en las neuronas de este núcleo (Goldin & Mindlin, 2017). En segundo lugar, ralentiza las entradas

que vienen de Uva a HVC. De esta forma, las simulaciones de patrones para temperaturas de HVC normales y reducidas requerirían de los mismos parámetros de los pesos sinápticos y se iniciarían con pulsos idénticos del área de inicio (IA), pero en el segundo caso, los pulsos en HVC serían más largos (primer efecto) y comenzarían un poco más tarde que en el caso de temperatura normal (segundo efecto).

El efecto posterior es particularmente importante en aquellos patrones cuyas formas requieren tanto del impulso directo del tronco cerebral (IA) como del impulso impuesto por el telencéfalo (RA). Por esta razón, discutiremos en detalle el resultado del enfriamiento sobre los patrones P0.

La Figura 0.L ilustra el mecanismo de rompimiento de sílaba de acuerdo con el modelo circular. El primer panel (Figura 0.L(A)) muestra una simulación para el caso de temperatura normal. El segundo panel (Figura 0.L(B)) muestra las simulaciones luego de enfriar HVC. En ambas simulaciones la actividad de IA es idéntica. Sin embargo, utilizamos para la actividad de HVC un pulso más largo que en el caso de temperatura normal (15ms más), comenzando un poco más tarde (5 ms). Este retraso adicional se representa en el ancho del segmento pequeño delimitado por flechas (segundo panel).

En ambas simulaciones, un asterisco indica el mínimo local. La disminución del valor de la presión en el mínimo conduce a la "ruptura" del patrón cuando el mínimo alcanza el umbral de la fonación. Entonces, el patrón inicial se convierte en un conjunto de dos pulsos de presión separados. Esta disminución se origina en el aumento en el tiempo de procesamiento en HVC inducido por el enfriamiento. De hecho, las simulaciones que involucran solo el primer efecto (estiramiento de la ráfaga sin retardo de inicio) conducen al estiramiento sin romper los patrones de presión. Es el segundo efecto (retraso de inicio) que genera la separación entre el primer pulso expiratorio producido por la estimulación directa de IA a ER y la segunda parte del pulso que es inducida por la actividad de RA. En nuestra simulación, el pulso más largo en HVC (primer efecto) también conduce a un período más largo de actividad en RA, lo que da como resultado un patrón que también se estira.

En el panel lateral (Figura 0.L, Panel C) se muestra un ejemplo experimental de cómo se modifica el gesto de presión tipo P0 a medida que disminuye la temperatura en HVC, hasta el rompimiento del patrón.

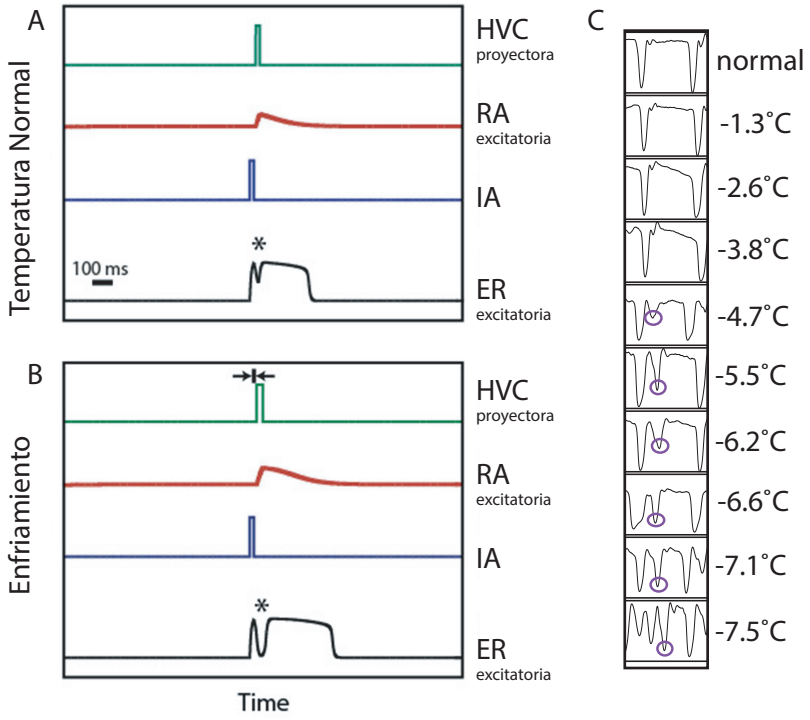


Figura 0.L: Predicciones del modelo circular sobre el enfriamiento del núcleo HVC para sílabas del tipo P0. (A) Resultados teóricos para temperaturas normales. (B) Predicciones del modelo para temperaturas inferiores a la normal. Los otros parámetros de estas simulaciones son ($\alpha_{eer,\,F}$, $\alpha_{eer,\,ra}$, $\alpha_{ier,\,ra}$) = (1, 10, 0), ($\rho_{e,\,ra}$, $\alpha_{era,\,Fd}$, $\alpha_{era,\,Fd2}$, $\alpha_{era,\,ra}$, $\beta_{era,\,ra}$) = (-3, 5, 0, 6, -3) y ($\rho_{i,\,ra}$, $\alpha_{ira,\,Fd}$, $\alpha_{ira,\,Fd2}$, $\alpha_{ira,\,ra}$, $\beta_{ira,\,ra}$) = (-6, 0.05, 0, 6, 6). (C) Ejemplo de mediciones experimentales dónde se produce la ruptura de un gesto de presión de tipo P0. (Cortesía de M.Goldín).

2.11 Predicciones y Observables

En la sección anterior, presenté un modelo que propone un mecanismo neuronal por el cual se pueden generar los distintos patrones de presión observados en el canto del canario doméstico. Este modelo se apoya en el conocimiento recopilado acerca de la arquitectura neuronal involucrada en el control motor de las vocalizaciones (Ashmore, 2005). Las variables del modelo representan la actividad promedio de distintos núcleos. Algunos de ellos están explícitamente definidos (HVC, RA, Uva) y otros han quedado por determinar (IA, ER).

La ventaja de un modelo operacional implementado a través de ecuaciones diferenciales es que permite realizar predicciones específicas sobre el tiempo en que ocurrirán cambios cualitativos en la actividad de los distintos núcleos. En el marco de esta tesis nos hemos centrado en el rol de HVC en el control de las vocalizaciones. Motivo por el cual, las predicciones que se detallan a continuación estarán relacionadas a los patrones de actividad de éste núcleo.

2.11.1 Heterogeneidades en la actividad de HVC

En el modelo propuesto, la actividad de HVC tiene dos componentes, una continua representada por el parámetro $\rho_{e,ra}$ y una componente fásica (F_d y F_{d2}). Esta última refleja la activación del núcleo HVC por la entrada de un impulso desde los núcleos del tronco cerebral, IA en el modelo (putativamente DM).

Las predicciones sobre esta componente rala, dependerán del tipo de gesto de presión. Por un lado, en los patrones oscilatorios tipo P1 o Pulsátiles, el modelo postula que HVC dispara mayoritariamente en los comienzos y finales de un gesto respiratorio completo. Sin embargo, el modelo no descarta la existencia de actividad oscilatoria en HVC sincronizada con los gestos de presión (Figura 0.K, paneles C y E, líneas punteadas verdes).

Contrariamente, en el caso de las P0 y P2, el modelo postula que la actividad de HVC será necesaria para la producción de cada sílaba individual. En este caso, los gestos respiratorios requieren de la estimulación directa de ER por parte de IA y luego la activación modulada por las estructuras telencefálicas. De esta manera, la predicción del modelo es que se observarán heterogeneidades en HVC luego del primer máximo en el gesto de presión (Figura 0.K, Paneles B y D, línea verde). En general, estas sílabas se producen con ambos lados de la siringe y el mínimo del gesto respiratorio está asociado al cambio de la fuente sonora, por lo que la actividad fásica de HVC podría asociarse a esta instancia significativa del control motor. Cabe aclarar que las predicciones del modelo se refieren a la actividad de las neuronas proyectoras a RA, las cuales forman parte de la vía motora.

2.12 Observaciones preliminares de Actividad neuronal en HVC

Una parte importante de esta tesis consistió en recabar evidencia experimental contra la cual contrastar las predicciones de los modelos teóricos, en este caso actividad neuronal. En particular, estudiamos la actividad del núcleo HVC licitada por estímulos auditivos del canto propio del animal o BOS (del inglés *Bird's Own Song*), como *proxy* de la actividad asociada a la generación de los gestos motores.

Como mencioné anteriormente, este núcleo forma parte de los tres circuitos del sistema del canto; la vía auditiva, la vía motora y el circuito AFP (sección 2.7), por lo que su actividad estaría ligada a distintos procesos relacionados al aprendizaje vocal y a la producción del canto (P. Marler & Slabbekoorn, 2004). A su vez, se ha reportado para algunas aves oscinas que la respuesta neuronal asociada al canto propio en aves dormidas o anestesiadas es similar a la respuesta neuronal cuando las aves están cantando (Margoliash, 1986; Prather et al., 2008; David S. Vicario & Yohay, 1993). Cabe aclarar que si bien la respuesta al canto propio en aves anestesiadas tiene mayores fluctuaciones temporales (*jitter*) y mayor actividad basal ya que hay menos inhibición, la correlación temporal con el canto es aproximadamente la misma (Dave &

Margoliash, 2000). Así pues, debido a esta similitud en la respuesta neuronal entre un estímulo auditivo y durante la ejecución de un programa motor, se ha propuesto que HVC tendría un rol de *integración sensorimotora* (Ana Amador et al., 2017).

En esta tesis nos hemos focalizado en estudiar la actividad extracelular de neurona única (*single-units*) o de unas pocas neuronas (*multi-unit*) en el núcleo HVC, en aves anestesiadas con Uretano. Resumidamente, el experimento consiste de dos cirugías independientes. En la primera, se implanta una placa de sujeción (o PIN) en el cráneo del ave y se realiza una serie de incisiones sobre la cabeza dejando expuesta la calota. Esta cirugía se realiza bajo anestesia gaseosa (isofluorano) y luego se deja el ave en reposo uno o dos días. En la segunda intervención, se anestesia el ave con Uretano 20%, se la coloca en un dispositivo estereotáxico sujeta del PIN y se realiza una nueva craneotomía sobre las coordenadas de HVC por la cual se insertará el electrodo de registro (electrodos de Tungsteno de 1-3MΩ). Luego se obtiene la señal de respuesta a estímulos auditivos (canto propio, canto de un conespecífico y canto reverso) presentados de forma aleatoria. Las cirugías se detallan en el Anexo 1, sección en la cual se describen minuciosamente los distintos procedimientos experimentales realizados a lo largo de la tesis.

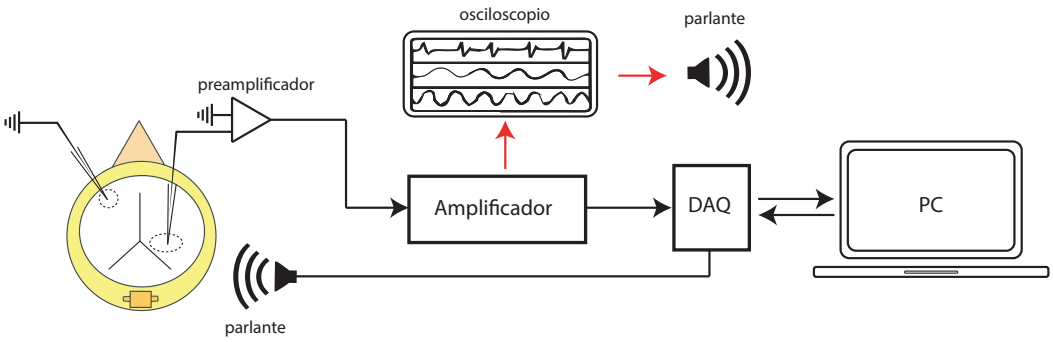


Figure 0.M: Diagrama de configuración del instrumental utilizado para realizar las mediciones neuronales. La actividad neuronal es registrada por un electrodo de Tungsteno (de 1-3MΩ), respecto a una señal de referencia, mientras el ave escucha estímulos auditivos. Luego es amplificada y adquirida por una placa de conversión analógico-digital (DAQ). La señal neuronal es monitoreada visualmente (osciloscopio) y auditivamente.

Antes de continuar, he de aclarar que al momento no se han reportado registros de actividad de HVC en respuesta al canto propio en canarios domésticos (*Serinus canaria*) ya sea dormidos o anestesiados, así como tampoco se han realizado mediciones crónicas en canarios cantando. Entonces, si bien es de esperarse que así como en otras aves oscinas la respuesta auditiva y la actividad motora sean similares, esta propiedad no ha sido validada aún para esta especie. Debido a esto, los resultados experimentales que muestro a continuación forman parte de un

grupo de experimentos que exceden el alcance de esta tesis, en los cuales se medirá no sólo la respuesta auditiva, sino también se realizarán mediciones crónicas. En su conjunto estos experimentos, que se están realizando en el Laboratorio de Sistemas Dinámicos, apuntan a testear las predicciones del modelo circular.

2.12.1 Actividad de varias neuronas (*multi-unit*)

En un experimento típico de electrofisiología, la impedancia de los electrodos determina el volumen de registro y por lo tanto la cantidad aproximada de neuronas de las cuales censará su actividad. Si bien esto depende de la densidad de neuronas en el sitio de inserción, en general, a medida que se aumenta la impedancia disminuye el número de neuronas registradas. En esta tesis utilicé electrodos de relativamente baja impedancia (entre 1 y 3 MΩ), obteniendo la señal de varias neuronas (*multi-unit*).

En estos experimentos observamos que la actividad de HVC en respuesta al canto propio en aves anestesiadas presentan características que se condicen con las predicciones del modelo. En la Figura 0.N se presenta un ejemplo dónde se registró actividad en ambos hemisferios. En la figura se muestra en primer lugar un sonograma del canto propio del ave (BOS), debajo la presión de sonido (rojo) seguida de la presión de los sacos aéreos (amarillo) registrada durante la ejecución del canto. Luego, se exhibe un histograma dónde se cuantifica la cantidad de disparos obtenidos en la señal sin procesar agrupados en intervalos (bines) de 20 ms. Este tipo de histograma se conoce como Histograma Temporal Post estímulo o PSTH (de sus siglas en ingles *Post Stimulus Time Histogram*).

En primer lugar, notamos que existe una gran sincronización entre ambos hemisferios. Por otro lado, si observamos en detalle dónde ocurren los picos de los histogramas veremos que los máximos de actividad se encuentran principalmente en transiciones entre sílabas distintas (líneas verdes punteadas). Estos picos en el PSTH se encuentran a unos pocos milisegundos (entre 40 y 80ms) después de la transición entre sílabas. Nótese que como los estímulos utilizados en estos experimentos son auditivos, para que se registre actividad asociada a un estímulo acústico en HVC es necesario que se produzca una activación de varios núcleos localizados *río abajo* en la vía auditiva (al menos 3 sinapsis, ver Figura 0.A). Debido a esto, el retraso observado en los histogramas es coherente con el tiempo de procesamiento típico de un estímulo auditivo. A su vez, podemos advertir que en el caso de las sílabas de tipo P0, la actividad tiene máximos luego del mínimo local de presión, como predice el modelo circular.

Ahora bien, este tipo de señales representan la sumatoria de los disparos de varias neuronas y nos dan una idea de la actividad general que puede tener un núcleo. Sin embargo, no nos brindan información sobre la cantidad de neuronas, la identidad de las mismas y la forma en que éstas contribuyen a la señal.

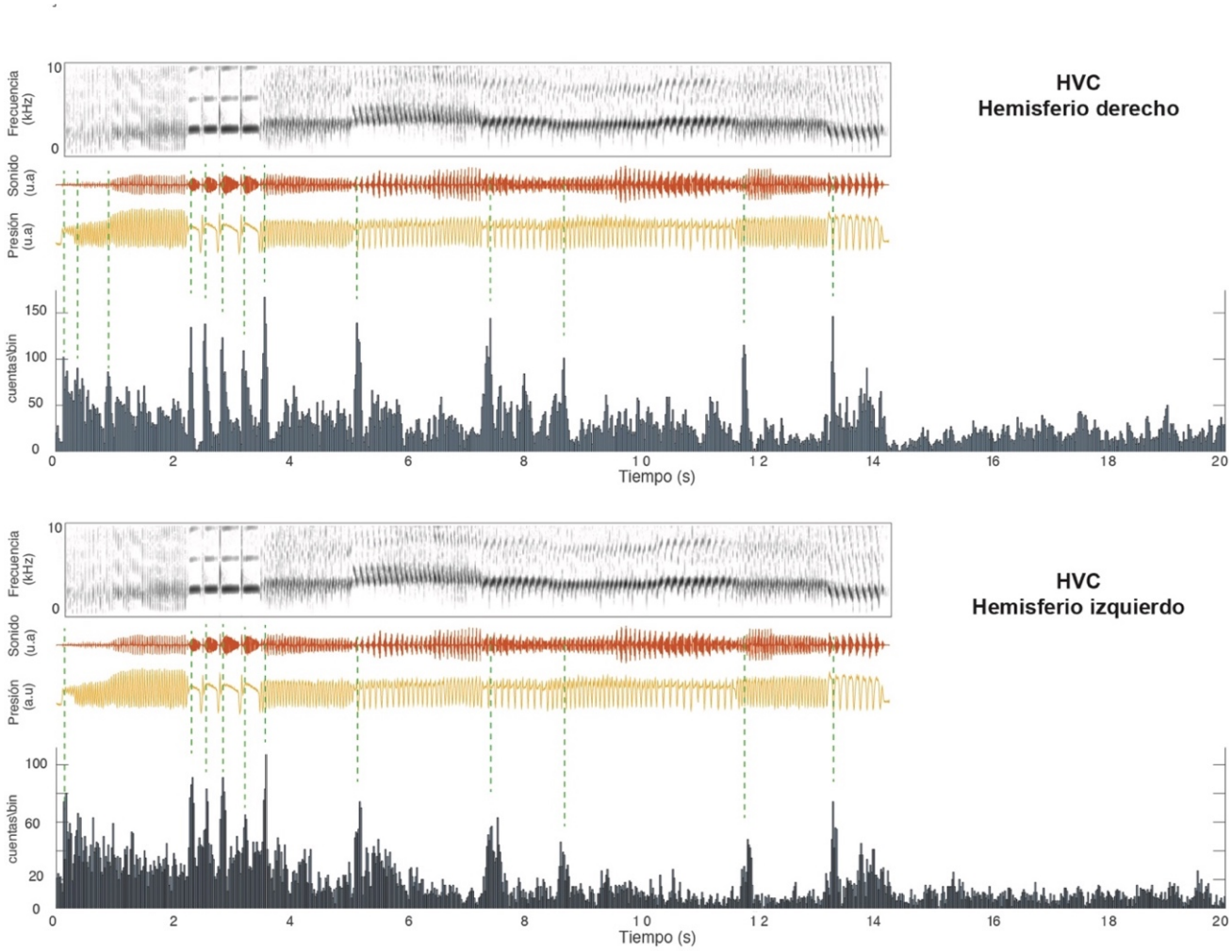


Figura 0.N: Actividad de varias neuronas de HVC, en respuesta a estímulos auditivos. (Canario cGo9-CyA)

2.12.2 Actividad de neurona única (single-unit)

Para poder separar las contribuciones de neuronas únicas (*single-units*), una vez adquirida la actividad neuronal utilizamos un programa de separación de la señal (clustereo), llamado *wave clu*s (Quiroga, Nadasdy, & Ben-Shaul, 2004). Éste programa utiliza coeficientes wavelets para caracterizar la señal y así poder separar disparos provenientes de neuronas distintas. El programa permite realizar una separación semi-automática de la señal, en la cual el usuario puede seleccionar, en parte, los distintos grupos o clústeres. En la Figura 0.O se muestra un ejemplo de la señal obtenida en un sitio de registro, luego de la separación en *clústeres* que corresponden a neuronas diferentes.

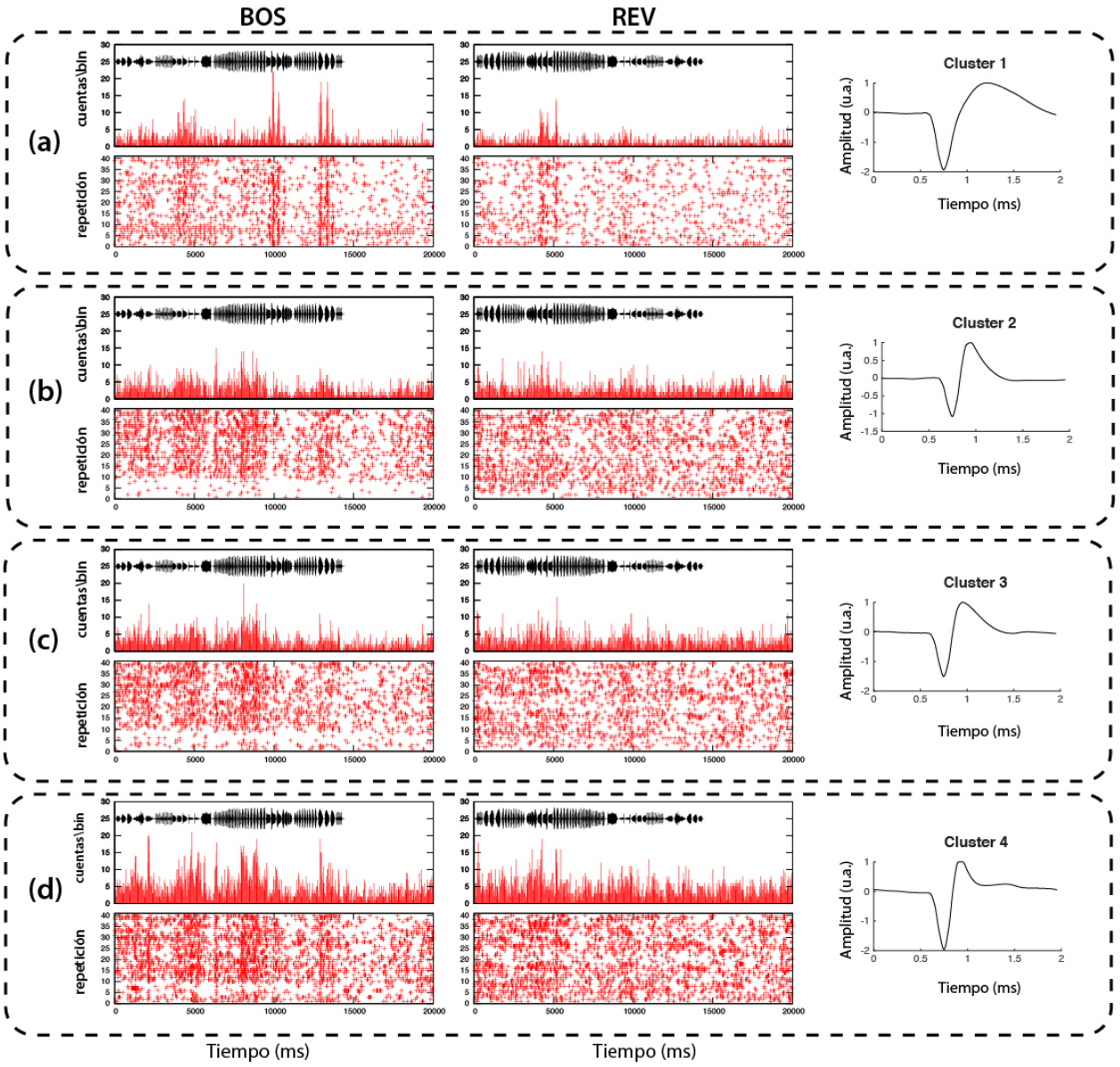


Figura 0.O: Respuesta al canto propio (BOS) o al canto reverso (REV) de distintos *clústeres* de neuronas obtenidos simultáneamente. Cada recuadro horizontal (a-d, líneas punteadas) corresponde a un clúster diferente. En cada uno de ellos, se muestran 4 paneles alineados de a pares. En los paneles superiores se muestra la presión del sonido del estímulo correspondiente (BOS o REV), superpuesto a un histograma temporal post-estímulo (PSTH). Este histograma se obtiene de sumar las cuentas (disparos de un mismo clúster) en bines de 20ms. El panel inferior corresponde al "*raster plot*" que muestra el tiempo en que se encontraron disparos de las neuronas del clúster correspondiente (cada punto corresponde a un disparo). Finalmente, a la derecha se muestra la forma promedio de los disparos de neuronas de un mismo clúster. Como se puede ver, en este registro hay 4 clúster con formas cualitativamente distintas. (Canario cGo32-VyA)

En esta figura se destaca en primer lugar la diversidad de neuronas que son registradas simultáneamente. Estas neuronas generan potenciales de acción con formas cualitativamente

diferentes. A su vez, se observa que estas neuronas son selectivas al canto propio, debido a que la tasa de disparo aumenta considerablemente respecto a lo que ocurre cuando el estímulo auditivo es el canto reverso. Finalmente destacaremos que existen también diferencias en la frecuencia de disparo entre los distintos clústeres.

En la Figura 0.P, se muestra la actividad de neuronas únicas que forman parte de la señal de tipo *multi-unit* (varias neuronas) que se muestra en la Figura 0.N. En este caso notamos que si bien la forma de los disparos difiere, las distintas neuronas están sincronizadas.

Es importante destacar que si bien los dos casos presentados en esta sección tienen características distintas, en todos ellos es evidente que al menos alguna de las neuronas involucradas presenta heterogeneidades en relación a su probabilidad de disparo. Dicho de otro modo, en ningún caso las neuronas disparan uniformemente ante estímulos auditivos del canto propio como predice el modelo del reloj. Estas heterogeneidades ocurren luego de unos pocos milisegundos de transiciones acústicas como cambios de sílabas o cambios en gestos motores.

2.12.3 Métodos para determinar la *identidad* de neuronas individuales en un registro electrofisiológico

El núcleo HVC tiene 3 tipos neuronales: neuronas que proyectan a RA, neuronas que proyectan a Área X e Interneuronas.

Las predicciones del modelo circular se refieren a la actividad media del conjunto de neuronas de HVC que forman parte de la vía motora, es decir, de aquellas que proyectan a RA. Entonces, ¿cómo podemos distinguir el tipo de neurona que estamos registrando? Típicamente una interneurona se distingue de una neurona proyectora por poseer una mayor frecuencia de disparo espontáneo. Sin embargo, la distinción entre tipos de neuronas proyectoras requiere de experimentos adicionales que permitan asignar una identidad a cada neurona; los experimentos de estimulación antidrómica.

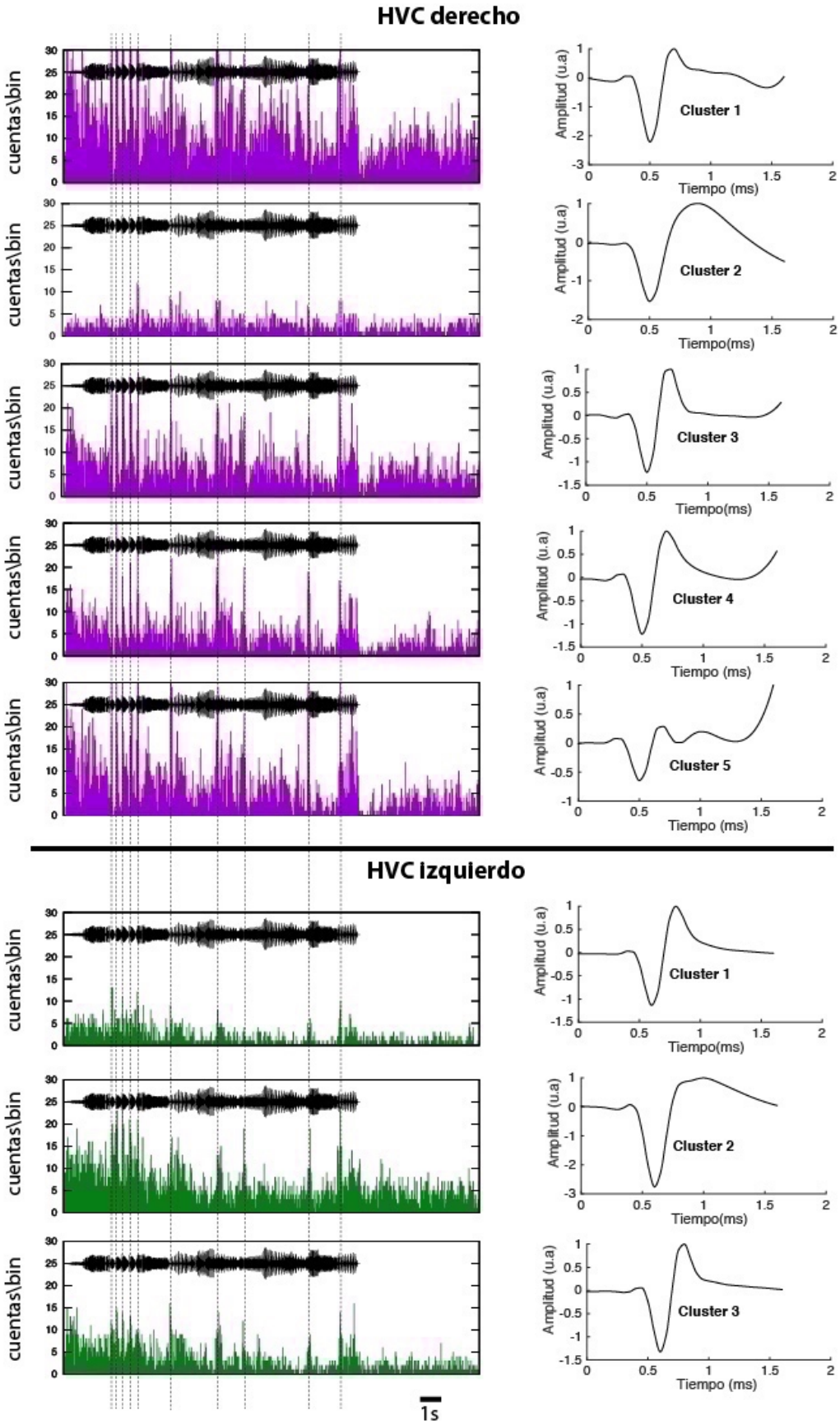


Figura 0.P: Ejemplo de respuesta al canto propio de neuronas únicas separadas por el programa de separación de actividad neuronal "*wave clus*". Para cada clúster se muestra el PSTH (cuentas\bin en el tiempo) y la forma del disparo del clúster correspondiente.

Estos clústeres fueron separados de las señales de varias neuronas (multiunits) que se muestra en la Figura 0.N.Las líneas punteadas verticales fueron colocadas arbitrariamente alineadas con picos en el histograma para ilustrar el grado de sincronización de la señal. (Canario cGo9-CyA)

2.12.3.1 Experimentos de Estimulación Antidrómica

Como primera aproximación realizamos un protocolo que se conoce como *experimento de estimulación antidrómica*. Estos experimentos tienen por objetivo determinar si la señal adquirida por los electrodos corresponde a neuronas que proyectan a un núcleo ubicado *rio abajo* en el circuito. Básicamente, el protocolo consiste en insertar dos electrodos; el electrodo de registro en HVC y un electrodo bipolar (registro y estimulación) en el núcleo RA. Una vez verificada la correcta ubicación de los electrodos, se estimula con pulsos cuadrados de 2ms de duración, 1Hz de frecuencia y amplitud entre 50 y 500µA (Figura 0.Q, recuadro A). En el Apéndice 1 se detalla el instrumental utilizado y los protocolos quirúrgicos realizados.

La estimulación periódica de RA genera un artefacto que se distingue claramente del ruido intrínseco de la señal por tener una amplitud varios órdenes de magnitud mayor. En un experimento exitoso, seguido al artefacto se observa una activación que corresponde a la conducción del impulso eléctrico en sentido antidrómico. En el recuadro B de la Figura 0.Q, se muestran 20 fragmentos de la señal registrada en HVC, alineados respecto al inicio de la estimulación.

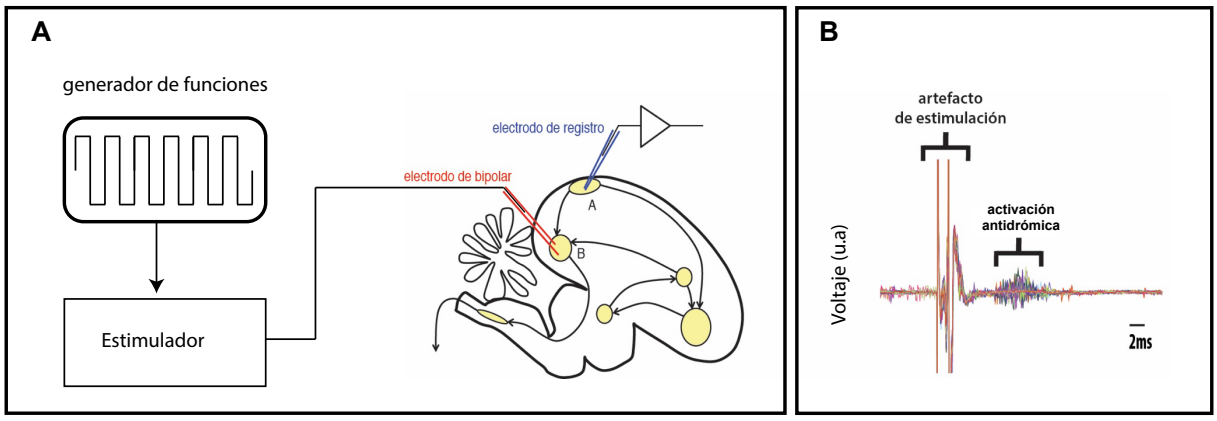


Figura 0.Q: Protocolo de Estimulación Antidrómica. (A) Esquema conceptual de experimento de estimulación antidrómica. (B) Ejemplo de estimulación antidrómica. 20 segmentos de señal registrada en HVC alineados al inicio del pulso de estimulación.

Este experimento permite verificar que exista una conexión entre alguna de las neuronas que estamos censando en HVC y el núcleo RA. Sin embargo, existe la posibilidad que el electrodo de registro esté adquiriendo la actividad de una (o varias) interneurona que al estimular RA reciba la excitación de parte de una neurona proyectora alejada del sitio de registro. En el

ejemplo de la Figura 0.O, el protocolo de estimulación antidrómica fue exitoso, por lo que al menos una de las neuronas adquiridas proyecta directa o indirectamente a RA. Sin embargo, no podemos asegurar cuál de los clústeres está involucrado en este proceso.

Si bien la distinción entre interneuronas y neuronas proyectoras puede realizarse a partir de la cuantificación de la actividad espontánea. En un registro de muchas neuronas no podremos distinguir entre dos tipos de proyectoras.

2.12.3.2 Experimentos de Colisión Antidrómica

En los protocolos de Colisión Antidrómica, la estimulación en el núcleo RA se da a unos pocos milisegundos luego de ocurrido un disparo espontáneo en el núcleo ubicado *río arriba* en el circuito (HVC). De esta manera, si en HVC estamos registrando actividad de una neurona proyectora (HVC_{RA}), el pulso producto de la estimulación colisiona con el potencial de acción que viaja en dirección ortodrómica y se pierde el efecto de la estimulación antidrómica. Contrariamente, si se está registrando de una interneurona ($HVC_{interneurona}$), el efecto de la estimulación sobrevive debido a la activación indirecta de la misma por parte de otra neurona proyectora.

En la Figura 0.R(A) se muestra un esquema del circuito cerrado de estimulación. Este circuito cuenta con un detector de disparos que activa al estimulador para que genere un pulso 2ms luego de ocurrido un disparo espontáneo (ver detalle en Apéndice 1). En el recuadro B, se ilustra la diferencia entre el efecto de colisión antidrómica en neuronas proyectoras (HVC_{RA}) y en interneuronas ($HVC_{interneurona}$). Para cada caso, se muestran 4 fragmentos de unos 500ms de duración, alineados con el inicio de la estimulación, separados en el eje vertical. Notamos que en los fragmentos correspondientes a $HVC_{RA,}$ luego del artefacto de estimulación el voltaje vuelve a un valor medio, mientras que en las trazas de las $HVC_{interneurona}$ se observa el patrón de activación antidrómica.

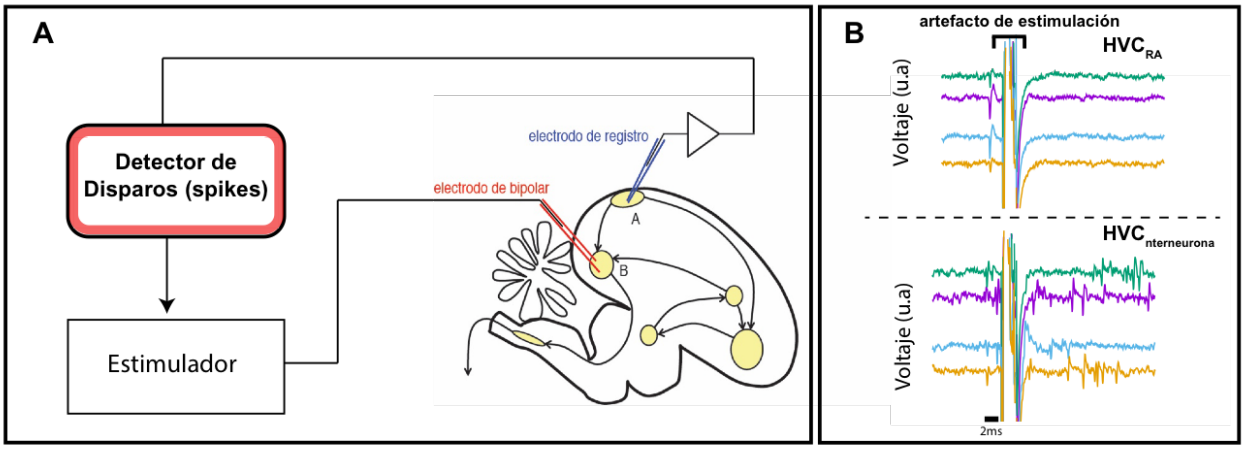


Figura 0.R: Protocolo es Colisión Antidrómica. (A) Esquema del circuito utilizado. (B) Diferencias entre el efecto de colisión antidrómica en neuronas proyectoras (HVC_{RA}) y en interneuronas ($HVC_{interneurona}$).

Recapitulando, este experimento permitió discriminar entre neuronas proyectoras a RA (Colisión Positiva) de neuronas proyectoras a Área X o interneuronas. Sumado a esto, se ha reportado que los distintos tipos neuronales presentes en el núcleo HVC de Diamantes Mandarines, pueden distinguirse por forma de sus disparos (Rauske, Shea, & Margoliash, 2003). En este trabajo los autores reportan que los distintos grupos neuronales (HVC_{RA} – HVC_X y $HVC_{interneurona}$) tienen características distintivas en sus potenciales de acción. Valiéndonos de esta caracterización, reprodujimos las mediciones para los distintos disparos de neuronas de las cuales teníamos información sobre colisión antidrómica. En la Figura 0.S se muestran los distintos parámetros que calculamos. Luego, para cada categoría (colisión positiva y colisión negativa), obtuvimos la probabilidad de que un disparo con un cierto valor de los parámetros (*ancho 1*, *ancho 2*, *ancho 3*) correspondiera a cada categoría (Figura 0.S, histogramas).

Los resultados obtenidos fueron congruentes con trabajos anteriores, donde se muestra que las neuronas proyectoras tienen potenciales de acción de mayor duración que las interneuronas (Mooney, 2000; Rauske et al., 2003). En nuestros datos esta tendencia se observa para todas las longitudes calculadas, dónde las neuronas identificadas como HVC_{RA} tienden a tener potenciales de acción de mayor duración. En particular, el *ancho 2* es el parámetro que mejor separa las dos categorías (Colisión Positiva y Colisión Negativa).

En resumen, los resultados indican que el 66% de las neuronas muestreadas, que proyectan a RA, tienen potenciales de acción con un *ancho2* mayor o igual a 0.6 ms; de igual manera, las neuronas que no proyectan a RA (interneuronas y proyectoras a Área X) tienen sólo un 12% de probabilidades de poseer esta característica en la forma de sus disparos.

2.12.4 Resumen final e Interpretación de los registros de actividad neuronal

Obtuvimos registros de actividad neuronal de 11 canarios, logrando separar un total de 141 neuronas que corresponden a *clústeres* diferentes; en 4 aves realizamos los protocolos de estimulación antidrómica y en 1 de ellas conseguimos también realizar mediciones exitosas de colisión antidrómica.

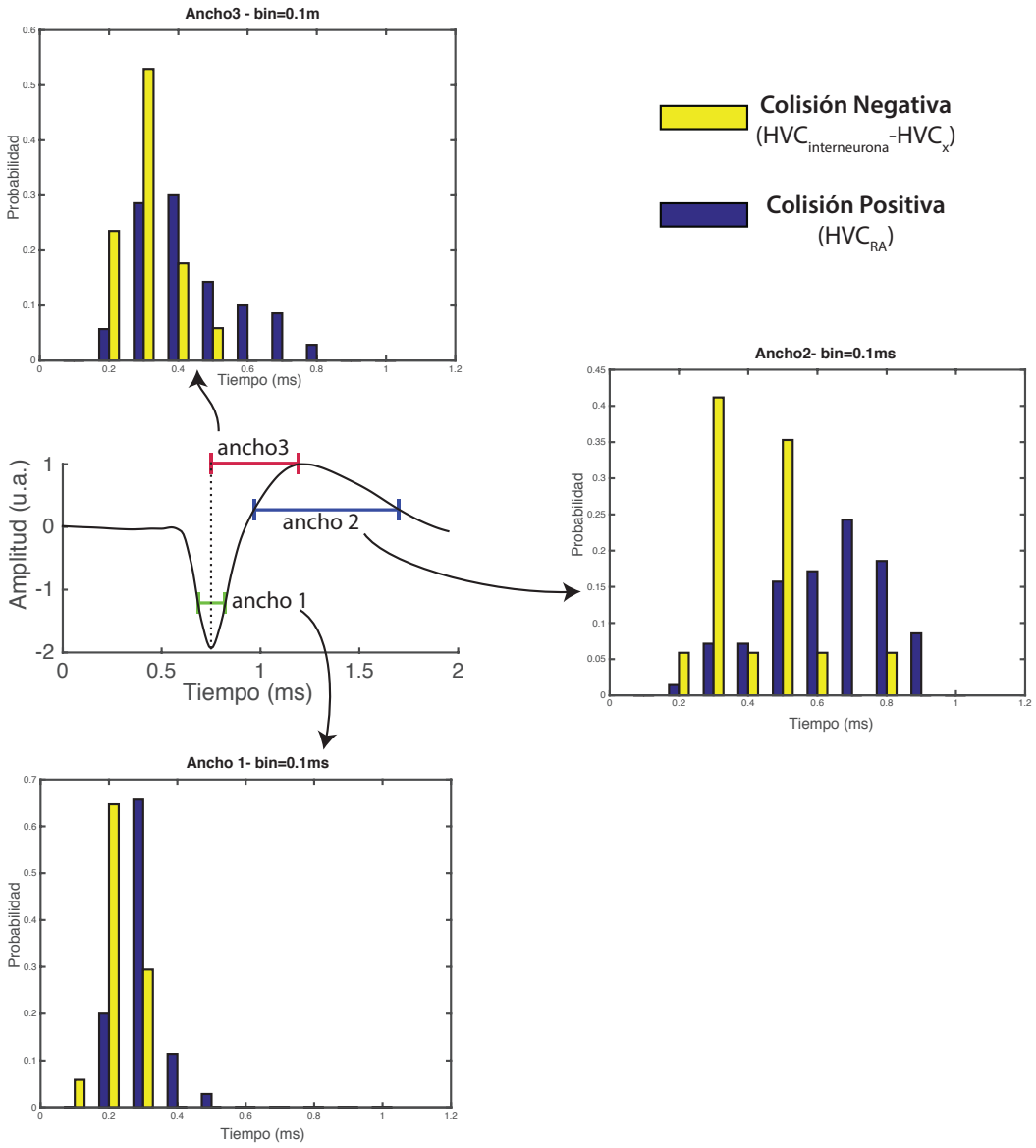


Figura 0.S: Cuantificación de características distintivas en los tipos neuronales. En el panel central se muestra la forma del disparo de una neurona proyectora a RA (HVC_{RA}) cuya amplitud fue normalizada entre 0 y 1. Para cada disparo registrado en los experimentos de colisión antidrómica, calculamos distintos parámetros que dan cuenta de la forma del potencial de acción (ancho1, ancho2 y ancho3). Luego, obtuvimos la distribución de estos parámetros según las distintas categorías (Colisión Negativa y Colisión Positiva), que se ilustran en los histogramas.

Luego utilizamos la información obtenida por la cuantificación de las formas de los potenciales de acción (Figura 0.S), para hacer una clasificación estimativa de los distintos *clústeres* registrados en el total de los experimentos. En esta clasificación, las neuronas cuya forma del potencial de acción se caracteriza por tener un *ancho2* mayor a 0.6ms fueron consideradas putativamente proyectoras a RA (HVC_{RA}). Por otro lado, basándonos en los experimentos de Rauske y colaboradores, clasificamos a los clústeres caracterizados por disparos de corta

duración (ancho2<0.3ms) como interneuronas. Quedando una población sin identificar (0.3<ancho2<0.6). Finalmente, distinguimos entre neuronas Selectivas y No Selectivas al canto propio. La información se resume en la siguiente tabla:

Tipo Neuronal	**Selectivas**	**No selectivas**	**Total**
HVC_{RA}	18	22	40
$HVC_{interneurona}$	47	12	59
Indefinido	32	10	42
Total	97	44	141

Tabla 2: Resumen de la actividad de neuronas de HVC registradas.

Como se puede ver en la Tabla 2, aproximadamente un 30% de las neuronas registradas han podido ser clasificadas como HVC_{RA}. A su vez, si tenemos en cuenta aquellas selectivas al canto propio, la reducción es aún mayor (≈12%).

Ahora bien, en este capítulo presentamos un modelo neuronal alternativo al *modelo del reloj* que se diferencia en varias cuestiones. Por ejemplo, plantea que en HVC se observan heterogeneidades en la actividad de neuronas que proyectan a RA. Estos patrones de actividad reflejan la influencia de la entrada de disparos provenientes de núcleos del rombencéfalo, los cuales se manifiestan como una actividad rala en HVC que se suma a una actividad basal homogénea (representada por los parámetros constantes ρ). Si bien esta predicción del modelo indica que han de existir distintos patrones de actividad asociados a transiciones entre gestos de tipo P1 y Pulsátiles, las heterogeneidades deberían ser más evidentes en el caso de las sílabas de tipo P0, las cuales según el modelo se generan a partir de la combinación de una entrada directa de parte de IA hacia los núcleos que controlan la expiración y de la actividad procesada por núcleos telencefálicos (HVC-RA). Debido a esto, nos hemos enfocado en cuantificar la actividad de neuronas proyectoras de HVC a RA, con evidente selectividad a sílabas de tipo P0.

En los distintos registros reportados aquí, así como en una gran cantidad de los registros obtenidos para varias neuronas o de neuronas únicas, resulta evidente que existe una mayor probabilidad de disparo de neuronas en las sílabas de tipo P0, preferentemente luego del pulso de sonido inicial (Figura 0.N, Figura 0.O y Figura 0.P). Sin embargo, como mencioné anteriormente las predicciones del modelo se refieren sólo a aquellas neuronas que proyectan *río abajo* en la vía motora (HVC_{RA}). Debido a esto, independientemente del grado de sincronización que pueda tener el núcleo (como se observa en la Figura 0.P), nos dedicamos a cuantificar el tiempo en que disparan las neuronas (putativamente) proyectoras a RA. Al hacer esto se redujo aún más el número de neuronas obtenidas, ya que del conjunto de HVC_{RA}

selectivas al canto propio, estudiamos la respuesta selectiva a sílabas de tipo P0. Para cada una de ellas, obtuvimos los Histogramas Temporales Post- estímulo (o PSTH) y calculamos el tiempo en que se obtiene un máximo, normalizando el tiempo al largo total de la sílaba. De esta manera, pudimos incluir en el análisis 8 neuronas correspondientes a 6 canarios distintos, que manifestaron respuesta selectiva a un total de 20 sílabas de tipo P0. Al hacer esto obtuvimos que el promedio de disparos se concentra en el primer tercio de la sílaba (tiempo normalizado promedio 0.33, desvío estándar 0.16). En la Figura 0.T, se muestran los resultados obtenidos.

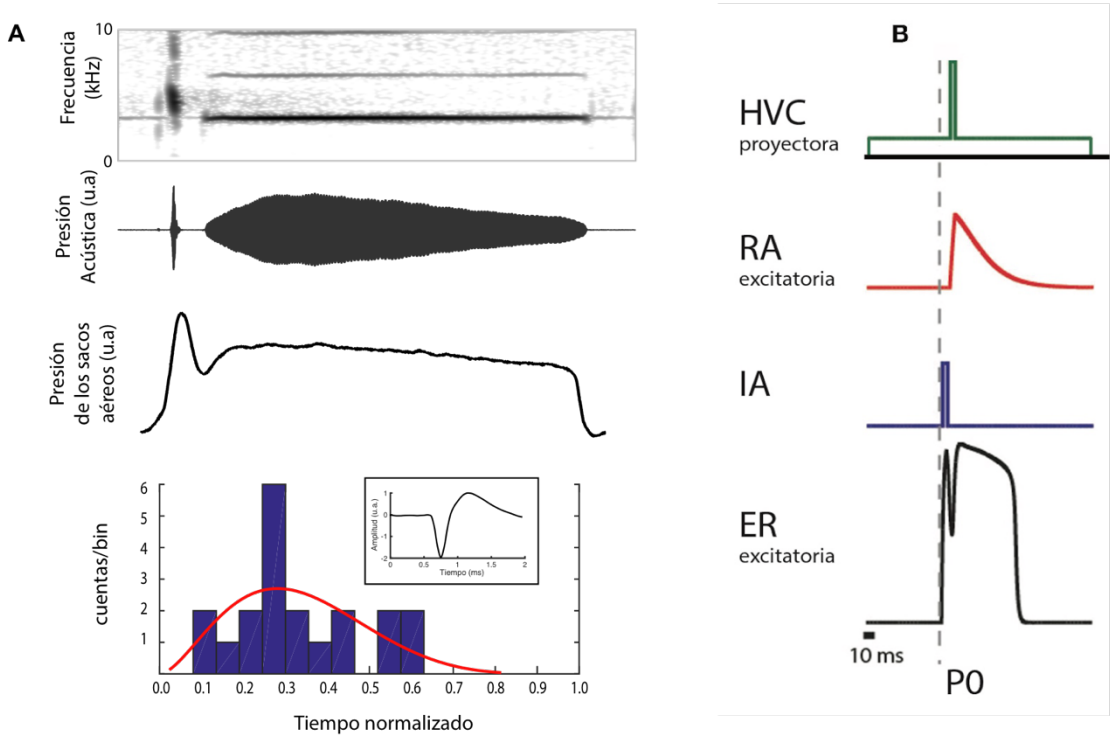


Figura 0.T. Respuesta selectiva de neuronas (putativamente) HVC_{RA}, a sílabas de tipo P0. (A. Primer Panel) Sonograma de una sílaba de tipo P0 canónica. (A. Segundo Panel) presión acústica de la misma. (A. Tercer Panel) Gesto de presión de los sacos aéreos. (A. Cuarto Panel) Histograma de cuentas/bin de los tiempos de disparo de las neuronas HVC_{RA}, respecto al tiempo normalizado al ancho de cada sílaba (entre 0 y 1). Promedio: 0.33, desvío estándar: 0.16, moda:0.25 y mediana:0.29. La curva roja corresponde a un ajuste de los datos a una distribución de tipo beta, con parámetros α=2.7778 y β=5.5503 (intervalo de confianza de 95% de α(1.3601;5.6.6734) y β(2.6400;11.6625). Esta curva se diferencia de una distribución normal (homogénea) cuyos parámetros de ajuste son α=β=1 (intervalo de confianza de 95% de α(0.5807;2.318) y β(0.5836;2.3310), tiempo medio: 0.4993, desvío estándar:0.2871. (B) Predicciones del *modelo circular* respecto a la actividad de los distintos núcleos en la generación de sílabas de tipo P0 (extracto de Figura 0.K).

2.13 Consideraciones finales

En este capítulo hemos descripto el modelo neuronal para el control de las vocalizaciones en aves oscinas más establecido en la literatura, conocido como modelo del reloj (Hahnloser, Kozhevnikov, & Fee, 2002a; Long & Fee, 2008) (sección 2.8.1). Luego, discutimos las evidencias experimentales que lo soportan, así como sus deficiencias y el conjunto de datos que contradicen ciertas predicciones del modelo. Seguidamente, hemos propuesto un modelo alternativo para el control motor, conocido como modelo circular (R. G. Alonso, Trevisan, Amador, Goller, & Mindlin, 2015b) (sección 2.10).

Éste modelo fue construido basándose en una arquitectura neuronal minimal capaz de reproducir los gestos de presión de los canarios. Como punto de partida, nos basamos en los circuitos neuronales que son evolutivamente más antiguos y se encuentran en todas las aves (es decir, una red de núcleos del rombencéfalo como DM, Ram y Pam), que están involucrados tanto en la generación de cantos aprendidos como de vocalizaciones innatas (Liu et al., 2013).

A su vez, este modelo reconcilia muchas de las evidencias experimentales presentes en la literatura (sección 2.8.2) y plantea que el control motor del canto requiere de la acción conjunta de varios núcleos presentes en la vía motora (sección 2.7.2). Como el modelo es operacional y da cuenta de las actividades medias de los distintos núcleos presentes en el circuito vocal, tiene predicciones específicas. En particular, el modelo es capaz de reproducir los resultados obtenidos por Goldín y colaboradores en los experimentos de enfriamiento del núcleo HVC en canarios cantando (Goldin et al., 2013; Goldin & Mindlin, 2017) (Figura 0.L). A su vez, genera predicciones acerca de la actividad de las neuronas proyectoras de HVC a RA, durante la ejecución de los gestos motores (Figura 0.K).

Desde el punto de vista experimental, hemos implementado distintas técnicas de medición neuronal: Mediciones de varias neuronas, experimentos de estimulación Antidrómica y de Colisión Antidrómica. En su conjunto, los resultados experimentales son coherentes con las predicciones del modelo. Por ejemplo, en las señales de varias neuronas obtenidas, observamos una alta sincronización interhemisférica, así como evidentes picos en los histogramas asociados a transiciones entre gestos motores y, en particular, máximos en los histogramas ligados a instancias significativas de los gestos de presión de tipo P0 (Figura 0.N).

Finalmente, concluimos esta sección realizando una cuantificación de la probabilidad de disparo de neuronas que fueron clasificadas como putativamente proyectoras a RA (HVC_{RA}), que presentaron selectividad a cantos propios con sílabas de tipo P0. Según el modelo, estas sílabas se generan por la acción mancomunada de una entrada directa por parte del área iniciadora (IA, putativamente DM) hacia los núcleos que controlan los músculos expiratorios (ER) y una entrada procesada por los núcleos telencefálicos (HVC-RA), de dinámica más lenta. Entonces, la actividad de las neuronas del tipo HVC_{RA}, presentaría heterogeneidades en la probabilidad de

disparo con un pico luego del primer máximo de presión. Cabe reiterar que, en un protocolo auditivo, la actividad registrada tendrá un retraso de entre 15-30ms respecto del inicio del estímulo. Debido a esto, es de esperarse que este pico en la actividad de HVC presente un cierto retraso. Dicho esto, como se puede observar en la Figura 0.T, estas neuronas disparan preferentemente en el primer tercio de la sílaba, lo cual se condice con las predicciones del modelo.

3 MODELO INTEGRADO

En los capítulos anteriores exploramos por separado el funcionamiento del aparato periférico y de los distintos circuitos neuronales asociados a la generación de los gestos de presión. Por un lado, vimos que para generar sonidos con características acústicas específicas el ave debe coordinar delicadamente distintas variables fisiológicas como la presión de los sacos aéreos y la tensión de los labios (R. Alonso et al., 2014). Por otro lado, propusimos un modelo alternativo para la vía motora donde la actividad de distintos núcleo distribuidos por el cerebro contribuyen a la generación de los gestos de presión (R. G. Alonso, Trevisan, Amador, Goller, & Mindlin, 2015a).

En este capítulo describiré un modelo integrador en el cual ambas escalas del problema están representadas y cuya salida será un canto sintético con características acústicas similares a las obtenidas experimentalmente. Es decir, completamos el modelo incluyendo los núcleos que serán responsables del control de la musculatura siríngea (R. G. Alonso, Amador, & Mindlin, 2016).

En la construcción de este modelo, hemos utilizado la información recogida de la periferia a través de las mediciones de tensión del músculo vS y de la presión de los sacos aéreos, junto con el modelo de fonación propuesto en la sección 2.3. A su vez, por lo que se refiere al control neuronal, utilizamos como punto de partida el modelo circular (sección 2.10) y agregamos a su arquitectura el núcleo *nXII*, encargado de controlar la tensión muscular en la siringe. Con esta extensión en el modelo circular, probamos la hipótesis de que ajustando sólo los pesos relativos de las entradas (input) al núcleo *nXII*, los patrones de actividad de los distintos núcleos distribuidos asociados a cada gesto de presión, conducirán a *nXII* a generar las soluciones apropiadas (es decir, tensión de los distintos músculos siríngeos) para generar sonidos con una modulación temporal plausible de la frecuencia fundamental.

3.1 Arquitectura neuronal

El circuito de producción de canto en las aves oscinas incluye el núcleo dorsomedial (DM), que se proyecta hacia el circuito respiratorio ventral (núcleo retroambigualis, RAm y núcleo parambigualis, PAm) y el núcleo motor traqueosiringeo (nXII). Estas estructuras también se encuentran en aves no oscinas (Wild, Li, & Eagleton, 1997). Lo que probablemente permite que las aves oscinas generen vocalizaciones más complejas y ricas que las no oscinas, es un conjunto adicional de núcleos neuronales. En oscinos, DM se conecta a través de núcleo uvaeformis (Uva) en el tálamo al núcleo telencefálico HVC, que, a su vez, se conecta al robusto núcleo arcopalium (RA). RA proyecta hacia el circuito respiratorio y nXII, cerrando una vía indirecta que aún no se ha encontrado en las aves no oscinas. La Figura 3.A resume esta descripción. Vale la pena mencionar que al igual que en el *modelo circular*, otros núcleos neuronales podrían incluirse en esta descripción (ver Figura 1 en Ashmore, 2005) pero aquí consideramos la arquitectura neuronal mínima que exhibe conectividad en forma de bucle y que es capaz de generar el comportamiento apropiado, es decir, el canto.

En su conjunto la arquitectura propuesta se diferencia del *modelo circular* en la incorporación de los núcleos *nXII* y *PAm* y en la necesidad explicita de la bilateralidad. *PAm* es un núcleo del rombencéfalo asociado a la inspiración, activo durante períodos de silencio (Ashmore, 2005). Por otro lado *nXII* es un núcleo cuyas proyecciones inervan la musculatura siríngea. Éste núcleo controla la tensión de los distintos músculos como el *siringealis ventralis* (vS), que participa en la modulación de la frecuencia fundamental del canto, así como de los músculos traqueobronquialis ventralis (vTB) y traqueobronquialis dorsalis (dTB), cuya función permite modificar la separación de los labios siríngeos. A su vez, la incorporación de una representación bilateral del sistema del canto permite tener patrones de activación muscular diferentes de manera de poder emular el funcionamiento natural de la siringe.

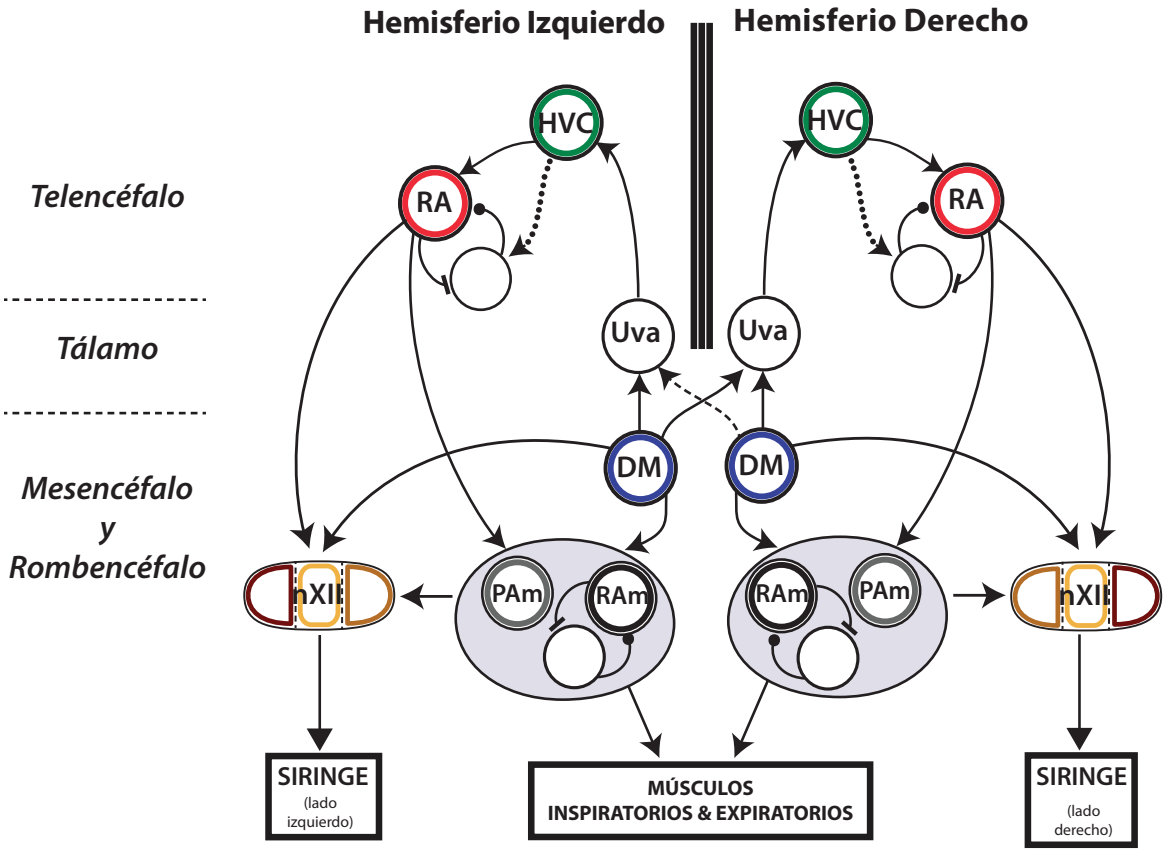


Figura 3.A: Arquitectura neuronal de la vía motora en las aves oscinas. Los círculos representan los núcleos que participan en nuestra descripción. Las flechas representan las conexiones entre diferentes núcleos. Las abreviaturas corresponden a las del texto. Tenga en cuenta la naturaleza bilateral y circular de la arquitectura del sistema de canción, una característica central del modelo presentado en este capítulo.

3.2 Implementación matemática del modelo neuronal

Las variables en nuestro modelo son las actividades promedio del conjunto de neuronas proyectoras de cada núcleo representado en la Figura 3.A. Del mismo modo que en el modelo circular (Sección 2.10), la falta de información sobre la fisiología de algunos de los núcleos del tronco encefálico impide asociar directamente algunas de las variables del modelo a ciertos núcleos: IA representa un área iniciadora (putativamente DM), ER e IR representan a los núcleos del circuito respiratorio (probablemente RAm y PAm, respectivamente). A su vez, nuevamente la dinámica de estas variables estará regida por modelos aditivos (Hoppensteadt & Izhikevich, 1997).

Matemáticamente, la actividad en el IA está representada por una función cuadrada de unos milisegundos de longitud. El círculo azul en la Figura 3.A representa la IA y su actividad es una de las dos entradas que llegan al área relacionada con la expiración. Representamos el paso a través del tálamo (Uva) retrasando la activación con respecto al pulso de actividad en el área de

iniciación. El círculo verde representa el núcleo HVC. En este caso, no escribimos un modelo para la dinámica de HVC. En cambio, proponemos que su actividad consiste en un nivel constante de actividad promedio (putativamente originada dentro del núcleo) y heterogeneidades consecuencias de los pulsos de entrada desde el rombencéfalo. Estos últimos se expresan matemáticamente como una función cuadrada de aproximadamente 20-40 ms de ancho, retardada con respecto al pulso de actividad en el rombencéfalo. Para dos clases de sílabas (soluciones pulsátiles y P1), la amplitud de las fluctuaciones de presión final podría ajustarse mejor si se incluyera una fluctuación adicional en la actividad de HVC (líneas discontinuas verdes, Figura 3.D y Figura 3.E). En términos de la descripción matemática, la dinámica de HVC, Uva e IA, fue incluida en los patrones de entrada de los núcleos a los cuales estos proyectan.

Las actividades que se calcularon (explícitamente) como soluciones de un sistema dinámico fueron las poblaciones excitatorias e inhibitorias en RA (e_{ra}, i_{ra}), las poblaciones excitatorias e inhibitorias del área relacionada con la expiración (e_{er}, i_{er}), la población excitatoria en el área relacionada con la inspiración (e_{ir}) y las poblaciones excitatorias de *nXII* (e_{nXIIvs}; $e_{nXIIdtb}$; $e_{nXIIvtb}$).

Matemáticamente, el modelo se escribe de la siguiente manera:

$$\begin{cases} \frac{de_{ra}}{dt} = 20(-e_{ra} + S(\rho_{e,ra} + \alpha_{era,Fd}F_d + \alpha_{era,era}e_{ra} + \alpha_{era,ira}i_{ra})) \\ \frac{di_{ra}}{dt} = 20(-i_{ra} + S(\rho_{i,ra} + \alpha_{ira,Fd2}F_{d2} + \alpha_{ira,era}e_{ra} + \alpha_{ira,ira}i_{ra})) \end{cases}$$

$$\begin{cases} \frac{de_{er}}{dt} = 250\ \left(-e_{er} + S\left(\rho_{e,er} + \alpha_{eer,ra}e_{ra} + \alpha_{eer,F}F + \alpha_{eer,eer}e_{er} + \alpha_{eer,ier}i_{er}\ \right)\right) \\ \frac{di_{er}}{dt} = 250\ \left(-i_{er} + S\left(\rho_{i,er} + \alpha_{ier,ra}e_{ra} + \alpha_{ier,eer}e_{er} + \alpha_{ier,ier}i_{er}\right)\right) \\ \frac{de_{ir}}{dt} = 250\ (-e_{ir} + S(\rho_{e,ir} + \alpha_{eir,ra}e_{ra} + \alpha_{eir,eer}e_{er})) \end{cases}$$

$$\begin{cases} \frac{de_{nXIIvs}}{dt} = 250\left(-e_{nXIIvs} + S\left(\rho_{e,nXII} + \alpha_{nXIIvs,\mathrm{F}nXII}F_{nXII} + \alpha_{nXIIvs,era}e_{ra} + \alpha_{nXIIvs,eer}e_{er} + \alpha_{nXIIvs,eir}e_{ir}\ \right)\right) \\ \frac{de^{i,d}_{nXdtb}}{dt} = 250\ \left(-e^{i,d}_{nXIIdtb} + S\left(\rho_{e,nXII} + \alpha^{i,d}_{nXIIdt\mathrm{b},FnXII}F_{nXII} + \alpha^{i,d}_{nXIIdtb,era}e_{ra}\right)\right) \\ \frac{de_{nXIIvtb}}{dt} = 250\ (-e_{nXIIvtb} + S(\rho_{e,nXII} + \alpha_{enXIIvtb,eir}e_{ir})) \end{cases}$$

donde $\alpha_{i,j}$ representan la influencia de la j-ésima población en la dinámica de la i-ésima población. Los parámetros ρ dan cuenta de las entradas (input) constantes a las poblaciones modeladas: $\rho_{e,ra}$ y $\rho_{e,ra}$ representan la entrada de una componente continua a la población

excitatoria e inhibitoria de RA respectivamente, que proviene de HVC. Los parámetros *F* representan las entradas asociadas con la actividad originada en el IA. En particular, *F* y F_{nXII} representan la entrada directa de IA al área relacionada con la expiración y *nXII* respectivamente, mientras que F_d es el componente indirecto de la entrada a RA que llega a través de HVC después de haberse originado en la IA. En nuestras simulaciones tanto F_d como F_{d2} representan ráfagas de actividad en el área que representa HVC. *F* se modela como una función cuadrada. F_{nXII} y F_d también son funciones cuadradas, pero se retrasan con respecto a *F*. Introducimos estas demoras para reflejar el tiempo necesario para que la actividad originada en la *IA* viaje al núcleo objetivo; siendo 10ms para F_{nXII} y 30ms para F_d. Observe que F_d tiene que viajar a través de Uva y HVC para alcanzar RA, mientras que F_{nXII} activa una conexión directa entre IA y nXII en el rombencéfalo (Figura 3.A). La altura de los pulsos se estableció en 10 (unidades arbitrarias) para todos los patrones simulados. El resultado de este sistema es la actividad de *nXIIvs*, la actividad de *nXIIdtb,* la actividad de *nXIIvtb* y la actividad del área relacionada con la expiración (*ER*). La actividad de *nXIIvs* afectará la configuración del órgano vocal aviar a través de la activación de los músculos intrínsecos que controlan la tensión de las membranas fonatorias. La actividad de *nXIIdtb* y *nXIIvtb* afectará la configuración del órgano vocal aviar a través de la activación de los músculos intrínsecos que controlan la separación de los labios siríngeos. El área expiratoria genera pulsos de presión expiratoria necesarios para la fonación (ver Sección 2.1 para una descripción completa de la siringe). La anatomía de esta vía es simétrica, con núcleos en el hemisferio izquierdo y derecho en el cerebro del ave. Para las soluciones de este modelo las actividades izquierda y derecha podrían estar sincronizadas o no para todos los núcleos, con la excepción de las actividades de las partes izquierda y derecha del núcleo *nXIIdtb*. Por este motivo, están explícitamente etiquetados como izquierdo o derecho ($e^{i,d}_{nXIIdtb}$).

3.3 Integrando actividad neuronal y biomecánica

En el Capítulo 2 (Sección 2.3) propuse un modelo dinámico de fonación para canarios, dónde la tensión de los labios y la presión de los sacos aéreos interactúan sinérgicamente para controlar la frecuencia fundamental de las vocalizaciones. Este modelo propone que la dinámica oscilatoria de las membranas fonatorias puede describirse de la siguiente manera:

$$\dot{x} = y$$

$$\dot{y} = -k(t)\gamma^2(x - \epsilon x^3) - [\beta(t)]\gamma y - cx^2\gamma y + \gamma^2 f_{add}(t) - \gamma^2 f_{abd}(t)\,.$$

dónde $x, \dot{x}$ y $\dot{y}$ corresponden al desplazamiento medio del labio, la velocidad y la aceleración, respectivamente. El parámetro *k(t)* da cuenta de la tensión de las membranas y *β(t)* de la presión de los sacos aéreos; los parámetros f_{add} y f_{abd} corresponden a las fuerzas de abducción y aducción que permiten controlar independientemente la fonación en cada lado de la siringe.

Finalmente, γ corresponde a un factor de rescaleo, c a la constante de disipación no lineal y ϵ a la constante de restitución no lineal.

Ahora bien, las salidas del modelo neuronal son señales temporales correspondientes a la actividad media del núcleo expiratorio ER (e_{er}) y de *nXII,* cuya actividad se desglosa en e_{nXIIvs}, $e_{nXIIdtb}$ y $e_{nXIIvtb.}$ Estos núcleos poseen neuronas motoras que inervan a los músculos expiratorios y a la siringe. En este modelo asumimos que los patrones de contracción de los distintos músculos siguen pasivamente la actividad de los núcleos neuronales que los inervan. Valiéndonos de esto, podemos vincular los parámetros biomecánicos con las actividades neuronales de la siguiente manera:

$$\kappa(t) = e_{nXIIvs}$$

$$\beta(t) = e_{er}$$

$$f_{add} = e_{nXIIdtb}$$

$$f_{abd} = e_{nXIIvtb}$$

La siringe es una estructura bipartita. Los lados izquierdo y derecho de la siringe tienen cada uno un par de labios que se pueden poner en movimiento y controlar de forma independiente. En el caso del canario, las vocalizaciones de alta frecuencia se generan con el lado derecho (frecuencias fundamentales superiores a 3,5kHz, aproximadamente), y las vocalizaciones de baja frecuencia se generan con el lado izquierdo (Roderick A Suthers, Vallet, Lie Tanvez, & Kreutzer, 2004). Las ecuaciones anteriores describen la dinámica labial de un lado. Se supone que ambos labios de cada lado tendrán dinámicas opuestas y sincronizadas. Por lo tanto, para cada lado de la siringe, solo se usa una variable para describir las modulaciones del flujo de aire a través de ese lado de la siringe. En nuestras simulaciones, ambas fuentes de sonido están *a priori* activas. Por lo que, el lado de la siringe que está realmente generando sonido depende de los valores de la activación de los músculos vTB y dTB. De esta forma, no solo intentamos probar la hipótesis de que e_{nXIIvs} y ER, con todas sus restricciones, son capaces de generar las modulaciones de frecuencia correctas, sino que, $e_{nXIIdtb}^{i,d}$ y $e_{nXIIvtb}$, con todas sus restricciones, también son capaces de generar patrones de actividad acordes para generar vocalizaciones tanto unilaterales como bilaterales.

3.4 Resultados

A continuación, se muestran 4 ejemplos de sílabas correspondientes a los distintos tipos de patrones de presión característicos de los canarios domésticos: P0, P2, Pulsátiles y P1. En cada caso exploramos las soluciones del sistema dinámico comenzando con los valores de pesos sinápticos ($\alpha_{i,j}$) utilizados previamente en el modelo circular para reproducir los gestos de presión (Sección 2.10). Luego, seleccionamos una sílaba representativa (de cada gesto) e

integramos el modelo variando los parámetros ($\alpha_{nXIIvs,FnXII}$, $\alpha_{nXIIvs,era}$, $\alpha_{nXII,eer}$ y $\alpha_{nXII,ier}$) entre (0,0,0,0) y (10,10,10,-10). Para cada set de $\alpha_{nXIIvs,j}$, integramos el modelo biomecánico y usamos las señales temporales e_{er}, e_{nXIIvs}, $e_{nXIIdtb}$ y $e_{nXIIvtb}$, para generar canto sintético. Las versiones sintéticas y experimentales fueron comparadas cualitativamente: una sílaba era considerada una buena copia sintética si compartía con su contraparte experimental la misma duración y modulación temporal de la frecuencia fundamental. Luego hicimos una comparación cuantitativa utilizando un programa de análisis de señales Sound Analysis Pro Software (Tchernichovski, Nottebohm, Elizabeth, Pesaran, & Pratim Mitra, 2000).

Cabe destacar que los sistemas nolineales presentan soluciones cualitativamente distintas dentro de regiones amplias del espacio de parámetros. Por lo tanto, los parámetros que se presentan en esta sección son cualitativos en el sentido de que representan soluciones con las características que quisimos reproducir.

3.4.1 P0

En los canarios domésticos las sílabas con patrones de presión del tipo P0, se caracterizan por tener un sonido de larga duración (del orden de los 200ms) y frecuencia constante, precedido por un pequeño pulso de sonido (asociado al primer pico del gesto de presión), generalmente de alta frecuencia. Estas sílabas son generadas bilateralmente: la modulación rápida de alta frecuencia se produce con el lado derecho de la siringe y el tono con el lado izquierdo (Roderick A. Suthers, Vallet, Tanvez, & Kreutzer, 2004). En la Figura 3.B(a) mostramos el sonograma de un archivo de sonido en el que se registró un conjunto de tres sílabas. La frecuencia silábica es muy baja (alrededor de 2.85 Hz) y corresponde a patrones respiratorios que clasificamos como soluciones P0 (Alliende et al., 2010).

En el modelo circular, el gesto de presión de tipo P0 se gesta a partir de la combinación de la estimulación directa desde núcleos del rombencéfalo y del telencéfalo. El patrón comienza con la activación directa de ER a partir de un pulso proveniente de IA. El área de iniciación (IA) también se proyecta hacia arriba a través del tálamo (Uva) hacia el telencéfalo. Por lo tanto, el mismo pulso es responsable de la actividad en HVC y RA en tiempos posteriores. RA proyecta al área relacionada con la expiración (ER). De esta forma, el patrón respiratorio consiste en una rápida fluctuación y una lenta modulación, siendo esta última el resultado del procesamiento telencefálico del pulso generado en la IA (Figura 3.B(b), trazas negras).

El mismo pulso en el área de inicio es responsable de los patrones de actividad en otros núcleos de la vía motora, como el núcleo *nXII* que afecta los parámetros biofísicos que controlan la siringe. En este modelo, suponemos que la variable e_{nXIIvs} toma los mismos valores en los lados izquierdo y derecho, y está asociado a la tensión de los labios ($k(t)$). Los valores de $e_{nXIIdtb}^{i,d}$ y $e_{nXIIvtb}$ corresponden a los patrones de actividad responsable de la aducción y abducción activa

de la siringe (f_{abd} y f_{add}). Aquí, los patrones $e^{i,d}_{nXIIdtb}$ de la izquierda y la derecha deben ser diferentes para producir sílabas bilaterales.

En este modelo, la actividad e_{nXIIvs} emerge de las soluciones de un sistema dinámico forzado de forma directa por un pulso excitatorio proveniente de IA, e indirectamente por la entrada de un estímulo excitatorio proveniente de RA y por la actividad de neuronas excitatorias de los núcleos IR y ER relacionados con la inspiración y expiración, respectivamente (Figura 3.B(b), flechas que apuntan al núcleo *nXII*). Esta representación se fundamenta en conexiones anatómicas entre los núcleos del circuito respiratorio ventral, RA y el núcleo *nXII* (Sturdy, Wild, & Mooney, 2003). Las señales temporales obtenidas se muestran en la Figura 3.B(b).

Los patrones de activación de los músculos asociados a la aducción y abducción activa de los labios siríngeos fueron generados de la siguiente manera: 1) en el caso de *nXIIdtb* el pulso inicial de actividad (F_{nXII}) proveniente de IA, activa la subpoblación $e^{i}_{nXIIdtb}$. Esto genera un patrón de activación rápido en el lado izquierdo de la siringe. Por otro lado, el mismo pulso activa a la subpoblación del lado contralateral ($e^{d}_{nXIIdtb}$) a través de Uva, HVC, RA del hemisferio derecho. De esta manera, el lado derecho de la siringe es capaz de producir el primer fragmento de la sílaba (modulación de alta frecuencia fundamental), mientras que los labios del lado izquierdo están siendo aducidos por el músculo dTB correspondiente. De modo similar, en la segunda parte de la sílaba el lado derecho se encontrará silenciado por la actividad de la subpoblación $e^{i}_{nXIIdtb}$, lo cual permite que el lado izquierdo produzca el largo tono de frecuencia constante. 2) En el caso de *nXIIvtb*, la población $e_{nXIIvtb}$ recibe una entrada excitatoria de RA y del núcleo IR, que lleva a un patrón de activación sincronizado con la inspiración. Esta activación genera la abducción activa de los labios, durante la fase inspiratoria entre cada sílaba.

Cabe destacar que la generación del patrón respiratorio adecuado restringe dramáticamente las posibles soluciones de las poblaciones de *nXII*. De hecho, la actividad de este núcleo está severamente restringida por todos sus aferentes y sólo podemos ajustar el peso relativo de las entradas a este núcleo. Lo interesante es que incluso con estas restricciones, el modelo es capaz de reproducir patrones compatibles con las variables que controlan la tensión de los labios y la apertura/cierre del lumen siríngeo.

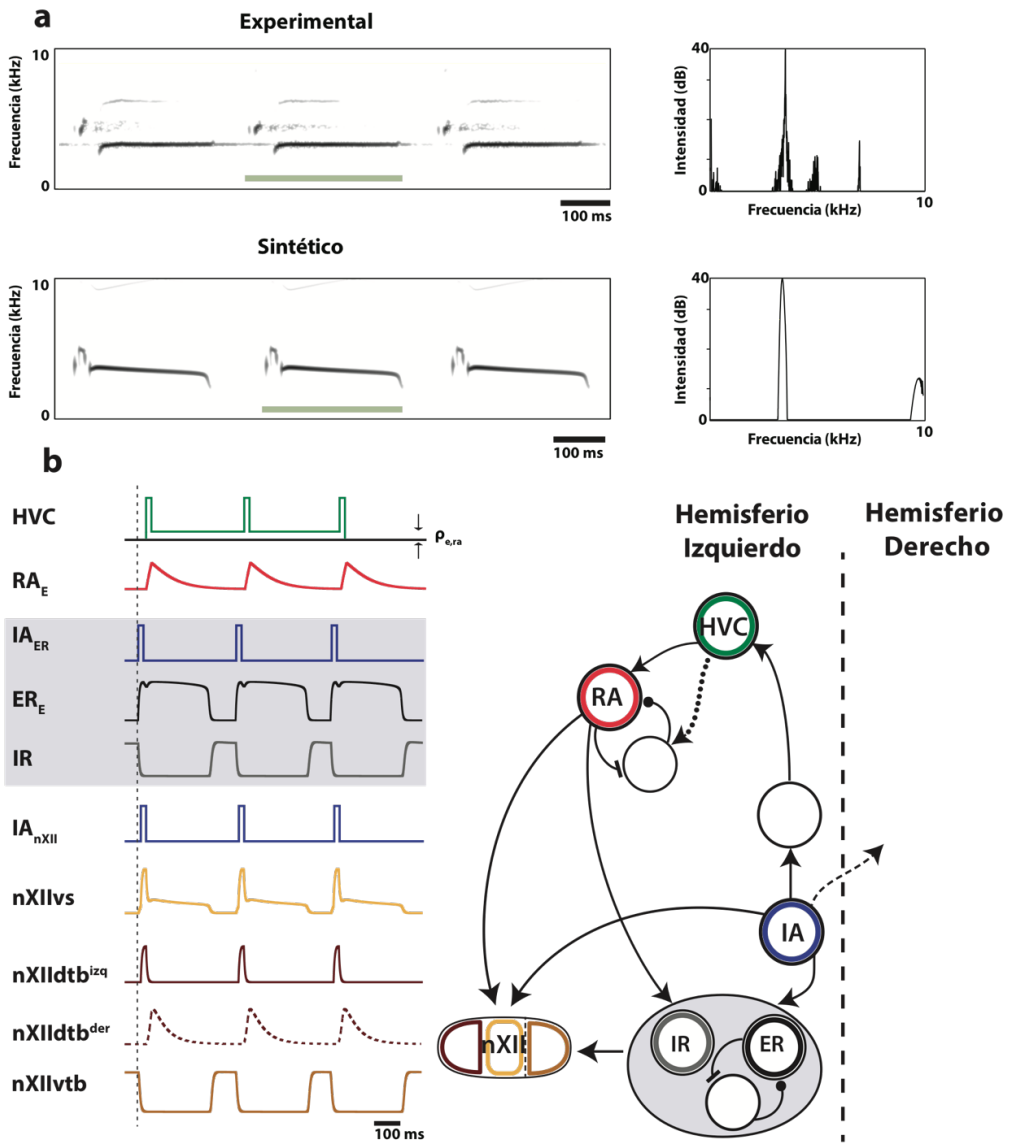


Figura 3.B: Sílabas de tipo P0, reproducidas con el modelo integrado. (a) (Panel superior izquierdo) Sílabas experimentales de tipo P0. (Panel superior derecho) contenido espectral de la porción del sonograma indicada con la barra verde. (Panel inferior izquierdo) Versión sintética generada por el modelo integrado. (Panel inferior derecho), contenido espectral del sonido producido, indicado con la barra verde. (b) (Izquierda) Señales temporales de los distintos núcleos de la vía motora involucrados en la generación de estas sílabas. (Derecha) diagrama de los núcleos de la vía motora. Las flechas indican las conexiones entre los distintos núcleos.

Los parámetros necesarios para reproducir estas simulaciones son los siguientes:

$$(\rho_{e,ra}, \alpha_{era,Fd}, \alpha_{era,era}, \alpha_{era,ira}) = (-3.4, 5, 6, -3)$$

$$(\rho_{i,ra}, \alpha_{ira,Fd2}, \alpha_{ira,era}, \alpha_{ira,ira}) = (-7, \quad 0, 6, 3)$$

$$(\rho_{e,er}, \alpha_{eer,ra}, \alpha_{eer,F}, \alpha_{eer,eer}, \alpha_{eer,\text{ier}}) = (-7.45, 10, 1, 10, -1.1)$$

$(\rho_{i,er}, \alpha_{ier,\mathrm{ra}}, \alpha_{ier,\mathrm{eer}}, \alpha_{ier,\mathrm{ier}}) = (-11.5, 0, 10, 2)$

$(\rho_{e,\mathrm{ir}}, \alpha_{eir,\mathrm{ra}}, \alpha_{eir,\mathrm{eer}}) = (0, 10, -10)$

$(\rho_{e,nXII}, \alpha_{nXIIvs,FnXII}, \alpha_{\mathrm{nXIIvs,era}}, \alpha_{\mathrm{nXIIvs,eer}}, \alpha_{\mathrm{nXIIvs,eir}}) = (-3, 1, 0.5, 0.5, 0)$

$(\rho_{e,nXII}, \alpha^{d}_{nXIIdtb,FnXII}, \alpha^{d}_{nXIIdtb,era}) = (-3, 0, 10)$

$(\rho_{e,nXII}, \alpha^{i}_{nXIIdtb,FnXII}, \alpha^{i}_{nXIIdtb,era}) = (-3, 1, 0)$

$(\rho_{e,nXII}, \alpha_{enXIIvtb,\mathrm{eir}}) = (-3, 10)$

3.4.2 P2

Las sílabas de tipo P2 tienen una frecuencia silábica que va desde los 5 a los 12Hz (Alliende et al., 2010). Generalmente este tipo de sílabas presentan amplias modulaciones de la frecuencia fundamental y son producidas bilateralmente, aunque existen casos de P2 producidas por sólo un lado de la siringe. En la Figura 3.C, se muestra un registro de 8 repeticiones de una sílaba P2. En cada sílaba, el primer sonido es generado por el lado derecho, seguido de un fragmento donde la frecuencia fundamental decrece (downsweep) generado por el lado izquierdo. El gesto de presión se caracteriza por tener un mínimo local entre dos máximos (Figura 3.C (b), trazas negras).

El modelo reproduce este tipo de sílabas del mismo modo que en el caso de las P0. El mecanismo es el siguiente: un pulso iniciador de IA genera un primer pico en el gesto respiratorio y en la dinámica del núcleo *nXIIvs*. Luego, una copia eferente del impulso es procesada por los núcleos del telencéfalo, produciendo la segunda modulación en *ER* y *nXIIvs* (modulación lenta). Por otro lado, el patrón asociado a la aducción de los labios tendrá una componente rápida del lado izquierdo producto de la activación directa (*IA-nXIIdtb$_i$*), y una modulación lenta en el núcleo contralateral luego de activar los núcleos telencefálicos del hemisferio derecho (*IA-Uva$_d$-HVC$_d$-RA$_d$-nXIIdtb$_d$*). De esta manera, los labios de la porción derecha de la siringe producen el primer fragmento del sonido y luego son aducidos por la acción del músculo dTB ($e^{d}_{nXIIdtb}$). Contrariamente, el lumen del lado izquierdo se encuentra inicialmente cerrado por la contracción rápida del músculo dTB generada por $e^{i}_{nXIIdtb}$. Luego, éste músculo se relaja y el lado izquierdo produce el segundo fragmento de la sílaba. Finalmente, hacia el final de la sílaba y en fase con la inspiración, se produce la activación de *nXIIvtb*. En la Figura 3.C(b) se muestran las señales temporales de cada uno de estos núcleos.

Los parámetros utilizados para las simulaciones se muestran en la siguiente lista:

$(\rho_{e,ra}, \alpha_{era,Fd}, \alpha_{era,\mathrm{era}}, \alpha_{era,\mathrm{ira}}) = (-3.83, 1, 5, -10)$

$(\rho_{i,ra}, \alpha_{ira,Fd2}, \alpha_{ira,\mathrm{era}}, \alpha_{ira,\mathrm{ira}}) = (-7, 0, 10, 8)$

$$(\rho_{e,er} , \alpha_{eer,ra}, \alpha_{eer,F} , \alpha_{eer,eer} , \alpha_{eer,\mathrm{ier}}) = (-7.45, 9, 1, 9.85, -5.25)$$

$$(\rho_{i,er} , \alpha_{ier,\mathrm{ra}}, \alpha_{ier,\mathrm{eer}} , \alpha_{ier,\mathrm{ier}}) = (-11.5, 9.45, 9, 1.6)$$

$$(\rho_{e,\mathrm{ir}} , \alpha_{eir,\mathrm{ra}}, \alpha_{eir,\mathrm{eer}}) = (-2, 10, -10)$$

$$(\rho_{e,nXII} , \alpha_{nXIIvs,FnXII}, \alpha_{\mathrm{nXIIvs,era}} , \alpha_{\mathrm{nXIIvs,eer}} , \alpha_{\mathrm{nXIIvs,eir}}) = (-3, 1, 3, 3, 0)$$

$$(\rho_{e,nXII}, \alpha^{d}_{nXIIdtb,FnXII}, \alpha^{d}_{nXIIdtb,era}) = (-3, 0, 10)$$

$$(\rho_{e,nXII}, \alpha^{i}_{nXIIdtb,FnXII}, \alpha^{i}_{nXIIdtb,era}) = (-3, 1, 0)$$

$$(\rho_{e,nXII}, \alpha_{enXIIvtb,\mathrm{eir}}) = (-3, 10)$$

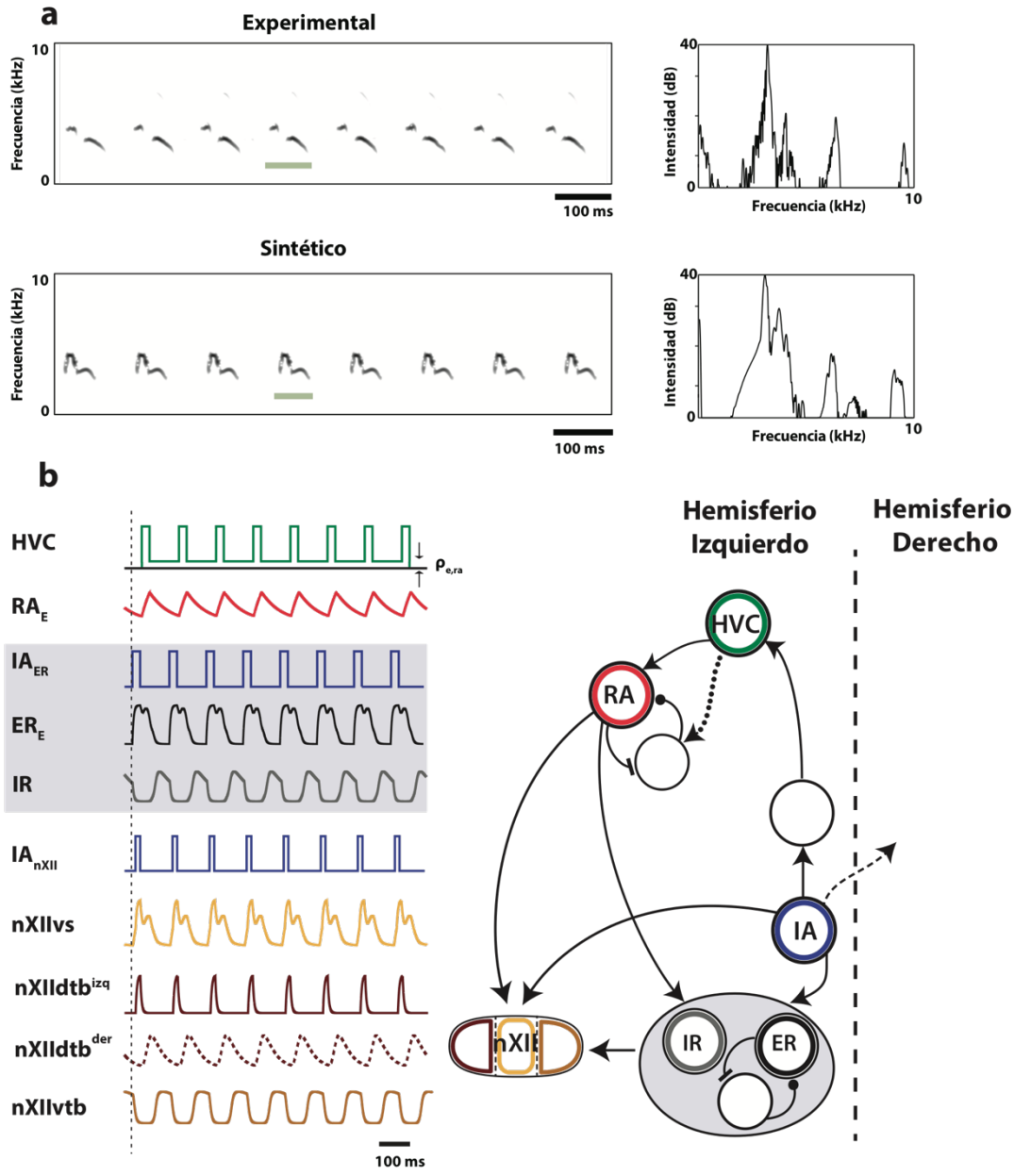


Figura 3.C: Soluciones de tipo P2 del modelo integrado. (a) (Panel superior izquierdo) Sílabas experimentales de tipo P0. (Panel superior derecho) contenido espectral de la porción del sonograma indicada con la barra verde. (Panel inferior izquierdo) Versión sintética generada por el modelo integrado. (Panel inferior derecho), contenido espectral del sonido producido, indicado con la barra verde. (b) (Izquierda) Señales temporales de los distintos núcleos de la vía motora involucrados en la generación de estas sílabas. (Derecha) diagrama de los núcleos de la vía motora. Las flechas indican las conexiones entre los distintos núcleos.

3.4.3 P1

Las sílabas llamadas P1, son muy comunes en los repertorios de los canarios. Se caracterizan por presentar un patrón de presión con oscilaciones cuasi armónicas. Las sílabas son unilaterales y tienen una frecuencia silábica intermedia que va desde los 13 a los 25Hz. En la Figura 3.D(a) se muestra un registro de 12 repeticiones de una sílaba de tipo P1, con frecuencia fundamental decreciente (downsweep).

La forma en que generamos versiones sintéticas de este tipo de sílabas es cualitativamente distinta a las sílabas anteriores (P0 y P2). En este caso los gestos de presión (e_{er}) se generan a través de la actividad modulada por los núcleos del telencéfalo, mientras que la entrada directa no es necesaria. Básicamente, el pulso iniciador viaja a través de Uva a HVC, hasta RA dónde licita un patrón de activación tal que produce oscilaciones en las áreas asociadas a la expiración (ER). Del mismo modo que en el modelo circular (Sección 2.10), oscilaciones adicionales en la dinámica de HVC generan soluciones cualitativamente similares (ver Figura 3.D(b), líneas verdes punteadas). Lo mismo ocurre con los patrones que modifican la tensión labial (e_{nXIIvs}). Éste núcleo recibe entradas excitatorias tanto de RA como de los núcleos del circuito respiratorio (*ER* e *IR*), siendo innecesario el aporte directo de IA.

Por otro lado, dado que las sílabas son unilaterales y que en este modelo suponemos que la actividad de *nXIIvs* es simétrica, es necesario que el lado derecho de la siringe se encuentre inactivo. Debido a esto, proponemos que la actividad del núcleo RA del hemisferio derecho actúa activando la subpoblación del núcleo *nXII* asociada al músculo dTB ($e^{d}_{nXIIdtb}$), generando un patrón de contracción tal que los labios estén aducidos durante todo el gesto respiratorio. Cabe destacar que, en este modelo, la actividad de RA es la misma en ambos hemisferios. Sin embargo, en un hemisferio esta actividad induce oscilaciones en ER y e_{nXIIvs} mientras que, del lado contralateral, ocluye el lumen siríngeo.

En la Figura 3.D(b) se muestran las soluciones del sistema dinámico propuesto para cada uno de los núcleos. Los parámetros que utilizamos en las simulaciones fueron los siguientes:

$$(\rho_{e,ra}, \alpha_{era,Fd}, \alpha_{era,\mathrm{era}}, \alpha_{era,\mathrm{ira}}) = (-3.5, 5, 10, -10)$$

$(\rho_{i,ra}, \alpha_{ira,Fd2}, \alpha_{ira,era}, \alpha_{ira,ira}) = (-12, 5, 10, 2)$

$(\rho_{e,er}, \alpha_{eer,ra}, \alpha_{eer,F}, \alpha_{eer,eer}, \alpha_{eer,\mathrm{ier}}) = (-7.55, 4.5, 0, 10, -4.5)$

$(\rho_{i,er}, \alpha_{ier,\mathrm{ra}}, \alpha_{ier,\mathrm{eer}}, \alpha_{ier,\mathrm{ier}}) = (-11.5, 4.5, 10, 2)$

$(\rho_{e,\mathrm{ir}}, \alpha_{eir,\mathrm{ra}}, \alpha_{eir,\mathrm{eer}}) = (0, 1, -10)$

$(\rho_{e,nXII}, \alpha_{nXIIvs,FnXII}, \alpha_{\mathrm{nXIIvs,era}}, \alpha_{\mathrm{nXIIvs,eer}}, \alpha_{\mathrm{nXIIvs,eir}}) = (-3, 0, 1, 1.7, 6)$

$(\rho_{e,nXII}, \alpha^{d}_{nXIIdtb,FnXII}, \alpha^{d}_{nXIIdtb,era}) = (-3, 0, 1)$

$(\rho_{e,nXII}, \alpha^{i}_{nXIIdtb,FnXII}, \alpha^{i}_{nXIIdtb,era}) = (-3, 1, 0)$

$(\rho_{e,nXII}, \alpha_{enXIIvtb,\mathrm{eir}}) = (-3, 10)$

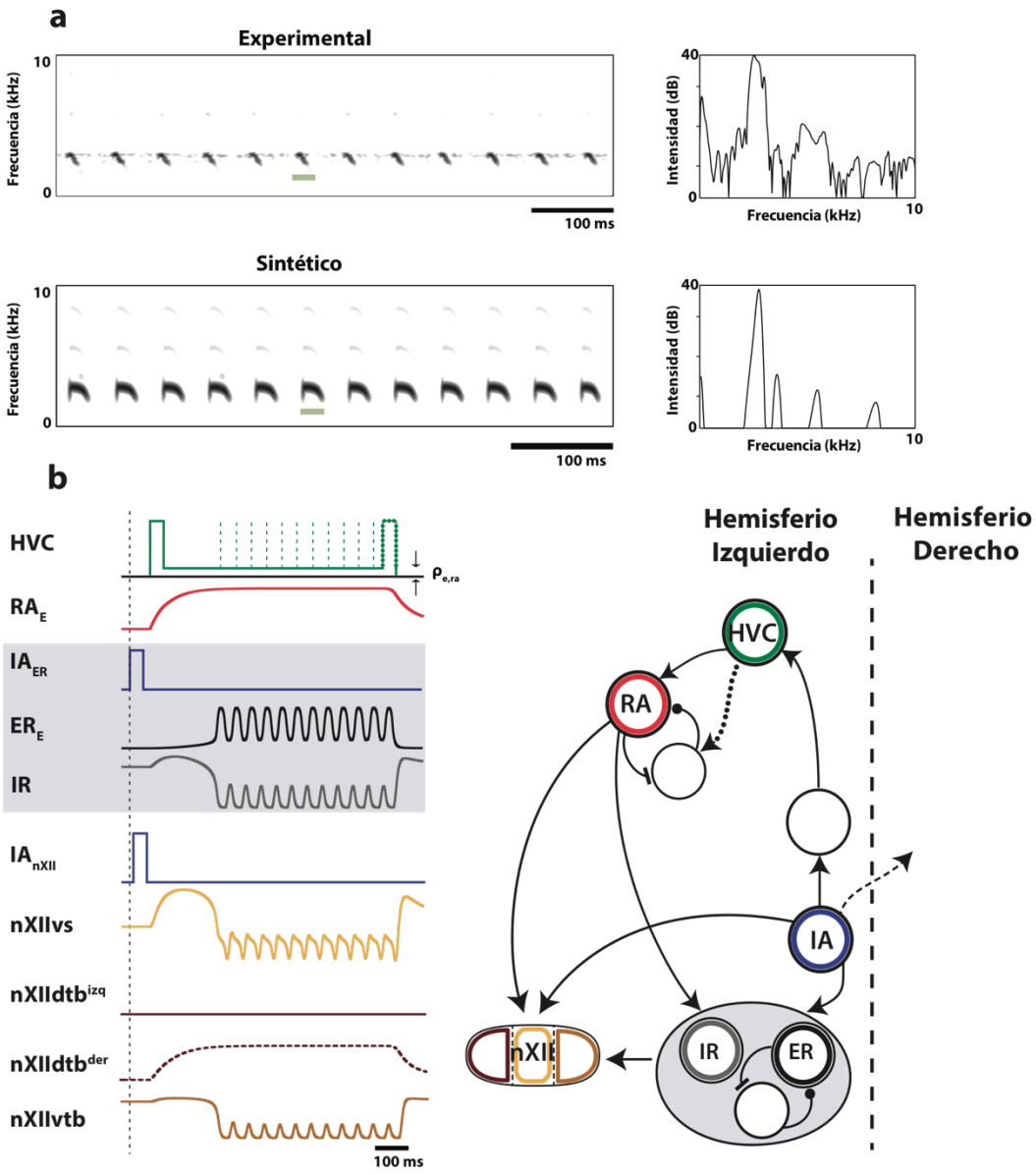


Figura 3.D: Ejemplo de soluciones de tipo P1, con modulación decreciente de la frecuencia fundamental (downsweep). (a) (Panel superior izquierdo) Sílabas experimentales de tipo

P0. (Panel superior derecho) contenido espectral de la porción del sonograma indicada con la barra verde. (Panel inferior izquierdo) Versión sintética generada por el modelo integrado. (Panel inferior derecho), contenido espectral del sonido producido, indicado con la barra verde. (b) (Izquierda) Señales temporales de los distintos núcleos de la vía motora involucrados en la generación de estas sílabas. (Derecha) diagrama de los núcleos de la vía motora. Las flechas indican las conexiones entre los distintos núcleos.

3.4.4 Pulsátil

Una característica interesante del canto de los canarios domésticos es que poseen vocalizaciones con un gran rango de frecuencias silábicas. Las sílabas del tipo Pulsátil son las de mayor frecuencia (de 25 hasta 40Hz). Este tipo de vocalizaciones presentan gestos respiratorios que se caracterizan por tener fluctuaciones de alta frecuencia (y baja amplitud), montadas sobre un valor constante de presión. En la Figura 3.E(a) se muestran 19 repeticiones de este tipo de sílabas.

El modo en que el modelo reproduce estas sílabas es el mismo a lo que ocurre en las P1. Resumidamente, los gestos expiratorios (ER) y del núcleo *nXII* no requieren de una entrada directa desde IA, ya que la actividad licitada por RA genera soluciones oscilatorias en ambos núcleos. Por otro lado, la subpoblación nXIIdtb^{der} presenta un patrón de activación continuo que mantiene ocluidos los labios del lado derecho, impidiendo la fonación. A su vez, del mismo modo que en las sílabas P1, oscilaciones producto de la actividad intrínseca de HVC no producirán cambios dramáticos en los perfiles de las demás variables del modelo siempre que la frecuencia de estas oscilaciones sea del orden de la frecuencia silábica (Figura 3.E(b) líneas verdes punteadas).

Cabe destacar que este tipo de patrones respiratorios, a diferencia de todos los anteriores, no posee mini-respiraciones entre distintas sílabas. Debido a esto, no se observan modulaciones en la dinámica del núcleo que controla la contracción del músculo vTB.

En la Figura 3.E(b) se muestran las soluciones del modelo. Los parámetros utilizados fueron:

$(\rho_{e,ra}, \alpha_{era,Fd}, \alpha_{era,\mathrm{era}}, \alpha_{era,\mathrm{ira}}) = (-5.25, 5, 10, -10)$

$(\rho_{i,ra}, \alpha_{ira,Fd2}, \alpha_{ira,\mathrm{era}}, \alpha_{ira,\mathrm{ira}}) = (-12, 5, 10, 2)$

$(\rho_{e,er}, \alpha_{eer,ra}, \alpha_{eer,F}, \alpha_{eer,eer}, \alpha_{eer,\mathrm{ier}}) = (-7.5, 6, 0, 10, -6.2)$

$(\rho_{i,er}, \alpha_{ier,\mathrm{ra}}, \alpha_{ier,\mathrm{eer}}, \alpha_{ier,\mathrm{ier}}) = (-11.5, 6, 10, 2)$

$(\rho_{e,\mathrm{ir}}, \alpha_{eir,\mathrm{ra}}, \alpha_{eir,\mathrm{eer}}) = (0, 0, -10)$

$(\rho_{e,nXII}, \alpha_{nXIIvs,FnXII}, \alpha_{\mathrm{nXIIvs,era}}, \alpha_{\mathrm{nXIIvs,eer}}, \alpha_{\mathrm{nXIIvs,eir}}) = (-3, 0, 1.5, 1.1, 0)$

$(\rho_{e,nXII}, \alpha^{d}_{nXIIdtb,FnXII}, \alpha^{d}_{nXIIdtb,era}) = (-3, 0, 1)$

$$\left(\rho_{e,nXII}, \alpha^{i}_{nXIIdtb,FnXII}, \alpha^{i}_{nXIIdtb,era}\right) = (-3, 1, 0)$$

$$\left(\rho_{e,nXII}, \alpha_{enXIIvtb,\text{eir}}\right) = (-3, 10)$$

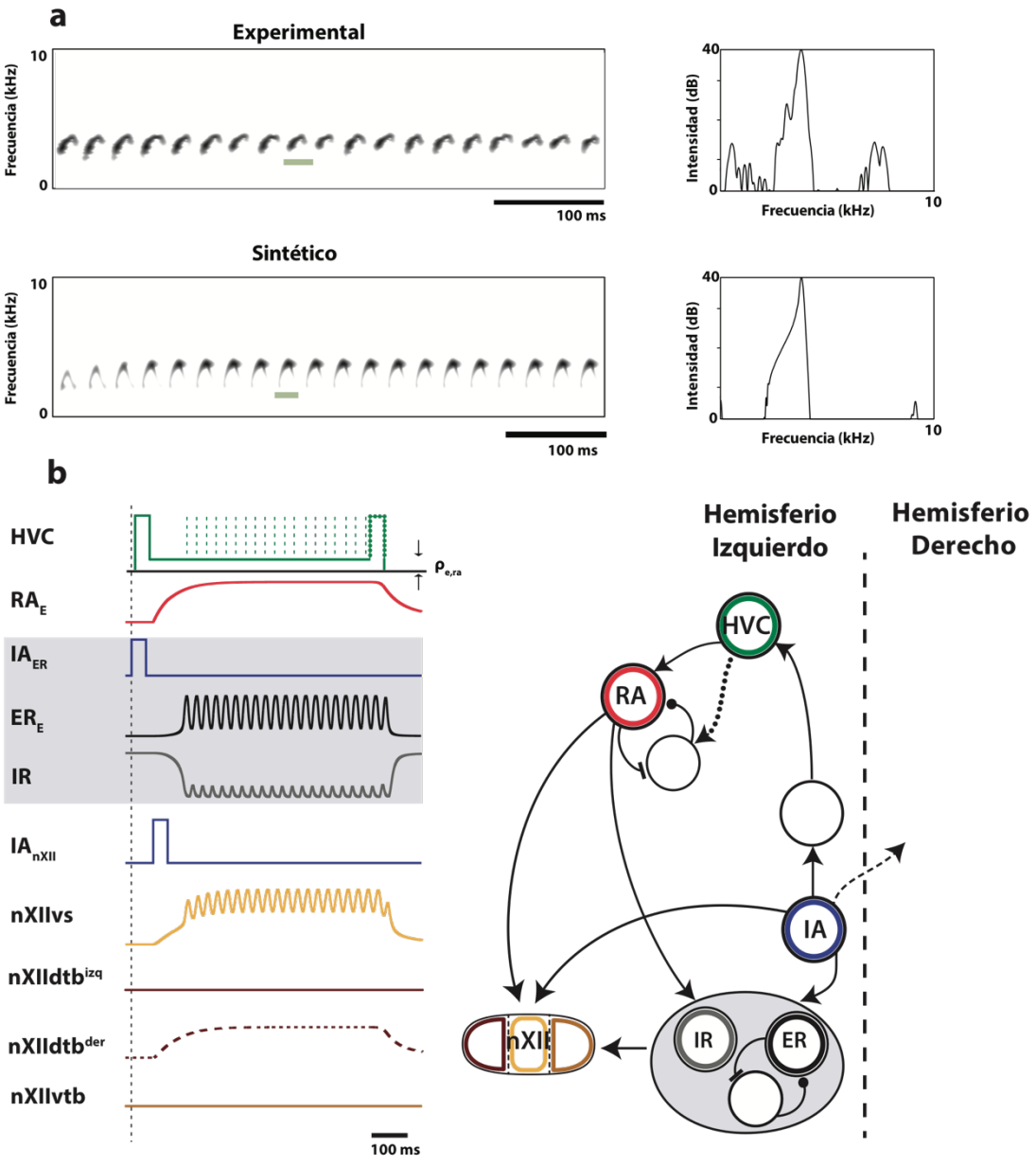


Figura 3.E: Simulaciones correspondientes a las sílabas de tipo Pulsátiles. (a) (Panel superior izquierdo) Sílabas experimentales de tipo P0. (Panel superior derecho) contenido espectral de la porción del sonograma indicada con la barra verde. (Panel inferior izquierdo) Versión sintética generada por el modelo integrado. (Panel inferior derecho), contenido espectral del sonido producido, indicado con la barra verde. (b) (Izquierda) Señales temporales de los distintos núcleos de la vía motora involucrados en la generación de estas sílabas. (Derecha) diagrama de los núcleos de la vía motora. Las flechas indican las conexiones entre los distintos núcleos.

Finalmente, una vez que se integró el modelo para cada gesto, utilizamos las señales temporales de e_{er} , e_{nXIIvs} , $e^{i,d}_{nXIIdtb}$ y $e_{nXIIvtb}$ para alimentar al modelo biomecánico de la siringe y generar sonido sintético. En nuestro modelo, la no-linealidad característica de la activación neuronal, está representada en la función sigmoidea y por lo tanto las soluciones están normalizadas a la unidad. Debido a esto, para poder traducir las actividades neuronales en instrucciones fisiológicas que representen el grado de contracción de cada músculo ($\beta(t), k(t)^{i,d}$, $f^{i,d}_{add}(t)$ y $f^{i,d}_{abd}(t)$), multiplicamos los valores de las variables por factores de escala. Para todos los gestos, el parámetro γ fue fijado en 9000.

Nótese que para que las modulaciones de frecuencia fundamental reproduzcan adecuadamente lo observado en las sílabas experimentales, los valores de tensión del lado izquierdo y derecho de la siringe serán multiplicados por distintos factores. A continuación, se resumen los factores de escala utilizados (Tabla 3).

	P0	**P2**	**P1**	**Pulsátil**
$\beta(t)$	$e_{er} * 2$	$e_{er} * 2$	$e_{er} * 2 - 0.85$	$e_{er} - 0.25$
$k(t)^i$	$e_{nXIIvs} * 29$	$e_{nXIIvs} + 1.5$	$e_{nXIIvs} * 1.7 + 1.5$	$e_{nXIIvs} * 30 - 9.7$
$f^i_{add}(t)$	$e^i_{nXIIdtb} * 40$	$e^i_{nXIIdtb} * 15 - 2$	$e^i_{nXIIdtb} * 1$	$e^i_{nXIIdtb} * 1$
$f^i_{abd}(t)$	$e_{nXIIvtb} * 40$	$e_{nXIIvtb} * 25 - 3$	$e_{nXIIvtb} * 5 - 0.1$	$e_{nXIIvtb} * 0$
$k(t)^d$	$e_{nXIIvs} * 28.5$	$e_{nXIIvs} * 3 + 0.7$	$e_{nXIIvs} * 1 + 3$	$e_{nXIIvs} * 30$
$\mathrm{f}^d_{add}(t)$	$e^d_{nXIIdtb} * 20 + 7$	$e^d_{nXIIdtb} * 30 + 2.7$	$e^d_{nXIIdtb} * 10 + 3$	$e^d_{nXIIdtb} * 30$
$f^d_{abd}(t)$	$e_{nXIIvtb} * 0$	$e_{nXIIvtb} * 5$	$e_{nXIIvtb} * 0$	$e_{nXIIvtb} * 0$

Tabla 3: Resumen de los factores de escala utilizados para sintetizar canto

3.4.5 Instrucciones Bilaterales

El mecanismo subyacente a la generación de los patrones de presión permite clasificarlos en dos grupos. El primer grupo incluye las soluciones de tipo P0 y P2 ya que en esos casos el área relacionada con la expiración (ER) recibe tanto una entrada directa desde IA como una segunda entrada después de que la activación inicial es procesada por el telencéfalo. El otro grupo abarca las soluciones de tipo pulsátil y P1, que necesitan sólo la segunda entrada descrita anteriormente.

Para las soluciones del primer grupo se requiere que parte de los gestos motores necesarios para sintetizar una sílaba realice un viaje ascendente desde el rombencéfalo al telencéfalo a través del núcleo talámico Uva. En los casos en que ambos lados de la siringe participan

secuencialmente en la generación de la sílaba será necesario que los patrones de actividad de ambos hemisferios no estén sincronizados, al menos para la generación de las instrucciones que controlan la oclusión de los labios ($e^{i,d}_{nXIIdtb}$).

En la Figura 3.F, mostramos cómo nuestro modelo genera los patrones bilaterales que controlan la actividad del músculo *dtb,* en un ejemplo de una sílaba de tipo P2. En este caso, la activación directa de IA a nXII genera una modulación rápida en la actividad de $e^{d}_{nXIIdtb}$. Luego, la copia eferente de este pulso realiza un viaje a través de Uva hacia el telencéfalo del lado contralateral, generando después el patrón de activación $e^{i}_{nXIIdtb}$ (flechas de líneas punteadas). Este mecanismo permite generar patrones de contracción rápidos del lado derecho, ocluyendo los labios siríngeos de ese lado, así como patrones de aducción más lentos en el lado izquierdo. Lo cual permite alternancia en la fonación de cada lado de la siringe.

3.5 Observaciones experimentales: *Similitud entre gestos teóricos y experimentales*

Una característica sobresaliente del modelo presentado en este capítulo es su capacidad de reproducir gestos motores que a su vez consiguen alimentar un modelo biomecánico de la siringe y recrear sonidos sintéticos realistas (Figura 3.B, Figura 3.C, Figura 3.D y Figura 3.E). Ahora bien, el modelo se basa en la hipótesis de que la actividad media de los núcleos que controlan el aparato periférico se traduce de manera lineal en el patrón de contracción muscular. En este sentido, propone que, así como la actividad de distintas neuronas contribuye a la actividad promedio del núcleo en cuestión, la contracción de distintas unidades motoras dentro de un músculo genera un patrón de contracción que será proporcional al número de unidades activadas. Bajo esta hipótesis, el modelo consigue recrear gestos motores asociados a parámetros fisiológicos como la presión de los sacos aéreos, la tensión de los labios, patrones de contracción de músculos que ocluyen el lumen siríngeo, etc.

A lo largo de esta tesis hemos intentado medir algunas de estas variables. En particular medimos de manera directa la presión de los sacos aéreos e indirectamente la tensión labial, a través del electromiograma del músculo *siringealis ventralis* (vS) (ver capítulo 2).

La actividad electromiográfica (o EMG) es un procedimiento por el cual se registra el voltaje correspondiente a los potenciales de acción de unidades motoras en las fibras musculares. Esta técnica registra de un pequeño número de fibras en las inmediaciones del electrodo. Sin embargo, se supone que la actividad promedio de las fibras musculares será la misma, por lo que tradicionalmente se ha propuesto que la envolvente de la señal se correlaciona con la actividad del músculo.

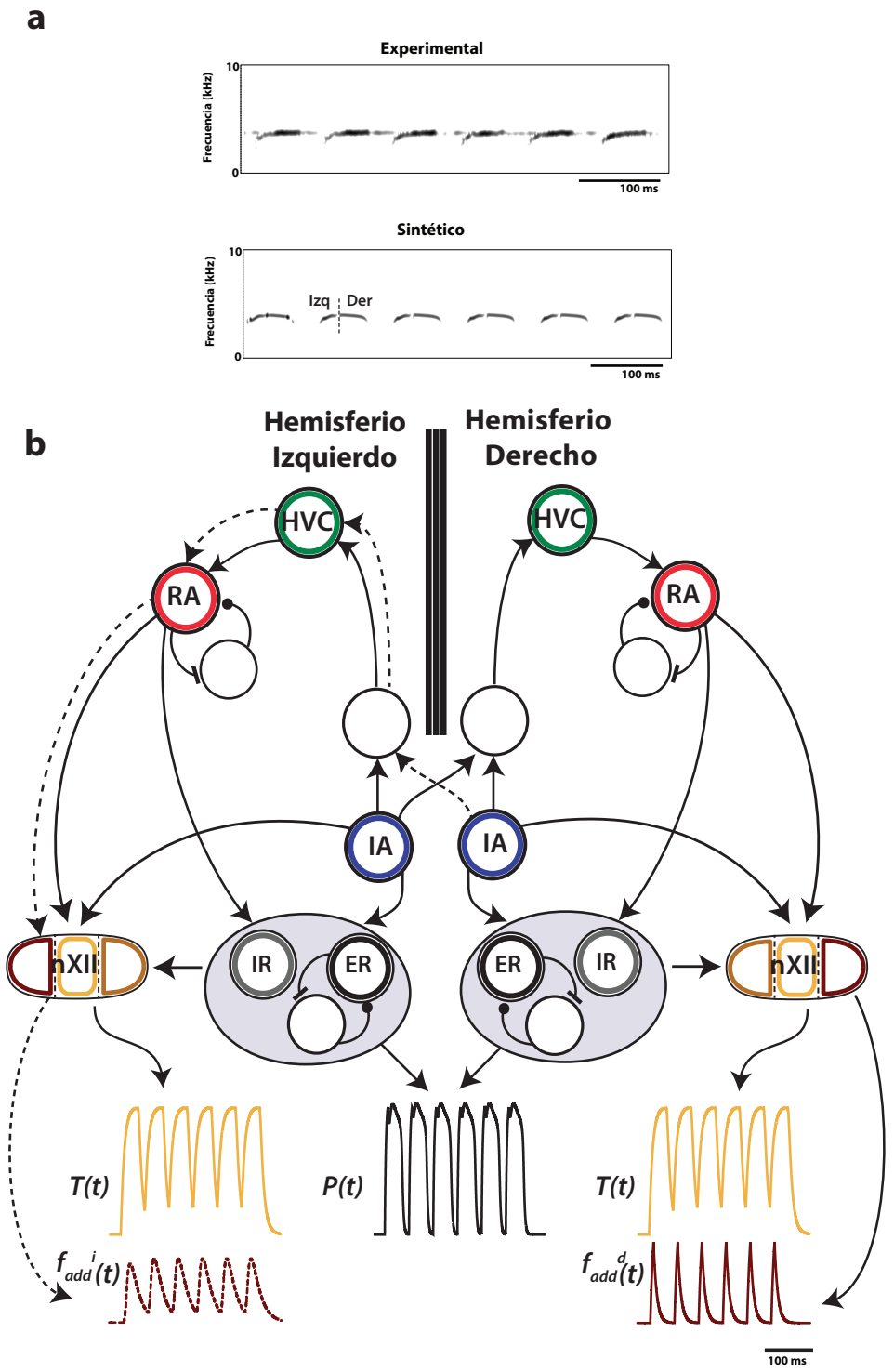


Figura 3.F: Sílabas bilaterales: ejemplo de patrones no sincronizados. (a) Sonograma de una frase compuesta por la repetición de 6 sílabas bilaterales de tipo P2 (Panel Superior). Sonograma correspondiente a la versión sintética de las mismas sílabas (Panel inferior). (b) Esquema de representación bilateral de los núcleos de la vía motora junto con los distintos gestos de Presión de los sacos aéreos (P(t)), Tensión labial (T(t)) y patrones de aducción del lumen siríngeo (f_{add}^{i} y (f_{add}^{d}).

Las técnicas experimentales utilizadas se detallan en el Apéndice 1. En resumen, para obtener registros de EMG, se expone el músculo de la siringe mediante una incisión en la piel y el saco aéreo entre las clavículas. Luego, se inserta un par de electrodos monopolares en el músculo siringealis ventralis (vS) izquierdo o derecho y se fijan con una gota de adhesivo quirúrgico. Seguido a esto, se conducen los cables subcutáneamente hasta el dorso del ave, y se conectan a una placa de pre amplificación. Transcurrido un tiempo después de la recuperación del ave, tras la cirugía, la actividad de EMG y la canción se graban simultáneamente.

Ahora bien, en el modelo de fonación presentado aquí (Capítulo 2), la tensión labial se expresa en el parámetro $k(t)$ y la presión de los sacos aéreos es proporcional al parámetro $\beta(t)$. Entonces, si consideramos a la envolvente de la actividad electromiográfica como un buen indicador de la tensión labial $k(t)$, podremos comparar los gestos motores teóricos con mediciones experimentales de presión y la envolvente del EMG del músculo *siringealis ventralis.*

Para finalizar esta sección, utilizaremos algunos ejemplos de estos gestos motores registrados en canarios vocalizando para ilustrar las similitudes entre los gestos teóricos y los experimentales. En la Figura 3.G se muestran dos ejemplos de sílabas bilaterales de tipo P0 y P2, junto con la señal de EMG del vS, la presión de los sacos aéreos y su contraparte teórica (e_{er} y e_{nXIIvs}). Del mismo modo en la Figura 3.H se muestran dos ejemplos de sílabas de tipo P1 y Pulsátil. Nótese la similitud entre la envolvente del EMG y la traza correspondiente a la actividad del núcleo *nXIIvs*.

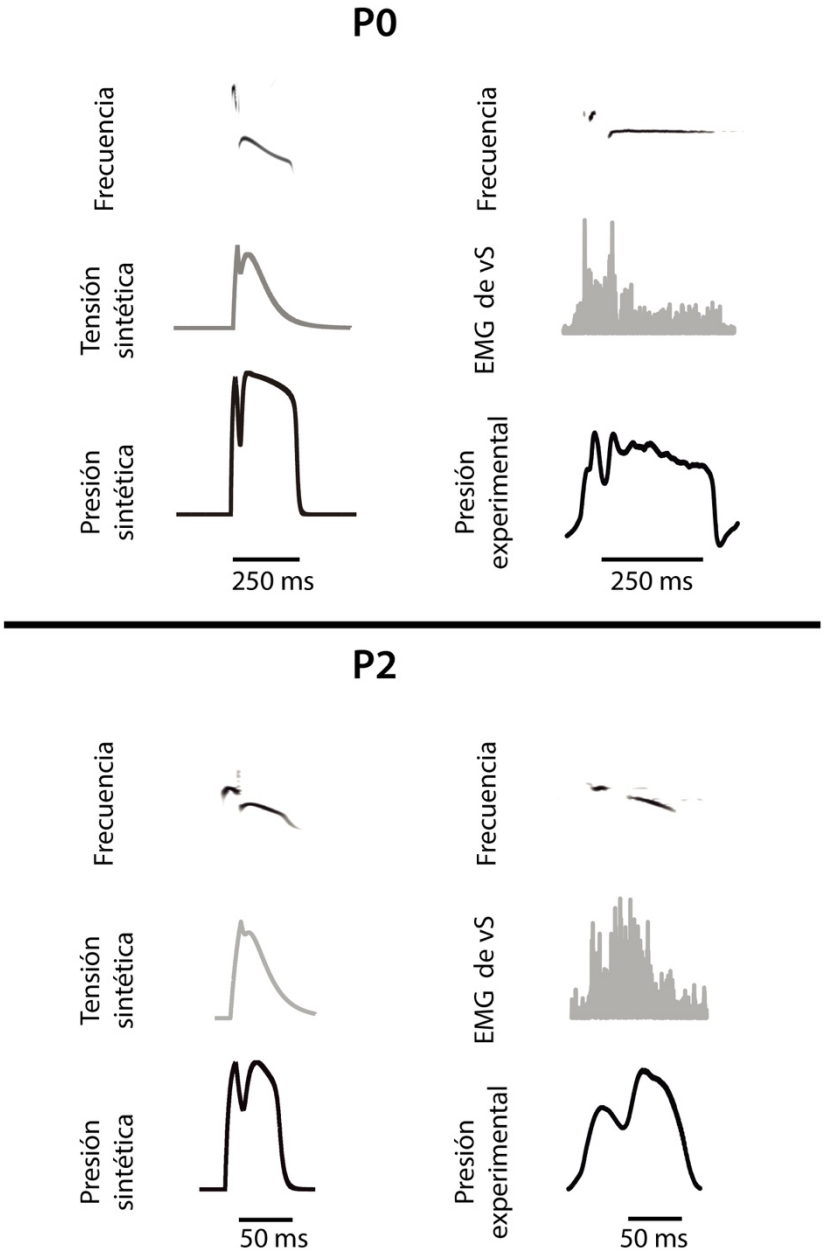


Figura 3.G: Similitudes entre gestos Teóricos y Experimentales de sílabas tipo P0 y P2.

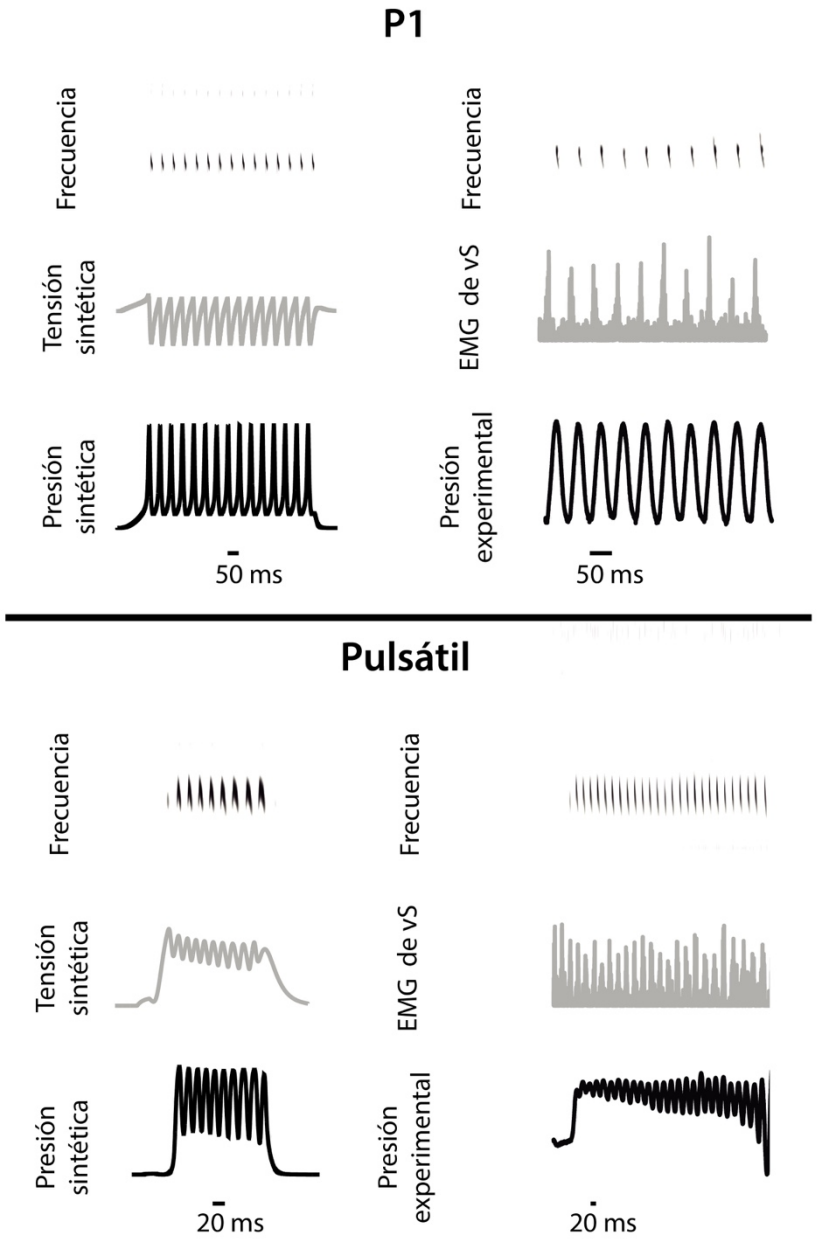


Figura 3.H: Similitudes entre gestos Teóricos y Experimentales de sílabas tipo P1 y Pulsátil.

3.6 Consideraciones finales

En este capítulo presenté un modelo integrado para la producción del canto en el canario doméstico (*Serinus canaria*). El modelo es esencialmente operacional, ya que se trata de un conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias cuyas variables representan las actividades medias de diferentes áreas de la vía motora. Este modelo es capaz de generar tanto los patrones respiratorios como los de tensión muscular para reproducir los sonidos observados en el canto del canario doméstico. De hecho, probamos la hipótesis de que incluso con todas las restricciones en los pesos sinápticos de todas las demás áreas asociadas a un gesto respiratorio

particular, la actividad del núcleo responsable del control de la siringe es capaz de generar instrucciones realistas. Entendemos por "instrucciones realistas" a un conjunto de parámetros dependientes del tiempo que pueden alimentar al modelo de fonación (sección 2.3) para sintetizar sílabas realistas. Así mismo, notamos que estas instrucciones teóricas se corresponden con mediciones experimentales de presión de los sacos aéreos y de la envolvente del EMG de *vS* como se puede observar en las Figura 3.G y Figura 3.H. Esta correspondencia entre los gestos teóricos y experimentales representa una verificación parcial de la pertinencia del modelo.

Por otra parte, he de destacar que en este capítulo mostramos sólo algunos ejemplos de sílabas correspondientes a las cuatro clases de patrones de presión de los sacos aéreos. No obstante, hemos explorado un amplio rango de pesos de las conexiones entre las diferentes áreas que interactúan con el núcleo *nXII* (*RA, ER, IR, IA*) y para cada conjunto de parámetros sintetizamos sonidos. Como resultado de estas simulaciones numéricas, en todos los casos hemos podido encontrar pesos sinápticos tales que los sonidos sintéticos finales fueran los adecuados. De esta forma, podemos generar todo el repertorio acústico descrito para el canto del canario doméstico (*Serinus canaria*).

Otro aspecto por demás relevante del modelo presentado aquí, es que las mismas señales temporales necesarias para modular la frecuencia fundamental de las vocalizaciones cuando se inyectan como $\kappa(t)$ en el modelo de fonación, son capaces de generar el patrón de apertura/cierre del lumen siríngeo adecuado cuando se inyectan como $f_{add}(t)$ y $f_{abd}(t)$. Este resultado es particularmente notable, ya que no era obvio que los patrones que modulan las frecuencias fundamentales fueran posibles de lograr, y menos aún los patrones asociados a la apertura/cierre del lumen siríngeo dado que para generar un gesto de presión particular, las actividades de todas las áreas están restringidas. En este modelo mostramos no sólo que el patrón de tensión apropiado puede generarse para un gesto de presión dado, sino que también se obtiene el patrón de "*gating*" requerido (apertura/cierre del lúmen siringeo).

En este modelo asumimos que los patrones de actividad de e_{nXIIvs} son iguales en ambos hemisferios. Sin embargo, podría haber diferencias en las actividades de *vS* de derecha e izquierda para sílabas complejas que implican control bilateral. En ese caso, así como en los gestos de controlan la abducción y aducción de las membranas fonatorias, la actividad sería el resultado de una entrada directa de *IA* que conduzca a una rápida modulación de e_{nXIIvs} en un lado, y una modulación talámica contralateral más lenta de los e_{nXIIvs} del otro lado. Esto daría lugar a patrones secuenciales en ambos lados de la siringe y generaría diferentes actividades de *vS*.

Para finalizar, he de destacar que en el modelo integrado propuesto en este capítulo mostramos que, ajustando sólo los pesos relativos de las entradas a *nXII,* los patrones de actividad

distribuidos asociados a un gesto de presión conducirán a *nXII* a generar las soluciones apropiadas para producir el canto. Es interesante notar que los patrones de apertura/cierre del lumen siríngeo están íntimamente asociados con los patrones de tensión labial: lo que controla la tensión de un lado, alimenta a los músculos de "gating" contralaterales, generando las instrucciones mínimas que requiere la siringe para sintetizar la sílaba apropiada. Además, existe una estrecha relación entre los patrones de presión y los patrones de tensión. Por lo que, este modelo representa una situación en la que instrucciones esencialmente similares, conducen un dispositivo biomecánico para sintetizar canto realista en el canario doméstico.

4 CONCLUSIONES

El canto de las aves es un comportamiento motor complejo, que emerge de la interacción entre el sistema nervioso, el sistema periférico y el ambiente. Como todo comportamiento adaptativo, el mismo es consecuencia de un proceso evolutivo en el cual se han seleccionado una serie de especializaciones morfológicas periféricas y de mecanismos de control neuromuscular, que actúan conjuntamente para producir las vocalizaciones adecuadas (Chiel & Beer, 1997; Garcia et al., 2017). Estas interacciones no son necesariamente triviales. De hecho, no podemos establecer *a priori* cuánta de la complejidad acústica observada pueda deberse a instrucciones neuromusculares complejas que actúan sobre una periferia sencilla o si, por el contrario, son las nolinealidades inherentes a la biomecánica de los órganos efectores, las responsables de generar sonidos complejos (Ana Amador & Mindlin, 2008; Arneodo & Mindlin, 2009; J. Sitt, Amador, Goller, & Mindlin, 2008; Tytell, Holmes, & Cohen, 2011).

En los últimos años esta disyuntiva fue permeando en la comunidad de canto de aves, promoviendo un intenso debate dónde se revisitaron distintos trabajos y técnicas experimentales. Esto puso en evidencia la existencia de concepciones contrapuestas sobre el rol de la biomecánica en el control motor de las vocalizaciones (Troyer, 2013). El *Laboratorio de Sistemas Dinámicos*, forma parte activa en esta discusión científica, revalorizando la importancia de la incorporación de la dinámica del sistema periférico al entendimiento del control motor a nivel central (Gabriel B. Mindlin, 2017b).

En el marco de esta tesis, nos propusimos abordar esta problemática desde el estudio de los mecanismos subyacentes a la producción vocal en canarios domésticos (*Serinus canaria*). Para ello, estudiamos tanto el funcionamiento de los órganos efectores, como del sustrato neuronal involucrado en la generación de los patrones motores que actúan sobre la periferia.

En primer lugar, examinamos los mecanismos que rigen la dinámica de las membranas fonatorias. Para ello utilizamos herramientas propias de la dinámica no lineal tanto en la construcción de modelos fenomenológicos de baja dimensión, así como para estimar sus predicciones. Realizamos simulaciones numéricas y contrastamos resultados teóricos con mediciones experimentales de variables fisiológicas.

En el *Laboratorio de Sistemas Dinámicos* se han venido desarrollando desde hace más de una década, modelos de fonación en aves (Gardner et al., 2001; Laje et al., 2002). Éstos modelos logran capturar mecanismos dinámicos que subyacen a la producción de las vocalizaciones, reproduciendo características importantes del sonido en cuestión (como la frecuencia fundamental, las variaciones rítmicas, o el contenido espectral, etc.). Consiguiendo incluso generar sonidos sintéticos tan similares a sus versiones experimentales, que licitan la misma respuesta a nivel neuronal (Ana Amador et al., 2013). Valiéndonos de estos trabajos construimos un modelo dinámico de baja dimensión para las fuentes sonoras que incorpora explícitamente términos no-lineales tanto en la restitución elástica de los labios como en la disipación asociada a las restricciones físicas del tracto vocal (R. Alonso et al., 2014). Este modelo tiene predicciones específicas sobre las contribuciones de la presión de los sacos aéreos y la tensión labial en el control de la frecuencia fundamental del canto. Para poder testear estas predicciones, medimos la presión de los sacos aéreos en canarios cantando. A partir de esto, comprobamos que ambos parámetros actúan sinérgicamente para controlar la frecuencia fundamental del canto (R. Alonso et al., 2014).

Este trabajo propone un escenario en el cual las nolinealidades propias del aparato fonador son responsables de la existencia de un control conjunto de la frecuencia de las vocalizaciones. A partir de esto, surgen otras preguntas acerca del control motor del canto. Por ejemplo, cómo afectan otros parámetros como la actividad de los músculos asociados al control de inicio/final de las vocalizaciones (dTB y vTB) a la modulación de la frecuencia fundamental. A su vez, esta característica del modelo tiene importantes implicancias en relación al efecto Lombardo (Brumm & Zollinger, 2011). Resumidamente, este efecto postula que en ambientes con un alto grado de contaminación acústica (típicamente ruido antropogénico), las aves “adaptan” sus vocalizaciones aumentando la amplitud y la frecuencia de los sonidos que producen (Nemeth et al., 2012). En nuestro modelo, esta “adaptación” podría ser producto de aumentar el volumen de las vocalizaciones (y por consiguiente la presión de los sacos aéreos). Por lo que el efecto pasaría a ser una consecuencia pasiva asociada a aumentar la presión, más que un mecanismo adaptativo de parte del ave.

En segundo lugar, nos propusimos estudiar tanto computacional como experimentalmente algunos de los mecanismos neurofisiológicos que están involucrados en la generación del canto.

Como mencioné anteriormente, desde hace unos años en la comunidad de *canto de aves* se ha instalado un debate acerca de cuál es el rol de la biomecánica periférica en el control motor, en el cual se puso en discusión *ni más ni menos* que el modelo más establecido en el campo, el modelo del reloj. Este modelo fue impulsado por los trabajos de Michale Fee y colaboradores (Fee et al., 2004; Hahnloser et al., 2002a). El modelo tiene básicamente dos postulados respecto del funcionamiento del sistema motor. El primer postulado plantea un funcionamiento "río abajo", donde las instrucciones motoras del canto se generan inicialmente en HVC, primer núcleo de la Vía Motora, y luego se comunican "río abajo" en el circuito hasta llegar a las motoneuronas encargadas de controlar el movimiento de los músculos periféricos. El segundo postulado, proclama que las neuronas de HVC disparan de forma rala, dónde distintas neuronas (o pequeñas poblaciones de neuronas) disparan pulsos equiespaciados marcando el *tempo* de la canción, sin correlación alguna con el canto.

Ahora bien, esta visión jerárquica del sistema del canto, dónde HVC controla todas las escalas temporales, no se condice con un gran número de evidencias experimentales. Entre ellas podemos incluir los trabajos de Amador y colaboradores, en los cuales reportaron que la actividad motora en el núcleo telencefálico HVC está asociada a transiciones en gestos motores (Ana Amador et al., 2013). A su vez, varios trabajos del grupo liderado por Mark Schmidt han reportado la existencia de sincronización en la actividad de HVC en ambos hemisferios, la cual se produce a partir de una señal que viaja "rio arriba" desde los núcleos del tronco encefálico, a través del núcleo talámico Uva (Ashmore et al., 2008; M. F. Schmidt, 2003; Marc F. Schmidt et al., 2004). Asimismo, los trabajos de Goldín y colaboradores, revisitaron la técnica de enfriamiento del núcleo HVC, en canarios cantando. En estos trabajos se observó que al enfriar HVC, no sólo ocurría un estiramiento en las sílabas sino que algunas de ellas se rompían, indicando que el control del *tempo* de la canción no puede explicarse sólo por la actividad de HVC (Goldin et al., 2013). Algo similar ocurrió al enfriar otros núcleos de la vía motora. En estos experimentos Hamaguchi y coautores, mostraron que si enfriaban el núcleo Uva, los Diamantes mandarines producían motivos de mayor duración, lo cual indica que el control de las escalas temporales del canto emerge de la acción conjunta de varios núcleos en un circuito distribuido (Hamaguchi et al., 2016). En su conjunto, estos trabajos cuestionan el supuesto rol jerárquico de HVC y proponen que éste núcleo no actúa como un simple reloj, sino que en su actividad podemos encontrar información en coordenadas motoras. Sin embargo, ninguno de estos trabajos propone un modelo alternativo para el control motor.

El *modelo circular* propuesto en esta tesis representa, hasta el momento, el único modelo operacional alternativo al *modelo del reloj* (R. G. Alonso et al., 2015). A diferencia de éste último, el *modelo circular* fue construido de manera tal de poder reconciliar las distintas evidencias experimentales. Y a su vez, pudiera reproducir los patrones de presión observados en

los canarios domésticos, generando predicciones específicas acerca del control neuronal asociado a estos gestos motores.

En relación a las evidencias experimentales reportadas, el modelo requiere por un lado de una componente de actividad basal en HVC que es compatible con la componente continua que reportan M. Fee y colaboradores. Sumado a esta actividad necesita de la inclusión de heterogeneidades en los patrones de disparo en las neuronas de HVC. Esta actividad rala asociada a transiciones acústicas, que es compatible con los resultados de Amador y colaboradores, surge de la entrada de pulsos de activación provenientes del tronco encefálico. Esta idea fue motivada por los registros de Schmidt y coautores, donde reportan que la sincronización de la actividad de HVC en ambos hemisferios se produce gracias a un patrón de activación que se da "río arriba", es decir del tronco encefálico hacia el telencéfalo. Cabe destacar que este modelo es el primer ejemplo en el que las características temporales específicas de un patrón motor derivan de una copia eferente procesada como una entrada secundaria. En términos de los experimentos de enfriamiento, el modelo es compatible con los datos obtenidos por Goldin et al.,2013 en los cuales, por ejemplo, se observa que a medida que disminuye la temperatura, también disminuye el mínimo local en los gestos de presión de las sílabas de tipo P0. En el marco del modelo, enfriar HVC modifica la actividad intrínseca del núcleo lo cual se manifiesta con una mayor duración de la actividad rala en HVC y un mayor retraso entre la actividad de IA y este pulso, lo cual fue verificado experimentalmente (Goldin & Mindlin, 2017).

Desde la perspectiva del trabajo experimental, hemos conseguido realizar mediciones de actividad de neuronas en el núcleo HVC en canarios anestesiados. Esto requirió de la implementación de distintas técnicas de medición de actividad neuronal, como los experimentos de estimulación y colisión antidrómica. En su conjunto, estos experimentos resultaron compatibles con las predicciones del modelo: 1) obtuvimos mediciones bilaterales en HVC con gran sincronización entre ambos hemisferios; 2) en los registros de varias neuronas en simultáneo se observan heterogeneidades en la ocurrencia de disparos asociadas a transiciones entre gestos motores de distinto tipo, y 3) en el caso de las neuronas putativamente proyectoras a RA observamos que disparan preferentemente en el primer tercio de las sílabas de tipo P0.

No obstante, es importante destacar que éstos resultados no representan una verificación experimental completa del modelo. Si bien por trabajos anteriores realizados en diamantes mandarines (Margoliash, 1986), uno esperaría que la actividad de HVC en canarios anestesiados tenga las mismas propiedades temporales que la actividad motora, esto no se ha verificado en canarios domésticos. Más aún, las neuronas registradas mediante los protocolos detallados en esta tesis podrían formar parte de un subconjunto de neuronas con respuesta a estímulos auditivos, pero sin correlación con la actividad motora. Por este motivo, los registros neuronales reportados aquí forman parte de un conjunto de experimentos que exceden el

alcance de esta tesis. Estos experimentos, en los cuales también se está registrando actividad en canarios cantando, se están realizando en el *Laboratorio de Sistemas Dinámicos* y apuntan a testear las predicciones del modelo.

Concluimos esta tesis con un trabajo integrador que refleja el modo en que exploramos el sistema motor (R. G. Alonso et al., 2016). Este modelo fue concebido como una consecuencia natural de los objetivos que nos trazamos al comienzo del doctorado: estudiar el control motor del canto como el emergente de la interrelación entre la periferia y el sistema nervioso.

En las vocalizaciones de las aves oscinas el sonido se produce cuando la presión de los sacos aéreos establece un flujo de aire que va desde los bronquios hacia la tráquea atravesando ambas fuentes sonoras. En principio, este flujo puede inducir oscilaciones en los labios de ambos lados, obteniendo un sonido bilateral (simultáneo). No obstante, el canto de los canarios está caracterizado por presentar tanto sílabas unilaterales como sílabas compuestas, en las que alterna secuencialmente la fonación en cada una de las fuentes sonoras. Para ello, las aves oscinas disponen de una serie de músculos que modifican la configuración de la siringe de manera tal de controlar la apertura del lumen siríngeo de forma independiente, permitiendo que la fonación ocurra de forma unilateral. En general, las aves oscinas presentan algún grado de especialización de las fuentes a un rango de frecuencias, siendo el lado izquierdo el encargado de producir vocalizaciones de baja frecuencia y el derecho las de alta frecuencia (Franz Goller & Suthers, 1996).

En este sentido, el *modelo integrado* describe a las fuentes sonoras incorporando explícitamente la bilateralidad presente en las siringes traqueobronquiales. Cada lado de la siringe está representado por un par de ecuaciones que describen el movimiento de sus membranas fonatorias. En principio, ambos lados de la siringe están activos por lo que para generar vocalizaciones unilaterales el modelo requiere de un patrón motor que controle la apertura del lumen del lado opuesto.

En su conjunto, el aparato fonador, representado por el modelo biomecánico, requiere de (al menos) siete variables para la generación de sonidos sintéticos. Estas variables están estrechamente relacionadas con patrones de contracción muscular, lo cual supone un gran desafío desde la perspectiva del control neuronal. Sin embargo, el modelo integrador propuesto en esta tesis, consigue recuperar estas señales temporales obteniendo vocalizaciones sintéticas realistas (R. G. Alonso et al., 2016).

En el *modelo integrado*, construimos una representación bilateral de la vía motora. Para cada hemisferio, propusimos como base los núcleos que integran el *modelo circular*, conectando los circuitos de cada lado a través de proyecciones de IA (putativamente *DM*) hacia *Uva* del lado contralateral. Agregamos a esta arquitectura básica, un núcleo asociado a la inspiración (IR,

putativamente *PAm*) y el núcleo *nXII*. Al igual que en el modelo circular, construimos el modelo de manera tal que en primer lugar consiga reproducir los gestos de presión de los canarios. Al hacer esto fijamos los pesos sinápticos de todas las conexiones de la vía motora, excepto las entradas a los núcleos *nXII* derecho e izquierdo. Estos núcleos inervan la musculatura siríngea, por lo que su actividad actúa directamente sobre los patrones de contracción de los músculos siríngeos. De esta manera, al integrar el modelo obtuvimos señales temporales que representan un conjunto de gestos motores.

El modelo opera de manera similar al *modelo circular*. El inicio de las vocalizaciones está determinado por pulsos en IA. Estos pulsos actúan de manera directa sobre los núcleos respiratorios y sobre el núcleo *nXII*, produciendo una modulación *rápida* en los gestos motores. Luego una copia eferente de estos pulsos iniciadores viaja hacia los núcleos telencefálicos *HVC* y *RA* a través del núcleo *Uva*. A partir de esta activación, se produce una segunda modulación en los núcleos que controlan la generación de los gestos motores (*modulación lenta*).

Ahora bien, una característica notable de este modelo es su capacidad para reproducir patrones secuenciales de tensión de los músculos asociados a la oclusión de las membranas fonatorias (*dTB* izquierdo y derecho). Para ello el modelo se vale de la representación simétrica de la vía motora, en la cual la actividad iniciadora puede generar patrones neuronales del lado contralateral. En este sentido, la modulación rápida (directa) produce un patrón de contracción del músculo dTB de un lado, impidiendo la fonación (el sonido se genera en el lado opuesto). Luego, la versión modulada por el telencéfalo del lado contralateral, afecta la dinámica de la subpoblación del núcleo *nXII* asociada a la contracción del músculo dTB del lado opuesto. Esta modulación lenta (indirecta) aplaca las oscilaciones del lado que fona inicialmente, generando una secuencia en la cual ambos lados producen fracciones diferentes en una sílaba compuesta.

Desde el punto de vista experimental, podemos destacar que los gestos teóricos propuestos por el modelo tanto para la presión de los sacos aéreos como para la tensión del músculo *vS*, se asemejan a las mediciones experimentales.

Finalmente, en el marco de la discusión general, el *modelo integrador* propone un escenario donde gestos similares de tensión muscular generan una salida compleja al estimular distintos músculos siríngeos. En este sentido, la riqueza acústica de las vocalizaciones de los canarios está dada por instrucciones neuronales simples, actuando sobre una periferia compleja.

Desde una perspectiva más amplia, ésta tesis se fundamenta en un abordaje novedoso en el estudio de la neuroetología, en el cual se postula que para entender el código neuronal que rige

un cierto comportamiento motor, es indispensable comprender la manera en que éstas instrucciones interactúan con un aparato físico (Tytell et al., 2011).

Esta noción hace explícita la necesidad de estudiar el aparato periférico, cuya dinámica no necesariamente es trivial. Según este enfoque, la neurofisiología y la biomecánica conforman una sociedad indisoluble, por lo que un abordaje desmembrado va en desmedro de nuestra posibilidad de entender en profundidad los mecanismos que originan un comportamiento.

A pesar de esto, la literatura científica está colmada de trabajos en los cuales se estudia cada escala del problema de forma aislada. Esta separación artificial se arraiga en concepciones aparentemente antagónicas en la forma en que se construye conocimiento en las distintas disciplinas científicas. Por ejemplo, la Física (en su concepción más tradicional) pregona por la búsqueda de principios fundamentales que rigen el comportamiento de la materia. Estos principios son descriptos en términos matemáticos por lo que la simpleza y generalidad de sus premisas son características valorables. En contrapartida, la Biología se nutre de la diversidad y las particularidades de cada organismo no deben ser despreciadas *a priori*. De hecho, la existencia de una determinada característica fenotípica en un individuo puede influir en el éxito evolutivo de la especie. Debido a esto, la Biología requiere del estudio minucioso de los detalles de un problema. Si bien esta caricaturización plantea posiciones extremas dentro de cada disciplina, ilustra aspectos importantes de discusiones entre físicos y biólogos.

Ahora bien, esta tesis se posiciona en la frontera entre ambas ciencias. Desde allí, se nutre de la capacidad predictiva del modelado físico, sin menospreciar la necesidad de preservar ciertos detalles en un problema biológico. En este sentido, la dinámica no-lineal emerge como el lenguaje natural a partir del cual describir este tipo de problemas, ya que consigue reproducir procesos complejos a partir de sistemas de baja dimensión.

En esta tesis, nos hemos propuesto integrar mediciones experimentales con modelos teóricos en un problema complejo como es el control motor. Esta relación entre experimentación y teoría, es parte fundamental del programa de investigación que proponemos desde el *Laboratorio de Sistemas Dinámicos*. Una metodología que sugiere abordar las preguntas científicas, en primer lugar, desde la construcción de modelos operacionales capaces de proveer predicciones cuantitativas específicas, las cuales puedan ser contrastadas experimentalmente. Luego, a partir de estas mediciones reevaluar los modelos, y así progresivamente construir conocimiento.

En este sentido, proponemos un camino posible para el avance de nuestra comprensión de ciertos aspectos de un problema biológico, a partir de un abordaje interdisciplinario e integrador que trascienda las limitaciones propias de cada disciplina.

5 REFERENCIAS

Aerts, H., Fias, W., Caeyenberghs, K., & Marinazzo, D. (2016). Brain networks under attack: robustness properties and the impact of lesions. *Brain*, *Volume 139*(Issue 12), Pages 3063–3083. https://doi.org/https://doi.org/10.1093/brain/aww194

Alliende, J. A., Méndez, J. M., Goller, F., & Mindlin, G. B. (2010). Hormonal acceleration of song development illuminates motor control mechanism in canaries. *Developmental Neurobiology*, *70*(14), 943–960. https://doi.org/10.1002/dneu.20835

Alonso, L., Alliende, J., Goller, F., & Mindlin, G. (2009). Low-dimensional dynamical model for the diversity of pressure patterns used in canary song. *Physical Review E*, *79*(4), 41929. Retrieved from https://journals.aps.org/pre/abstract/10.1103/PhysRevE.79.041929

Alonso, L. M., Alliende, J. A., Goller, F., & Mindlin, G. B. (2009). Low-dimensional dynamical model for the diversity of pressure patterns used in canary song. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, *79*(4), 1–8. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.79.041929

Alonso, R. G., Amador, A., & Mindlin, G. B. (2016). An integrated model for motor control of song in Serinus canaria. *Journal of Physiology Paris*, *110*(3), 127–139. https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2016.12.003

Alonso, R. G., Trevisan, M. A., Amador, A., Goller, F., & Mindlin, G. B. (2015a). A circular model for song motor control in Serinus canaria. *Frontiers in Computational Neuroscience*, *9*(April), 1–9. https://doi.org/10.3389/fncom.2015.00041

Alonso, R., Goller, F., & Mindlin, G. B. (2014). Motor control of sound frequency in birdsong involves the interaction between air sac pressure and labial tension. *Physical Review E -*

Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics, *89*(3), 1–8. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.89.032706

Alstott, J., Breakspear, M., Hagmann, P., Cammoun, L., & Sporns, O. (2009). Modeling the Impact of Lesions in the Human Brain. *PLoS Computational Biology*, *5*(6), e1000408. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000408

Amador, A., Boari, S., & Mindlin, G. B. (2017). From perception to action in songbird production: Dynamics of a whole loop. *Current Opinion in Systems Biology*, *3*, 30–35. https://doi.org/10.1016/j.coisb.2017.03.004

Amador, A., Goller, F., & Mindlin, G. B. (2008). Frequency modulation during song in a suboscine does not require vocal muscles. *Journal of Neurophysiology*, *99*, 2383–2389. Retrieved from http://www.physiology.org/doi/abs/10.1152/jn.01002.2007

Amador, A., & Mindlin, G. B. (2008). Beyond harmonic sounds in a simple model for birdsong production. *Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science*, *18*(4), 43123. https://doi.org/10.1063/1.3041023

Amador, A., Perl, Y. S., Mindlin, G. B., & Margoliash, D. (2013). Elemental gesture dynamics are encoded by song premotor cortical neurons. *Nature*, *495*(7439), 59–64. https://doi.org/10.1038/nature11967

Arneodo, E. M., & Mindlin, G. B. (2009). Source-tract coupling in birdsong production. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.79.061921

Ashmore, R. C. (2005). Brainstem and Forebrain Contributions to the Generation of Learned Motor Behaviors for Song. *Journal of Neuroscience*, *25*(37), 8543–8554. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1668-05.2005

Ashmore, R. C., Renk, J. A., & Schmidt, M. F. (2008). Bottom-up activation of the vocal motor forebrain by the respiratory brainstem. *The Journal of Neuroscience*, *28*(10), 2613–2623. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4547-07.2008

Assaneo, M. F., & Trevisan, M. A. (2013). Revisiting the two-mass model of the vocal folds. *Papers in Physics*, *5*(0), 50004. https://doi.org/10.4279/pip.050004

Assaneo, M. F., Trevisan, M. A., & Mindlin, G. B. (2013). Discrete Motor Coordinates for Vowel Production. *PLoS ONE*, *8*(11), e80373. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080373

Barker, F. K., Cibois, A., Schikler, P., Feinstein, J., & Cracraft, J. (2004). Phylogeny and diversification of the largest avian radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(30), 11040–11045. Retrieved from http://www.pnas.org/content/pnas/101/30/11040.full.pdf

Borisyuk, R. M., & Kirillov, A. B. (1992). Bifurcation analysis of a neural network model. *Biological Cybernetics*, *66*(4), 319–325. https://doi.org/10.1007/BF00203668

Boughman, J. W. (1998). Vocal learning by greater spear-nosed bats. *Proceedings. Biological Sciences*, *265*(1392), 227–33. https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0286

Breakspear, M. (2017). Dynamic models of large-scale brain activity. *Nature Neuroscience*, *20*(3), 340–352. https://doi.org/10.1038/nn.4497

Brumm, H., & Zollinger, S. A. (2011). The evolution of the Lombard effect: 100 years of psychoacoustic research. *Behaviour*, *148*(11), 1173–1198. https://doi.org/10.1163/000579511X605759

Buzsáki, G., & Watson, B. O. (2012). Brain rhythms and neural syntax: implications for efficient coding of cognitive content and neuropsychiatric disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *14*(4), 345–67. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23393413

Cajal, S. y. (1995). Histology of the nervous system of man and vertebrates. Retrieved from https://scholar.google.com/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Cajal%2C+S.+R.+Histology+of+the+Nervous+System+of+Man+and+Vertebrates+%28Oxford+Univ.+Press%2C+New+York%2C+1995%29.&btnG=

Casey, R. M., & Gaunt, A. S. (1985). Theoretical models of the avian syrinx. *Journal of Theoretical Biology*, *116*(1), 45–64. https://doi.org/10.1016/S0022-5193(85)80130-2

Chiel, H. J., & Beer, R. D. (1997). The brain has a body: Adaptive behavior emerges from interactions of nervous system, body and environment. *Trends in Neurosciences*, *20*(12), 553–557. https://doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01149-1

Collins, S. (2004). Vocal fighting and flirting: the functions of birdsong. In P. Marler & H. Slabbekoorn (Eds.), *Nature's Music* (pp. 39–70).

Crockford, C., Herbinger, I., Vigilant, L., & Boesch, C. (2004). Wild chimpanzees produce group-specific calls: A case for vocal learning? *Ethology*, *110*(3), 221–243. https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2004.00968.x

Dave, A. S., & Margoliash, D. (2000). Song replay during sleep and computational rules for sensorimotor vocal learning. *Science*, *290*(5492), 812–816. https://doi.org/10.1126/science.290.5492.812

Döppler, J. F., Bush, A., Goller, F., & Mindlin, G. B. (2018). From electromyographic activity to frequency modulation in zebra finch song. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, *204*(2), 209–217. https://doi.org/10.1007/s00359-017-1231-3

Doupe, A. J., & Kuhl, P. K. (1999). Birdsong and human speech: common themes and mechanisms. *Annual Review of Neuroscience*, *22*, 567–631. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.567

Elemans, C. P. H., Rasmussen, J. H., Herbst, C. T., Düring, D. N., Zollinger, S. A., Brumm, H., … Švec, J. G. (2015). Universal mechanisms of sound production and control in birds and mammals. *Nature Communications*, *6*. https://doi.org/10.1038/ncomms9978

Fee, M. S., Kozhevnikov, A. A., & Hahnloser, R. H. R. (2004). Neural Mechanisms of Vocal Sequence Generation in the Songbird. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1016*(1), 153–170. https://doi.org/10.1196/annals.1298.022

Fromkin, V., Krashen, S., Curtiss, S., Rigler, D., Language, M. R.-B. and, & 1974, U. (1974). The development of language in Genie: a case of language acquisition beyond the "critical period." *Elsevier*, *1*, 81--107. Retrieved from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093934X74900273

Garcia, S. M., Kopuchian, C., Mindlin, G. B., Fuxjager, M. J., Tubaro, P. L., & Goller, F. (2017). Evolution of Vocal Diversity through Morphological Adaptation without Vocal Learning or Complex Neural Control. *Current Biology*, *27*(17), 2677–2683.e3. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.059

Gardner, T., Cecchi, G., Magnasco, M., Laje, R., & Mindlin, G. B. (2001). Simple Motor Gestures for Birdsongs. *Physical Review Letters*, *87*(20), 208101. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.87.208101

Gaunt, A. S. (1983). An Hypothesis concerning the Relationship of Syringeal Structure to Vocal Abilities. *The Auk*. American Ornithological Society. https://doi.org/10.2307/4086413

Goldin, M. A., Alonso, L. M., Alliende, J. A., Goller, F., Mindlin, G. B., Méndez, J., … Mindlin, G. (2013). Temperature Induced Syllable Breaking Unveils Nonlinearly Interacting Timescales in Birdsong Motor Pathway. *PLoS ONE*, *8*(6), e67814. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067814

Goldin, M. A., & Mindlin, G. B. (2017). Temperature manipulation of neuronal dynamics in a forebrain motor control nucleus. *PLoS Computational Biology*, *13*(8), e1005699. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005699

Goldman, S. A., & Nottebohm, F. N. (1983). Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *80*(8), 2390–2394. https://doi.org/10.1073/pnas.80.8.2390

Goller, F., & Daley, M. A. (2001). Novel motor gestures for phonation during inspiration enhance the acoustic complexity of birdsong. *Proceedings of the Royal Society London B*, *268*, 2301–2305. https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1805

Goller, F., & Larsen, O. N. (1997). A new mechanism of sound generation in songbirds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(26), 14787–91. https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14787

Goller, F., & Riede, T. (2013). Integrative physiology of fundamental frequency control in birds. *Journal of Physiology-Paris*, *107*(3), 230–242. https://doi.org/10.1016/J.JPHYSPARIS.2012.11.001

Goller, F., & Suthers, R. A. (1996). Role of Syringeal Muscles in Controlling the Phonology of Bird Song. *Journal of Neurophysiology*, *76*(1).

Goller, F., & Suthers, R. A. (1996). Role of syringeal muscles in gating airflow and sound production in singing brown thrashers. *Journal of Neurophysiology*, *75*(2), 867–76. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8714659

Greenewalt, C. (1968). Bird song: acoustics and physiology. Retrieved from http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300457845

Guckenheimer, J., & Holmes, P. (2013). Nonlinear oscillations, dynamical systems, and bifurcations of vector fields. Retrieved from https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=XYIpBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=Guckenheimer+y+Holmes+(2013)&ots=9P1_K2WtTY&sig=6zcOgFIMO_oEKRbVDoaQesQSYTs

Hahnloser, R. H. R., Kozhevnikov, A. A., & Fee, M. S. (2002a). An ultra-sparse code underlies the generation of neural sequences in a songbird. *Nature*, *419*(6902), 65–70. https://doi.org/10.1038/nature00974

Hahnloser, R. H. R., Kozhevnikov, A. A., & Fee, M. S. (2002b). An ultra-sparse code underliesthe generation of neural sequences in a songbird. *Nature*, *419*(6902), 65–70. https://doi.org/10.1038/nature00974

Hamaguchi, K., Tanaka, M., & Mooney, R. (2016). A Distributed Recurrent Network Contributes to Temporally Precise Vocalizations. *Neuron*, *91*(3), 680–693. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.06.019

Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology*, *117*(4), 500–544. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004764

Hoppensteadt, F. C., & Izhikevich, E. M. (1997). *Weakly Connected Neural Networks*. (J. E.

Marsden & L. Sirovich, Eds.) (Vol. 126). Springer-Verlag New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1828-9

Hudspeth, A. J. (1997). How hearing happens. *Neuron*, *19*(5), 947–950. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80385-2

Kelley, D. B., & Nottebohm, F. (1979). Projections of a telencephalic auditory nucleus- field L- in the canary. *The Journal of Comparative Neurology*, *183*(3), 455–469. https://doi.org/10.1002/cne.901830302

Konishi, M. (1965). The role of auditory feedback in the control of vocalization in the white-crowned sparrow. *Ethology*. Retrieved from http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0310.1965.tb01688.x/full

Krogh, A. (1929). THE PROGRESS OF PHYSIOLOGY. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, *90*(2), 243–251. https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1929.90.2.243

Kroodsma, D. E., & Miller, E. H. (1996). *Ecology and evolution of acoustic communication in birds*. Comstock Pub.

Laje, R., Gardner, T. J., & Mindlin, G. B. (2002). Neuromuscular control of vocalizations in birdsong: A model. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, *65*(5), 1–8. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.65.051921

Laje, R., & Mindlin, G. B. (2005). Modeling source-source and source-filter acoustic interaction in birdsong. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, *72*(3), 1–11. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.72.036218

Larsen, O., & Goller, F. (2002). Direct observation of syringeal muscle function in songbirds and a parrot. *J Exp Biol*, *205*(1), 25–35. Retrieved from http://jeb.biologists.org/cgi/content/abstract/205/1/25%5Cnpapers3://publication/uuid/D745CE22-A965-433D-A576-C23F053784AD

Liu, W. C., Wada, K., Jarvis, E. D., & Nottebohm, F. (2013). Rudimentary substrates for vocal learning in a suboscine. *Nature Communications*, *4*(May), 1–12. https://doi.org/10.1038/ncomms3082

Long, M. A., & Fee, M. S. (2008). Using temperature to analyse temporal dynamics in the songbird motor pathway. *Nature*, *456*(7219), 189–194. https://doi.org/10.1038/nature07448

Lucero, J. C., & Schoentgen, J. (2013). Modeling vocal fold asymmetries with coupled van der Pol oscillators. *Proceedings of Meetings on Acoustics*, *19*, 060165–060165. https://doi.org/10.1121/1.4798467

Lynch, G. F., Okubo, T. S., Hanuschkin, A., Hahnloser, R. H. R., & Fee, M. S. (2016).

Rhythmic Continuous-Time Coding in the Songbird Analog of Vocal Motor Cortex. *Neuron*, *90*(4), 877–892. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.021

Lynch, M. A. (2004). Long-Term Potentiation and Memory. *Physiological Reviews*, *84*(1), 87–136. https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2003

Margoliash, D. (1986). Preference for autogenous song by auditory neurons in a song system nucleus of the white-crowned sparrow. *The Journal of Neuroscience*, *6*. Retrieved from http://pondside.uchicago.edu/oba/Faculty/Margoliash/lab/pdfs/1986 Margoliash JNsci.PDF

Marler, P. (2004a). Bird calls: a cornucopia for communication. In *Nature's Music* (pp. 132–178).

Marler, P. (2004b). Bird Calls: Their Potential for Behavioral Neurobiology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1016*, 31--44.

Marler, P., & Slabbekoorn, H. (2004). Nature' s Music.

McCasland, J. S., & Konishi, M. (1981). Interaction between auditory and motor activities in an avian song control nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *78*(12).

McCowan, B., & Reiss, D. (1997). Vocal learning in captive bottlenose dolphins: a comparison with humans and nonhuman animals. In C. T. Snowdon & M. Hausberger (Eds.), *Social influences on vocal development* (pp. 178--207). Cambridge university Press. Retrieved from https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=U7h3s79HcrAC&oi=fnd&pg=PA178&dq=McCowan+y+Reiss+1997&ots=o5zsaIb5or&sig=lNPYVXtWCcPfKR-2gP0VogtdWpU

Mindlin, G. B. (2017a). Avian vocal production beyond low dimensional models. *Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment*, *2017*(2). https://doi.org/10.1088/1742-5468/aa54d8

Mindlin, G. B. (2017b). Nonlinear dynamics in the study of birdsong. *Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science*, *27*(9), 92101. https://doi.org/10.1063/1.4986932

Mindlin, G. B., Gardner, T. J., Goller, F., & Suthers, R. (2003). Experimental support for a model of birdsong production. *Physical Review. E, Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, *68*(4 Pt 1), 41908. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.68.041908

Mindlin, G. B., & Laje, R. (2005). *The Physics of Birdsong*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Mooney, R. (2000). Different subthreshold mechanisms underlie song selectivity in identified HVc neurons of the zebra finch. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *20*(14), 5420–5436. https://doi.org/20/14/5420 [pii]

Murre, J. M. J., & Sturdy, D. P. F. (1995). The connectivity of the brain: mulit-level quantitative analysis. *Biological Cybernetics*, *73*, 529–545. https://doi.org/10.1007/BF00199545

Nemeth, E., Pieretti, N., Zollinger, S. A., Geberzahn, N., Partecke, J., Miranda, A. C., & Brumm, H. (2012). Bird song and anthropogenic noise: vocal constraints may explain why birds sing higher-frequency songs in cities. *Proceedings of the Royal Society London B*. https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2798

Nick, T. A., & Konishi, M. (2005). Neural auditory selectivity develops in parallel with song. *Journal of Neurobiology*, *62*(4), 469–481. https://doi.org/10.1002/neu.20115

Nottebohm, F., Stokes, T. M., & Leonard, C. M. (1976). Central control of song in the canary,Serinus canarius. *The Journal of Comparative Neurology*, *165*(4), 457–486. https://doi.org/10.1002/cne.901650405

Oller, D. K., & Eilers, R. E. (1988). The role of audition in infant babbling. *Child Development*, 441--449. Retrieved from http://www.jstor.org/stable/1130323

Ott, E., & Antonsen, T. M. (2008). Low dimensional behavior of large systems of globally coupled oscillators. *Chaos*, *18*(3). https://doi.org/10.1063/1.2930766

P Marler. (2004). Science and birdsong: the good old days. In *Nature's Music* (pp. 1–38). Retrieved from https://scholar.google.com/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=science+and+birdsong%3A+the+good+old+days+marler&btnG=

Perl, Y. S., Arneodo, E. M., Amador, A., Goller, F., & Mindlin, G. B. (2011). Reconstruction of physiological instructions from Zebra finch song. *Physical Review E*, *84*(5), 51909. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.84.051909

Poole, J. H., Tyack, P. L., Stoeger-Horwath, A. S., & Watwood, S. (2005). Elephants are capable of vocal learning. *Nature*, *434*(7032), 455–456. https://doi.org/10.1038/434455a

Prather, J. F., Peters, S., Nowicki, S., & Mooney, R. (2008). Precise auditory-vocal mirroring in neurons for learned vocal communication. *Nature*, *451*(7176), 305–310. https://doi.org/10.1038/nature06492

Quiroga, R. Q., Nadasdy, Z., & Ben-Shaul, Y. (2004). Unsupervised Spike Detection and Sorting with Wavelets and Superparamagnetic Clustering. *Neural Computation*, *16*(8), 1661–1687. https://doi.org/10.1162/089976604774201631

Rauske, P. L., Shea, S. D., & Margoliash, D. (2003). State and Neuronal Class-Dependent Reconfiguration in the Avian Song System. *Journal of Neurophysiology*, *89*(3).

Reiner, A., Perkel, D. K., Mello, C. V., & Jarvis, E. D. (2004). Songbirds and the Revised

Avian Brain Nomenclature. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *5*.

Riede, T., & Goller, F. (2010). Peripheral mechanisms for vocal production in birds – differences and similarities to human speech and singing. *Brain and Language*, *115*(1), 69–80. https://doi.org/10.1016/J.BANDL.2009.11.003

Riede, T., Suthers, R. A., Fletcher, N. H., Blevins, W. E., & Marler, P. (2006). Songbirds tune their vocal tract to the fundamental frequency of their song. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(14), 2243–5548. Retrieved from http://www.pnas.org/content/pnas/103/14/5543.full.pdf

Roulet, J., & Mindlin, G. B. (2016). Average activity of excitatory and inhibitory neural populations. *Chaos*, *26*(9). https://doi.org/10.1063/1.4962326

Schmidt, M. F. (2003). Pattern of Interhemispheric Synchronization in HVc During Singing Correlates With Key Transitions in the Song Pattern. *Journal of Neurophysiology*, *90*(6), 3931–3949. https://doi.org/10.1152/jn.00003.2003

Schmidt, M. F. (2008). Using both sides of your brain: The case for rapid interhemispheric switching. *PLoS Biology*, *6*(10), 2089–2093. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060269

Schmidt, M. F. (2009). Neural Control of Birdsong. In *eLS*. John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021400

Schmidt, M. F., Ashmore, R. C., & Vu, E. T. (2004). Bilateral Control and Interhemispheric Coordination in the Avian Song Motor System. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1016*(1), 171–186. https://doi.org/10.1196/annals.1298.014

Sitt, J., Amador, A., Goller, F., & Mindlin, G. B. (2008). Dynamical origin of spectrally rich vocalizations in birdsong. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*. Retrieved from https://journals.aps.org/pre/abstract/10.1103/PhysRevE.78.011905

Sitt, J. D., Amador, A., Goller, F., & Mindlin, G. B. (2008). Dynamical origin of spectrally rich vocalizations in birdsong. *Physical Review E*, *78*(1), 11905. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.78.011905

Solis, M., & Doupe, A. J. (1997). Anterior forebrain neurons develop selectivity by an intermediate stage of birdsong learning. *The Journal of Neuroscience*, *17*(16), 6447–6462. Retrieved from http://www.jneurosci.org/user/logout?current=node/354065

Stokes, T. M., Leonard, C. M., & Nottebohm, F. (1974). The telencephalon, diencephalon, and mesencephalon of the canary, Serinus canaria, in stereotaxic coordinates. *The Journal of Comparative Neurology*, *156*(3), 337–374. https://doi.org/10.1002/cne.901560305

Strogatz, S. H. (1994). *Nonlinear Dynamics and Chaos: With Applications to physics, biology,*

chemistry, and engineering. https://doi.org/10.1063/1.2807947

Sturdy, C. B., Wild, J. M., & Mooney, R. (2003). Respiratory and Telencephalic Modulation of Vocal Motor Neurons in the Zebra Finch. *The Journal of Neuroscience*, *23*(3), 1072–1086. Retrieved from http://www.jneurosci.org/content/jneuro/23/3/1072.full.pdf

Suarez, M. de los A. (2011). Manual de Seguridad e Higiene de Animales de Experimentación.

Sugiura, H. (1998). Matching of acoustic features during the vocal exchange of coo calls by Japanese macaques. *Animal Behaviour*, *55*(3), 673–687. https://doi.org/10.1006/ANBE.1997.0602

Suthers, R. A. (2001). Peripheral vocal mechanisms in birds: Are songbirds special? *Netherlands Journal of Zoology*, *51*(2), 217–242. https://doi.org/10.1163/156854201X00288

Suthers, R. A., Vallet, E., Lie Tanvez, A., & Kreutzer, M. (2004). Bilateral Song Production in Domestic Canaries. *J Neurobiol*, *60*, 381–393. https://doi.org/10.1002/neu.20040

Suthers, R. A., Vallet, E., Tanvez, A., & Kreutzer, M. (2004). Bilateral song production in domestic canaries. *Journal of Neurobiology*, *60*(3), 381–393. https://doi.org/10.1002/neu.20040

Tchernichovski, O., Nottebohm, F., Elizabeth, C. H., Pesaran, B., & Pratim Mitra, P. (2000). A procedure for an automated measurement of song similarity. *ANIMAL BEHAVIOUR*, *59*, 0–0. https://doi.org/10.1006/anbe.1999.1416

Titze, I. R. (1988). The physics of small-amplitude oscillation of the vocal folds. *The Journal of the Acoustical Society of America*, *83*(4), 1536–1552. https://doi.org/10.1121/1.395910

Trevisan, M. A., Mendez, J. M., & Mindlin, G. B. (2006). Respiratory patterns in oscine birds during normal respiration and song production. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, *73*. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.73.061911

Trevisan, M. A., Mindlin, G. B., & Goller, F. (2006). Nonlinear model predicts diverse respiratory patterns of birdsong. *Physical Review Letters*, *96*(5). https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.96.058103

Troyer, T. W. (2013). Neuroscience: The units of a song. *Nature*, *495*(7439), 56–57. https://doi.org/10.1038/nature11957

Tytell, E. D., Holmes, P., & Cohen, A. H. (2011). Spikes alone do not behavior make: Why neuroscience needs biomechanics. *Current Opinion in Neurobiology*, *21*(5), 816–822. https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.05.017

Vallet, E., Kreutzer, M., Beme, I., & Kiosseva, L. (1997). Sexy syllables in male canary songs:

honest signals of motor constraints on male vocal production. *Advances in Ethology*, *32*, 132.

Vicario, D. S. (1991). Contributions of Syringeal Muscles to Respiration and Vocalization in the Zebra Finch. *Journal of Neurobiology*, *22*(1), 63–73. Retrieved from http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/neu.480220107/asset/480220107_ftp.pdf?v=1&t=jeuh5mtg&s=984007c2cc9837d40af9526b89beb11b927e1a7b&systemMessage=Wiley+Online+Library+is+migrating+to+a+new+platform+powered+by+Atypon%2C+the+leading+provider+of+sch

Vicario, D. S., & Simpson, H. B. (1995). Electrical stimulation in forebrain nuclei elicits learned vocal patterns in songbirds. *Journal of Neurophysiology*, *73*(6), 2602–7. https://doi.org/10.1152/jn.1995.73.6.2602

Vicario, D. S., & Yohay, K. H. (1993). Song-selective auditory input to a forebrain vocal control nucleus in the zebra finch. *Journal of Neurobiology*, *24*(4), 488–505. https://doi.org/10.1002/neu.480240407

Wild, J. M., Li, D., & Eagleton, C. (1997). Projections of the dorsomedial nucleus of the intercollicular complex (DM) in relation to respiratory-vocal nuclei in the brainstem of pigeon (Columba livia) and zebra finch (Taeniopygia guttata). *Journal of Comparative Neurology*, *377*(3), 392–413. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19970120)377:3<392::AID-CNE7>3.0.CO;2-Y

Williams, H., & Vicario, D. S. (1993). Temporal patterning of song production: Participation of nucleus uvaeformis of the thalamus. *Journal of Neurobiology*, *24*(7), 903–912. https://doi.org/10.1002/neu.480240704

Williams, T. L., Bowtell, G., Carling, J. C., Sigvardt, K. A., & Curtin, N. A. (1995). Interactions between muscle activation, body curvature and the water in the swimming lamprey. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, *49*, 49–59. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8571235

Yartsev, M. M. (2017). The emperor's new wardrobe: Rebalancing diversity of animal models in neuroscience research. *Science*, *358*(6362), 466–469. https://doi.org/10.1126/science.aan8865

Yu, A. C., & Margoliash, D. (1996). Temporal hierarchical control of singing in birds. *Science (New York, N.Y.)*, *273*(5283), 1871–5. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.273.5283.1871

6 APÉNDICES

APÉNDICE 1: PROTOCOLOS EXPERIMENTALES 140

APÉNDICE 2: CÓDIGOS 165

APÉNDICE 1: PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

En esta sección se describen los protocolos utilizados para registrar las distintas variables fisiológicas reportadas en esta tesis.

Estos protocolos fueron evaluados y certificados por la Médica Veterinaria María de los Ángeles Suarez siguiendo las normas dispuestas por el *Comité Institucional de Cuidado Animal* (CICUAL), e integran el Manual de Procedimientos y Buenas Practicas de Experimentación del Laboratorio de Sistemas Dinámicos.

6.1 Cuarentena y Control Sanitario

Las aves de experimentación son adquiridas de criadores comerciales luego de una evaluación de actitud, vocalización y robustez aparente.

Al momento del ingreso al laboratorio se registra en una ficha individual datos identificatorios de cada ave y observaciones iniciales sobre el estado clínico del animal. Luego se colocan anillos de colores que sirven para facilitar su identificación dentro del aviario.

Durante los primeros 10 días las aves son mantenidas en la "sala de cuarentena", dónde reciben antiparasitarios internos y externos. Este protocolo tiene como objetivo asegurar un tratamiento sanitario básico previo a que las aves se pongan en contacto con el resto de los individuos del aviario así como permitir la adaptación de las aves al nuevo ambiente (Suarez, 2011). Una vez finalizado este período, de no tener alguna patología observable, las aves son trasportadas a la sala de "aves en experimentación".

Durante el período comprendido entre la cuarentena y el cual un individuo comienza un protocolo particular de experimentación las aves son mantenidas en aviarios comunes donde conviven con otros individuos. Al ingresar a un protocolo determinado, se los trasladada a jaulas individuales, para tener un control preciso sobre el estado de salud de cada animal en experimentación.

Una vez concluido el experimento se evalúa el estado de salud del animal y se decide si se conserva para la realización de otros estudios o si se sacrifica (Suarez, 2011).

PERIFERIA

6.2 Presión de los sacos aéreos

La presión de los sacos aéreos se obtiene a partir de una cirugía en la cual se inserta una cánula (conectada a un transductor de presión) en uno de los sacos aéreos ventrales del ave.

A continuación, detallaré el desarrollo de la cirugía y describiré el instrumental utilizado para esta medición.

6.2.1 Procedimientos quirúrgicos

En primer lugar, se anestesia al ave con una inyección intramuscular de una dilución de Ketamina y Midazolam (K-4:10, M-2:10). Se aplican 10 µl de solución/g del ave en 3 o 4 dosis, separadas por 10-15 minutos. Esta dilución permite tener una anestesia general eficaz, ya que la Ketamina produce disociación funcional y un alto grado de analgesia, y el Midazolam produce relajamiento muscular (Suarez, 2011)[1].

Una vez comprobado el plano anestésico[2], se coloca el ave en posición decúbito dorsal sobre una manta térmica y se procede a desinfectar el área quirúrgica: 15mm por encima del arco costal y 10mm por debajo del lado del mismo, en que se introducirá la cánula. Posteriormente, con ayuda de un fórceps, se realiza un orificio de 3mm de diámetro, ubicado 5mm hacia la lateral de la prolongación ventral de la quilla y 3mm en dirección ventral del arco costal (ver esquema en Figura 6.A).

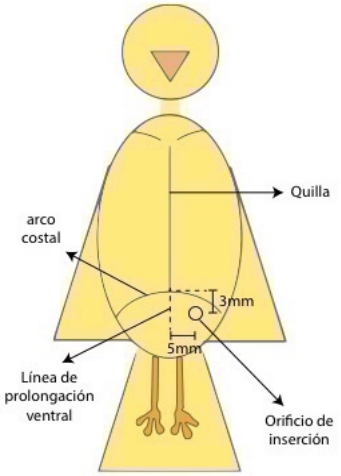


Figura 6.A: Esquema de canario en posición decúbito dorsal con referencias para la inserción de la cánula de presión.

Luego se introduce una cánula de silicona (*AM-SYSTEMS* Silicone Tubing 0.030" x 0.065" x 0.0175" CATALOG#807000) de 10cm de largo en el orificio (ver Figura 6.C), aproximadamente 5mm dentro del saco aéreo ventral[3].

[1] También puede realizarse con anestesia gaseosa utilizando Isofluorano. Ver detalle en sección 6.4.1.1.
[2] Se evalúa la respuesta defensiva a estimulación nociceptiva; por ejemplo, una anestesia profunda se corresponde con la ausencia de acto reflejo frente al punzamiento de las almohadillas plantares.
[3] Cuando la cánula se encuentra en el interior del saco aéreo se suele observar condensación dentro de la cánula en el extremo proximal al orificio producto de la respiración del ave.

Se fija la cánula mediante un punto de anclaje a la última costilla y se coloca cianoacrilato (adhesivo quirúrgico) sobre los bordes de la misma.

Finalmente, se conecta el extremo distal a un dispositivo transductor de presión, que se monta sobre la *"mochila"* en el dorso del ave. Y se la deposita en una jaula individual sobre una manta térmica para que el ave se recupere adecuadamente de la cirugía.

6.2.2 Setup

En la Figura 6.B se muestra un esquema general del Setup de adquisición, con las instancias de monitoreo de la señal.

Los gestos de presión de los sacos aéreos son censados por un traductor de presión, luego reciben una instancia de Preamplificación y una Amplificación (con ganancia regulable) y son digitalizados por una placa de conversión analógico-digital (*National Instruments* BNC-2110). Paralelamente se graba el canto con un micrófono direccional (*TAKSTAR* SGC568*)* y un amplificador de sonido (*Behringer* Tube Ultragain MIC100). Finalmente, ambas señales son adquiridas con MATLAB (ver códigos en Apéndice 2).

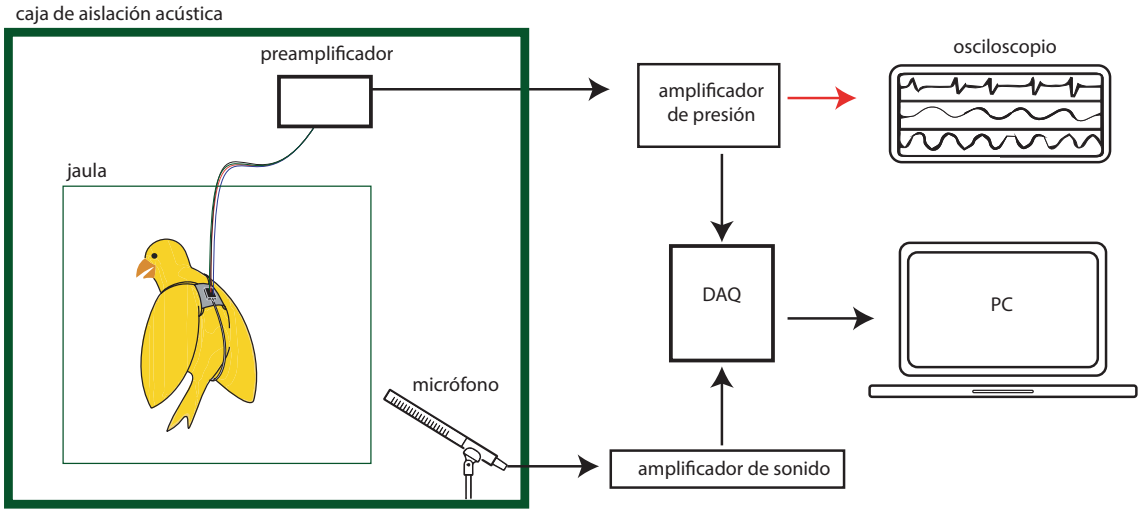


Figura 6.B: Esquema general del setup de adquisición de presión. La señal de presión registrada es Preamplificada en las inmediaciones de la jaula, luego recibe una segunda Amplificación fuera de la caja de aislación acústica dónde puede ser monitoreada utilizando un osciloscopio. Por otro lado, se dispone de un micrófono direccional para grabar el sonido de las vocalizaciones y un amplificador comercial. Ambas señales son digitalizadas con una placa de Conversión Analógico-Digital (DAQ) y adquiridas con MATLAB.

Como parte de los dispositivos que utilizamos en el Laboratorio de Sistemas Dinámicos son hechos "a medida", haré hincapié en su descripción como parte de los *setups* experimentales (secciones 6.2.2.2, 6.2.2.3, 6.3.2.2, 6.6.1.1).

En esta sección, describiré el sensor de presión utilizado, los circuitos de *Alimentación*, *Preamplificador* y *Amplificación* empleados para la adquisición de los gestos de presión. Construidos por Tatiana Alonso Amor y Ezequiel Arneodo.

6.2.2.1 Sensor de presión

Una pieza clave de cualquier *Setup* es lógicamente el sensor utilizado. En este caso el traductor de presión FHM 02PGR de *Fujikura*. Este sensor ha sido ampliamente utilizado para este tipo de mediciones en animales pequeños ya que tiene un reducido peso (0.6g) y tamaño (14x8x10 mm^3).

Básicamente, el sensor tiene un elemento piezorresistivo que al ser sometido a fuerzas producto de las diferencias de presión, cambia ligeramente su conformación y emite una diferencia de voltaje proporcional a la fuerza ejercida.

En la Figura 6.C se muestra una foto del sensor utilizado (derecha) junto con el cable de conexión trenzado y la cánula de presión (izquierda).

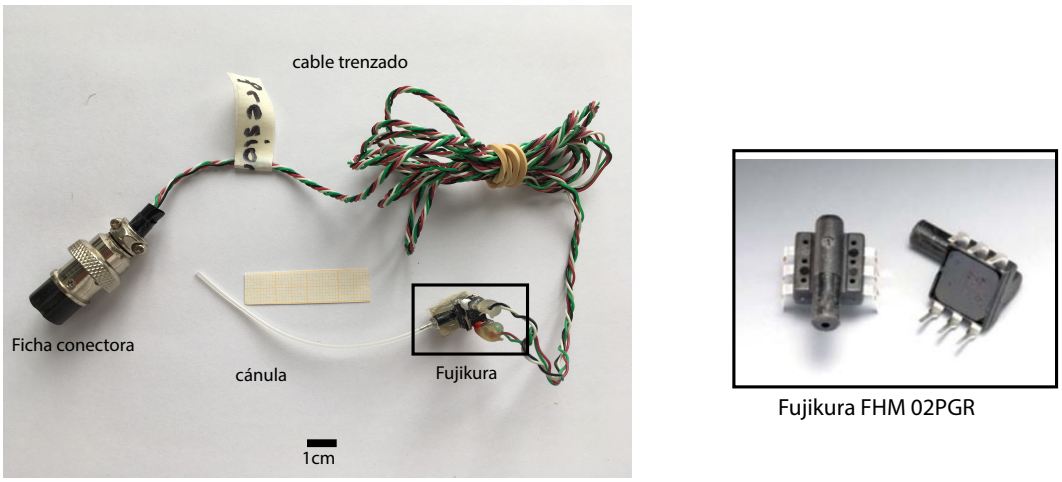


Figura 6.C: Sensor de Presión *Fujikura* FHM O2PGR. (Izquierda) Cable de alimentación y salida conectado al sensor de Presión y cánula. (Derecha) Vistas del Fujikura FHM 02PGR.

6.2.2.2 Alimentación y Preamplificación

El sensor de presión requiere una alimentación de 1.5mA entre las patas 5 y 2. Para ello, se construyó una fuente de corriente usando un regulador de tensión (LM385) y un circuito amplificador operacional (OP290). Ver Figura 6.D.b, llave “Fuente de corriente”.

El LM385 permite fijar un potencial de referencia en 1.24V, luego mediante el integrado OP290 y una resistencia de 820Ω se obtiene la corriente de alimentación, dada por $I=Vref/R$ (≈ 1.51mA).

Asociado al circuito de alimentación, se agregó un circuito preamplificador que permite acondicionar la señal para mejorar la precisión en las mediciones, al aumentar la relación señal/ruido en la proximidad del sensor (dentro de la caja de aislación acústica).

El preamplificador utiliza un amplificador diferencial AD620; Este circuito integrado permite amplificar la diferencia entre las tensiones de entrada (en las patas 2 y 3) que, en este caso se corresponden a la salida del *Fujikura*. La ganancia de esta amplificación depende de una resistencia que se conecta entre los terminales 8 y 1 ($G = 1 + \frac{49.4\text{k}\Omega}{Rg}$). En este caso se utilizó una resistencia de 820 Ω lo cual da una ganancia de ≈ 60.

Ambos circuitos tienen una alimentación externa de +12V de continua y GND conectada a tierra.

En la Figura 6.D.a se muestra un diagrama del sensor y del conector con las referencias de los cables utilizados para conectar el sensor al Preamplificador. En la Figura 6.D.b se muestra el circuito utilizado para la *Alimentación* y la primera etapa de amplificación (*Preamplificación*). En la Tabla 4 se detalla la disposición (y los colores) de los cables que conectan el sensor al circuito.

Conexión al Fujicura	**Ficha conectora de cable trenzado externo (color)**	**Cable interno desde ficha del conector al circuito (color)**
1 – 6 (conexión Puente)	4 (verde)	C (marrón)
2	1 (rojo)	B (rojo)
3	3 (negro)	D (negro)
5	2 (blanco)	A (amarillo)

Tabla 4: Código de colores de cables y conexiones. El cable trenzado es aquel que conecta el *Fujikura* con la entrada del circuito de *Alimentación/Preamplificación,* el cable interno corresponde a la conexión de la ficha de entrada al circuito.

6.2.2.3 Segunda etapa de amplificación

Este circuito permite cambiar independientemente la tensión de base (Offset) sobre la cual está montada la señal de presión y realizar una segunda amplificación de la misma. El acondicionamiento final de la señal de presión permite controlar que la señal no sature y que el nivel de amplificación sea el adecuado antes de adquirirla. En la Figura 6.D.c se muestra el detalle del circuito.

En primer lugar, se construyó el circuito que genera una tensión de offset. En esta rama del circuito primero se fija un potencial de referencia (Vref:1.24V) con un regulador de tensión (LM317) y una resistencia de 725kΩ; luego se obtiene el potencial de referencia opuesto (-Vref) utilizando un amplificador inversor de ganancia 1 (TL084). Seguidamente, se conecta a un potenciómetro de 10kΩ (Potenciómetro Offset) que, al variar su resistencia interna genera una salida en el rango de voltajes entre -Vref y Vref. Y al finalizar, se amplifica por 5,7 utilizando otra entrada del amplificador diferencial (TL084).

Por otro lado, tiene un circuito de amplificación de amplitud variable dónde se amplifica la señal de presión utilizando nuevamente el TL084, ésta vez con una resistencia variable (potenciómetro de 50kΩ). Finalmente se suman la señal de Offset y la señal amplificada.

6.3 Actividad electromiográfica del músculo *siringealis ventralis*

En esta sección se describen los procedimientos realizados para obtener la actividad electromiográfica (EMG) del músculo *siringealis ventralis*. Esta técnica consiste en insertar electrodos en el músculo para registrar las diferencias de voltaje producto de la contracción de las fibras musculares durante las vocalizaciones.

6.3.1 Procedimientos quirúrgicos

Al igual que en la sección 6.2 se comienza por anestesiar el ave con una dilución de Ketamina y Midazolan. Una vez comprobado el plano anestésico se coloca y fija el ave en posición decúbito dorsal sobre una plataforma móvil que permite cambiar la inclinación de manera continua, lo cual ayuda a controlar el ángulo de visión durante la intervención.

La primera etapa de la cirugía consiste en preparar el acceso a la siringe. Para ello, se comienza con la desinfección del área quirúrgica (cuello, por línea media). Luego se realiza un corte de unos 15mm por encima del extremo superior de la quilla, hasta llegar a la misma. Esta incisión permite acceder a la siringe a través del saco aéreo interclavicular. Luego, utilizando un par de fórceps, se extrae el tejido adiposo subcutáneo hasta visualizar claramente el saco.

Utilizando un fórceps grueso (punta roma) se presiona ligeramente el saco intentando ver a través de él los anillos de la tráquea y la siringe. Una vez comprobada la posición, se realiza un pequeño orificio[4] sobre la membrana del saco aéreo a la altura de la siringe.

[4] La membrana de los sacos aéreos es sumamente elástica por lo que se intenta hacer un orificio pequeño, del menor tamaño posible que permita visualizar la siringe e insertar los electrodos. Cuanto más grande el orificio, por un lado, se obtienen una mayor visibilidad, pero por otro lado se dificulta el cerrado del tejido posterior.

En la siguiente etapa, se procede a implantar un par de electrodos en el músculo. Los electrodos consisten de dos cables de 10-12cm de largo enrollados entre sí, con los extremos libres (ver Figura 6.F). Cada electrodo tiene en un extremo una "*punta de inserción"* de aproximadamente 5mm donde cada electrodo se encuentra fuertemente enrollado y sin el recubrimiento del cable. Esto permite tener una superficie conductora, con la rigidez suficiente como para penetrar el músculo.

Se sujetan los electrodos con un fórceps, a unos 5-7mm de la punta de inserción y se los clava en el músculo ejerciendo una leve presión. Ambos electrodos han de insertarse en el mismo músculo dado que luego se registrará la diferencia de voltaje entre ellos.

Una vez que ambos electrodos fueron implantados, se coloca una gota de adhesivo quirúrgico (*Surgi-lock* 2oc) para anclar los electrodos[5] al músculo.

La siguiente fase consiste en cerrar con adhesivo quirúrgico el saco aéreo interclavicular. Los sacos aéreos tienen un tejido muy delgado y sumamente elástico por lo que suele ser muy difícil reconstruirlo. A su vez, dado que los electrodos emergen del saco, se debe dejar un pequeño orificio para que no queden sujetos al saco aéreo, ya que se pueden soltar con los cambios de volumen producto de la respiración.

Para reconstruir el saco aéreo primero se toman dos porciones de tejido y se las sujeta en un mismo fórceps (para liberar una mano); luego se aplica una gota de adhesivo quirúrgico sobre la unión, cuidando de mantenerlos unidos por unos segundos. Este proceso se repite de forma iterativa adhiriendo de a pequeñas porciones de tejido hasta que el saco se encuentra completamente cerrado y se vuelven a observar las fluctuaciones de volumen producto de la respiración[6].

[5] Esta maniobra suele ser muy delicada ya que se puede derramar mucho adhesivo sobre el músculo o accidentalmente alguno de los electrodos ya que se manipula el adhesivo en un área muy pequeña.
[6] Se puede utilizar restos de tejido adiposo extraído para tapar orificios en el saco. En particular, ayuda utilizar una bola de tejido graso para tapar el orificio de salida de los electrodos.

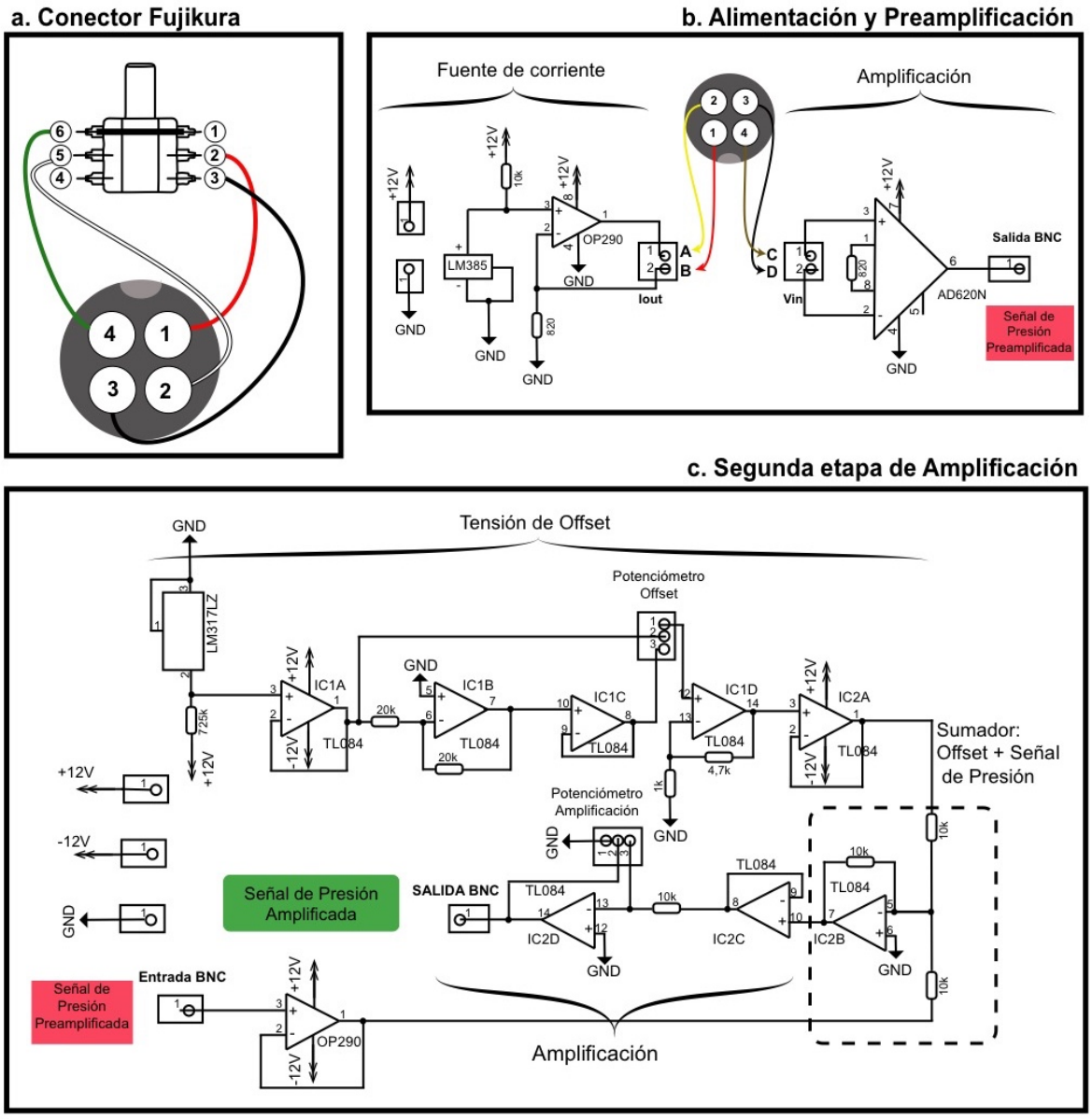


Figura 6.D: Detalle de los circuitos de Alimentación, Preamplificación y Amplificación de la señal de presión.

Seguido a esto, se introducen unos centímetros de electrodo en la incisión (espacio entre el saco aéreo y la piel)[7] y se sutura la piel.

La última etapa consiste en pasar subcutáneamente los electrodos entre la cabeza y el ala haciéndolos emerger a nivel de la espalda, donde se los suelda a los terminales de una Placa de Preamplificación adherida a la *"mochila"*.

[7] Esto actúa como amortiguador para que los esfuerzos realizados sobre los electrodos por la manipulación en el resto de la cirugía, no consigan remover el anclaje al músculo.

Al finalizar se coloca al ave en una jaula individual donde se recupera de la cirugía.

6.3.2 Setup

El Setup de adquisición de EMG consiste en un par de electrodos (*California Fine Wire*), una mochila de Preamplificación, un Amplificador instrumental (*BROWNLEE PRECISION* Model 440), una placa de adquisición (*National Instruments* BNC-2110), un micrófono direccional (*TAKSTAR* SGC568) y un amplificador de sonido (*Behringer* Tube Ultragain MIC100).

En la Figura 6.E se muestra un diagrama de conexiones del setup utilizado. Básicamente, la señal de EMG registrada por los electrodos (al igual que el sonido) recibe una serie de amplificaciones mediante distintos dispositivos analógicos, hasta ser digitalizada por la placa de adquisición DAQ y adquirida con MATLAB (ver códigos en Apéndice 2).

A continuación, haré una descripción de la construcción de los electrodos intramusculares y de la electrónica desarrollada para este experimento (*Placa de Preamplificación para EMG*).

6.3.2.1 Electrodos

Los electrodos de EMG tienen que cumplir principalmente con dos propiedades: 1) Deben ser lo suficientemente delgados como para no lesionar demasiado los músculos y que el ave pueda cantar normalmente. Y 2) tienen que poder penetrar el músculo, lo cual impone la necesidad de que al menos la porción de inserción del electrodo tenga una rigidez considerable.

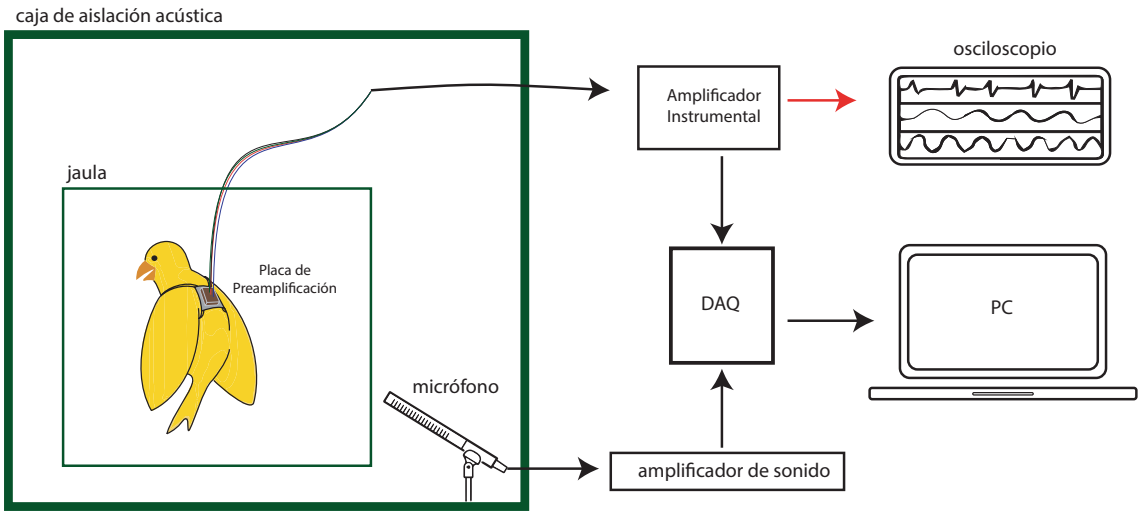


Figura 6.E: Diagrama del Setup utilizado para la adquisición de actividad electromiográfica.

A continuación, detallaré el protocolo de construcción de electrodos a partir del cable *California Fine Wire (*size:001, stainless steel 304 HML NATRL), que satisface las 2 características anteriormente mencionadas.

En la Figura 6.F se muestra: (a) una foto de un par de electrodos, (b) un esquema de los mismos, con una serie de viñetas de referencia para su construcción y (c) el cable de alimentación/salida de la placa de Preamplificación.

Como se observa en la Figura 6.F.b, la construcción puede resumirse en los siguientes 5 pasos:

(i) Primero hace un lazo con el cable de unos 15cm. Utilizando un fórceps se retira el recubrimiento en un extremo (≈1cm) y se delimita la porción de electrodo expuesta con una gota de esmalte de color en los extremos. Se coloca un peso (o *"buzo"*) en un extremo y se cuelga de una cruceta el otro extremo. Se enhebra el lazo con una varilla delimitando el largo máximo de la punta a 1cm (entre el *buzo* y la varilla)[8].

(ii) Se enciende el agitador magnético y, cuidando de que el *buzo* gire a bajas revoluciones, se enrolla de forma bien compacta la punta de inserción. Luego, se corta el extremo próximo al buzo.

(iii) Se coloca una gota de pegamento epoxi en el extremo superior de la zona enrollada, para evitar que el electrodo se desenrolle. Se remueve la cinta de papel que une el lazo[9].

(iv) Se arma un nuevo lazo con los dos electrodos utilizando cinta de papel para atar los mismos, dejando 2-3cm de electrodo libre en ambos extremos[10]. Se cuelga el nuevo lazo de la cruceta y se coloca el *buzo* sobre la cinta de papel que queda libre. Luego se prende el agitador magnético y se enrolla levemente ambos electrodos entre sí[11].

(v) Finalmente se coloca pegamento epoxi en ambos extremos de la zona enrollada; se remueven las cintas y se realiza el corte final de los extremos de inserción dejando una punta de entre 3 y 5mm.

6.3.2.2 Placa de Preamplificación para EMG.

Como se puede observar en la Figura 6.G, la placa tiene dos circuitos de amplificación en paralelo, lo cual permite amplificar dos entradas de manera independiente.

Básicamente, cada circuito tiene un filtro para remover el ruido de línea ($Fc = \frac{1}{2\pi RC}$) y luego una etapa de amplificación. Para ello se utiliza un AD620 (superficial) conectado en *"Modo común":* La señal filtrada entra en los pines 2 y 3; Entre los pines 1 y 8 se conectan 3

[8] La varilla y la cruceta se fijan al parante vertical de un Agitador Magnético.
[9] El proceso i, ii, iii se repite con el otro electrodo.
[10] Esto permite insertar o soldar (extremo terminal) de a uno a la vez los electrodos.
[11] Se cuida de que no se enrollen demasiado ya que aumenta la rigidez y dificulta la manipulación durante la cirugía.

resistencias de 680Ω en paralelo. Esta configuración tiene una ganancia de G≈ 219 (dada por $G = 1 + \frac{49.4k\Omega}{Rg}$, $Rg = \frac{1}{3(1/680)}$).

Se alimenta el circuito con -12Vy +12V de baterías para evitar la contaminación de la señal y se referencia la tierra al 0V de las baterías. En la Figura 6.Fc se muestra una foto del cable de alimentación/salida de la placa de Preamplificación, con las referencias para su conexión a la misma.

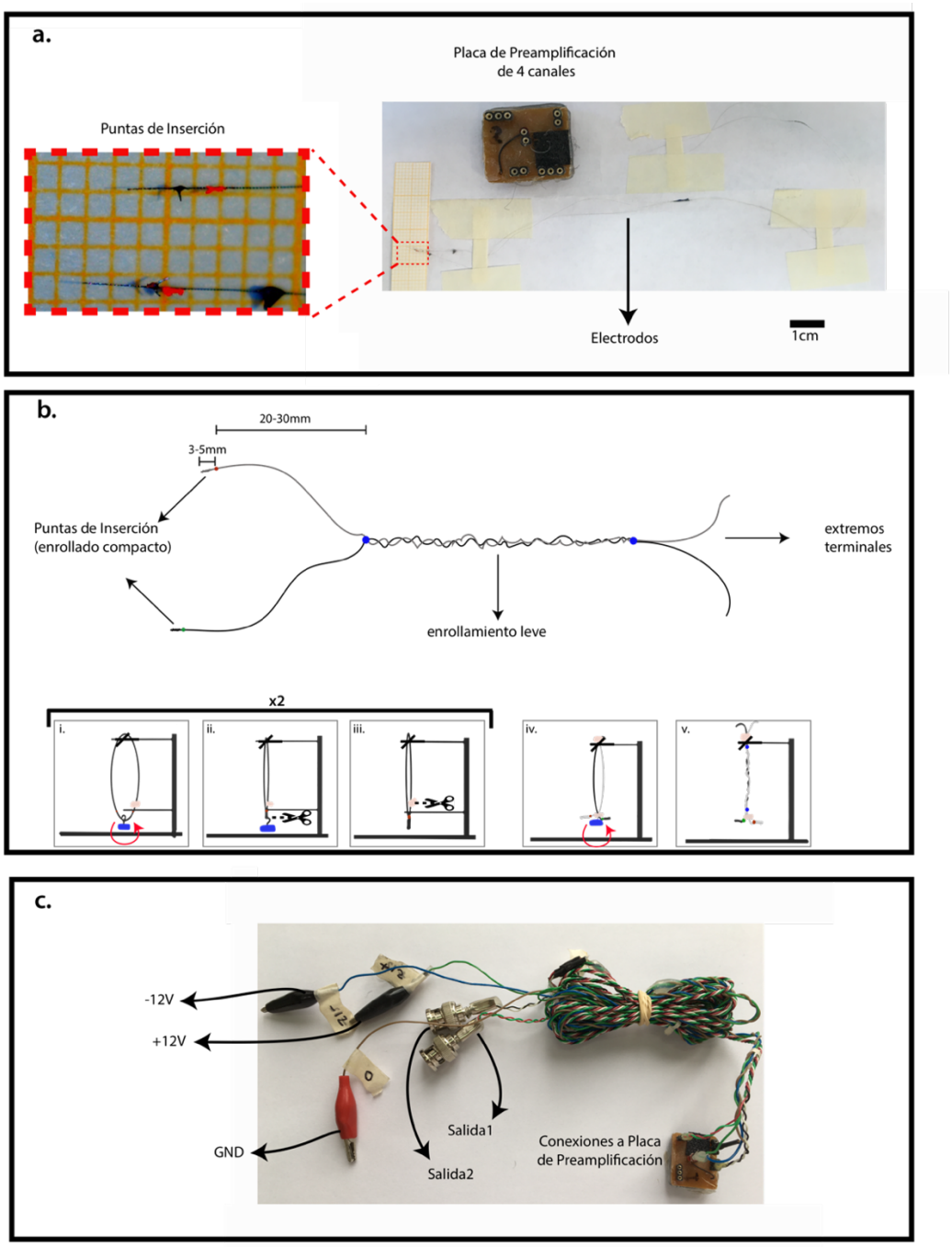


Figura 6.F: Electrodo intramuscular para la medición de actividad Electromiográfica. (a) Fotografía de par de electrodos intramusculares. En el recuadro rojo se muestra una fotografía aumentada de las puntas de inserción. (b) Esquema de electrodo con viñetas de

referencia para la construcción. (c) Cable de alimentación y salida conectado a Placa de Preamplificación.

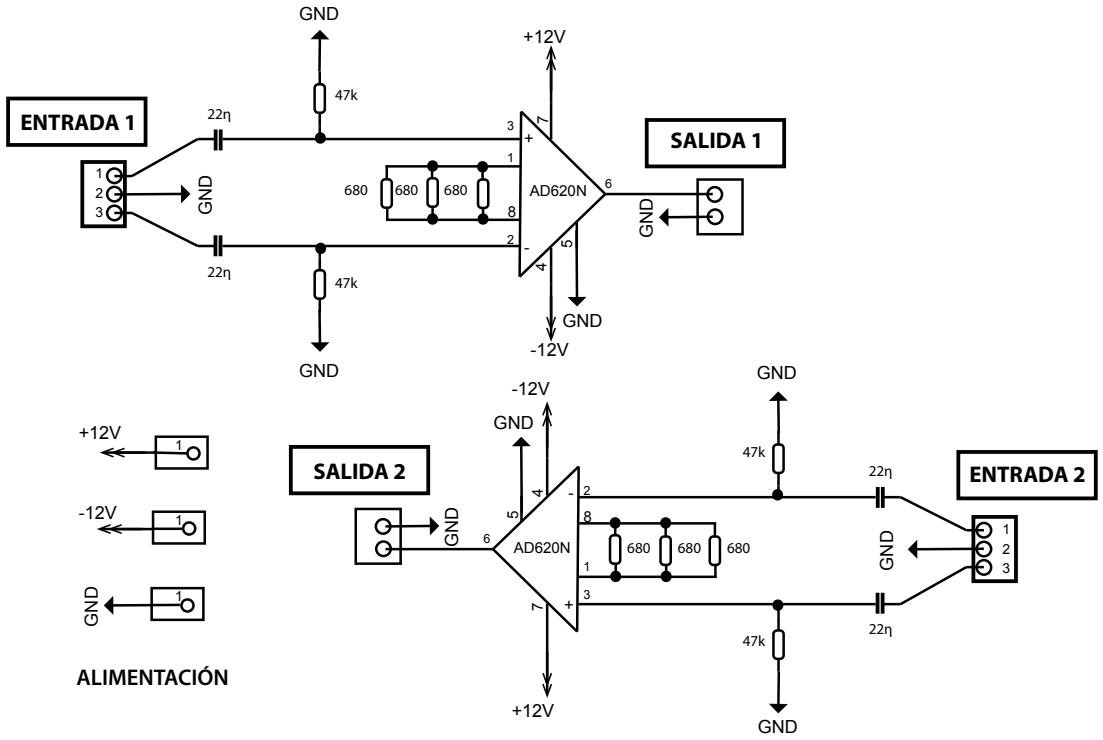


Figura 6.G: Detalle Circuito de Preamplificación de actividad electromiográfica.

SISTEMA NERVIOSO

6.4 Actividad single-unit & multi-units en el núcleo HVC

La actividad neuronal se puede medir insertando electrodos dentro del cerebro de un animal, cerca de un cúmulo de neuronas (más precisamente, de los cuerpos neuronales). La impedancia de los electrodos va a determinar el volumen de registro y, por tanto, la cantidad de neuronas que podría registrar. Típicamente, electrodos de baja impedancia (<2MΩ) registran señales multi-unit, es decir de muchas neuronas. Cuanto mayor es la impedancia menor número de neuronas, dado que el volumen de registro es menor[12].

En esta tesis se utilizaron electrodos de Tungsteno de 2 o 3MΩ, los que en muchos casos obtuvieron registros de varias neuronas en simultáneo. Debido a esto, las señales registradas fueron procesadas con un software de clasificación de spikes (*spike-sorting*) que permite

[12] Los valores son esencialmente estimativos. Para un mismo electrodo, la cantidad de neuronas que se registren puede variar dependiendo de distintos factores como por ejemplo la densidad de neuronas en un núcleo determinado.

identificar spikes de una misma neurona (*single-unit*) en una señal *multi-unit* (Quiroga et al., 2004).

6.4.1 Procedimientos quirúrgicos

La intervención para realizar mediciones neuronales en aves requiere de dos cirugías independientes: el implante de un PIN de fijación y la craneotomía final de medición. Ambas intervenciones deben estar separadas por un tiempo no menor a 1 día para permitir que el ave se recupere completamente de la primera cirugía.

6.4.1.1 Implante de PIN de fijación

Entre 10 y 15 minutos antes de comenzar la cirugía se administra una gota de Midazolam (*DOZILAM* 5mg/ml) para sedar ligeramente al ave. Esto evita que el ave se estrese y facilita la manipulación posterior.

Una vez que el ave se encuentra parcialmente sedada, se le coloca un tubo en el pico y se duerme al animal utilizando como anestesia inhalatoria Isofluorano (*Baxter* 100% Isofluorano). La anestesia se administra utilizando un dosificador que regula la proporción Isofluorano/aire permitiendo controlar la profundidad anestésica. Al comienzo de la cirugía, se establece un flujo de 2 litros/min. Una vez que el ave se encuentra anestesiada se reduce el flujo de Isofluorano al valor mínimo que mantenga un plano anestésico adecuado (usualmente entre 0.75 y 0.5 litros/min), evaluando la reactividad al estímulo doloroso y verificando en forma continua que el ave presente ventilación apropiada.

Seguidamente, se coloca una tela enrollando al ave a la altura del tórax y alas, y se la deposita sobre la cama de sujeción del estereotáxico (Figura 6.H) en posición decúbito esternal, de frente al experimentador. Luego se asegura la cabeza introduciendo las barras de sujeción en los orificios del oído del animal[13] y se coloca una cánula de anestesia inhalatoria en el pico del animal. Las barras de sujeción permiten controlar la inclinación de la cabeza a 30° respecto de la horizontal (inclinación de las coordenadas estereotáxicas utilizadas) y, a su vez, permiten posicionar una cánula para mantener un flujo continuo de anestesia.

Luego se procede a quitar completamente las plumas de la parte superior del cráneo liberando el área quirúrgica. Se desinfecta la zona con un gel antiséptico. Seguidamente se realiza un corte en forma de "**Y**" sobre la piel, en dirección anteroposterior por la línea del plano sagital del

[13] Se presiona levemente la cabeza, cuidando de no lesionar los oídos.

cráneo (ver Figura 6.I). Luego, se separa bien la piel dejando expuesta la calota, se ubica el Punto Y que marca la unión de los huesos del cráneo. Se desinfecta la zona nuevamente[14].

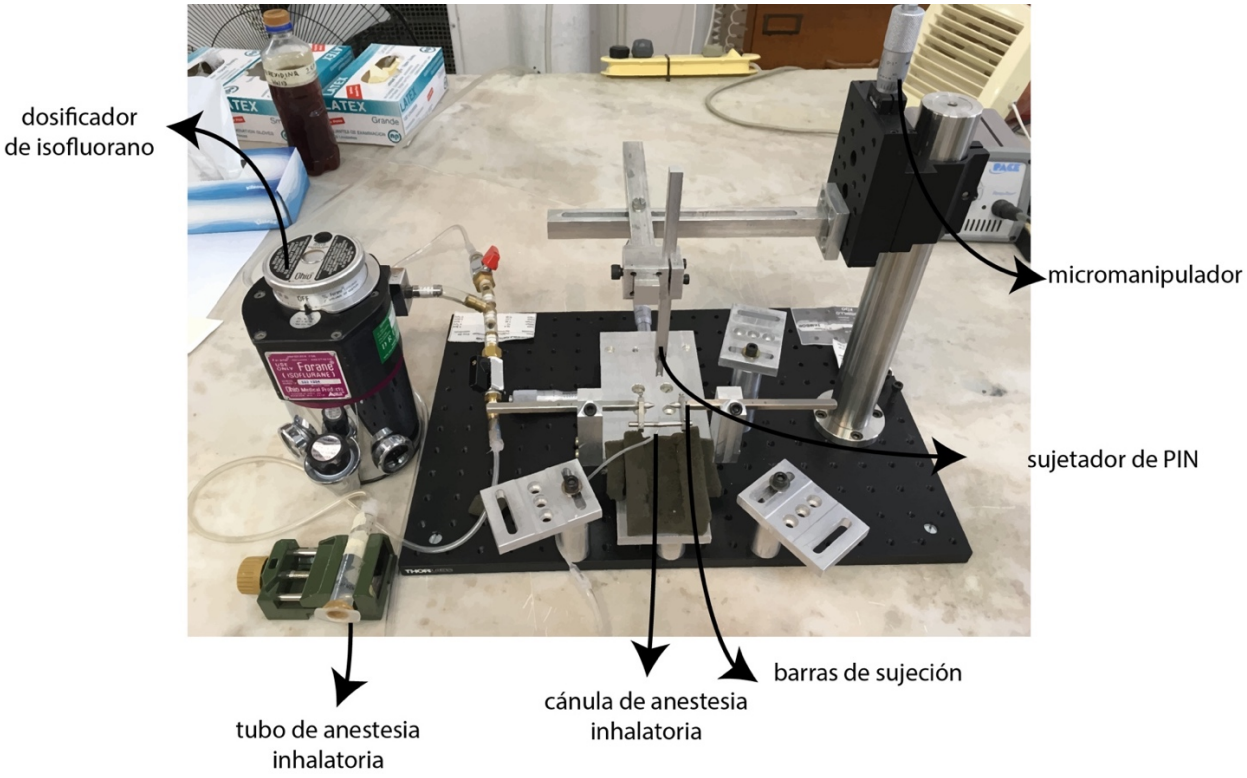


Figura 6.H: Estereotáxico utilizado para cirugías de implante de PIN de sujeción.

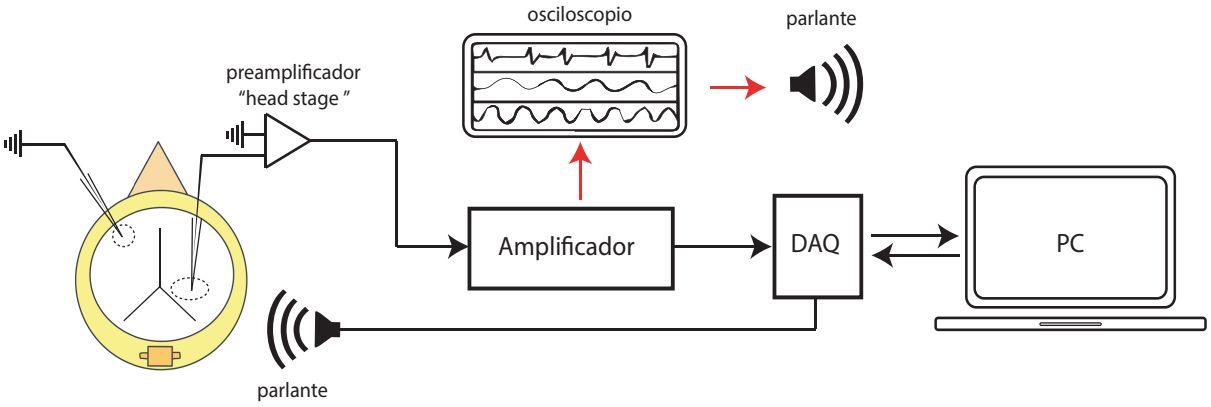


Figura 6.I: Esquema de craneotomía y setup de adquisición utilizado para medir actividad neuronal. A la izquierda se observa un esquema de la vista superior del cráneo del ave. El círculo interior (blanco) marca el área de cráneo expuesta en la cirugía de Implante de PIN

[14] Al cortar la piel suele haber sangrado, el cual se debe contener utilizando cotonetes o pequeños rollos de papel tisú.

(sección 6.4.1.1), delimitada por un borde de cemento dental. Las líneas que forman una "Y" marcan la unión de los distintos huesos del cráneo, cuya intersección corresponde con el centro de coordenadas estereotáxicas. Las líneas punteadas muestran las craneotomías. A la derecha se muestra el setup utilizado para adquirir estas señales. Las flechas marcan el sentido en que la señal es procesada: Preamplificador, amplificador, DAQ (placa de adquisición) y PC. Las flechas rojas denotan las instancias de monitoreo de la señal.

La siguiente fase de la cirugía consiste en extraer la capa superior del cráneo de un área de aproximadamente 5mm de diámetro centrada en el Punto Y (ver Figura 6.I). Se remueven las trabéculas y se limpia la zona con solución fisiológica.

Finalmente, con la ayuda del estereotáxico se posiciona el PIN de Fijación sobre el extremo posterior de la craneotomía y se fija utilizando cemento dental (*Perm Reline / Repair Resin* Type II, Class I, Cat. No. H00327). Luego se deposita cuidadosamente cemento dental sobre los bordes de la craneotomía formando una "pileta". De esta manera, el implante se encontrará firmemente adherido a la calota y se podrá mantener hidratado el tejido durante la medición, colocando solución fisiológica[15]. Luego se coloca superficialmente cianoacrilato sobre las superficies de cemento dental para fortalecer las paredes y ayudar al fraguado del material.

Una vez que el implante se encuentra adherido y el cemento seco, se retira al animal del estereotáxico y se lo coloca en una jaula de recuperación.

6.4.1.2 Craneotomía final de medición

Transcurrido el tiempo de recuperación, se procederá a realizar la cirugía final en la cual se hará una craneotomía en el área ubicada por encima del núcleo HVC, donde se insertarán los electrodos de registro.

El siguiente experimento consiste en medir la selectividad de la respuesta neuronal a estímulos auditivos. Para ello se necesita una anestesia general de larga duración cuyo efecto disociativo no afecte el sistema auditivo. Por esta razón, utilizamos una dilución inyectable de Uretano en agua [0.25g/ml], ya que preserva esta propiedad neuronal y garantiza una anestesia profunda.

El protocolo comienza con la aplicación de un total de 5µl de la dilución por gramo del animal[16] en 3 dosis intramusculares (músculos toráxicos) a intervalos de 20 minutos. Luego se evalúa el plano anestésico, se enrolla al animal en una tela a la altura del tórax, y se lo coloca en

[15]Se debe tener cuidado de no derramar cemento dental sobre la craneotomía, ya que dificultará la siguiente cirugía de remoción de las capas inferiores de cráneo.
[16] Notar que los volúmenes utilizados para la anestesia son del orden de los µl por lo que se debe tener mucho cuidado de no exceder el volumen requerido según el peso.

el estereotáxico, sobre una cama de goma-espuma fijando el PIN a la barra sujetadora (ver Figura 6.J.a).

Seguidamente se determinan las coordenadas de referencia para hacer las craneotomías. Para ello, en primer lugar, se posicionará un electrodo "fake" (electrodo no funcional) sobre el Punto Y. Este punto será el centro de un nuevo sistema de referencia que se utilizará para ubicar los distintos núcleos. A continuación, utilizando el micromanipulador del estereotáxico, se mueve 2.4 mm en dirección lateral (eje x). Este punto se encuentra aproximadamente en el centro del núcleo HVC. Tomando este punto como centro, se realiza una craneotomía de aproximadamente 2mm de radio, en la cual se remueve la última capa de cráneo y la duramadre. Finalmente, se realiza una craneotomía adicional del lado contralateral a la anterior, donde se inserta un electrodo de referencia que será conectado a tierra (ver Figura 6.I).

Una vez terminadas las craneotomías, se ubica el electrodo de medición en las coordenadas correspondientes al centro de HVC, se hidrata el tejido con solución fisiológica, controlando que la "pileta" esté llena; se cierra la jaula de Faraday y la caja de aislación acústica y se penetra lentamente el tejido valiéndose del micromanipulador hidráulico *Narishige* (sobre el eje z).

A partir de los 200-300 μm de profundidad el electrodo ingresa al núcleo HVC, donde se registra actividad neuronal con respuesta a distintos estímulos auditivos.

6.4.2 Setup

En la Figura 6.I se muestra un esquema del Setup de adquisición de actividad tipo *single units* en el núcleo HVC. Las flechas negras marcan el sentido en que la señal es procesada. Las flechas rojas marcan las instancias de monitoreo de la señal ya sea visualmente (osciloscopio) o auditivamente (parlante). En la Figura 6.J.a se muestra una foto del estereotáxico utilizado para las distintas mediciones de actividad neuronal (secciones 6.4, 6.5 y 6.6).

El proceso de adquisición de single-units consiste de una primera amplificación de la señal (x10) dentro de la jaula de Faraday por el preamplificador “head-stage”. Luego la señal pasa por un amplificador diferencial *A-M Systems* (Microelectrode AC amplifier Model 1800) donde se amplifica x100 y es filtrada (Pasa-Bajos 300Hz, Pasa-Altos 5Khz). Finalmente, la señal es digitalizada por una placa de adquisición (*National Instruments* BNC-2110) y adquirida con MATLAB (ver códigos en Apéndice 2). Durante todo el experimento se monitorea la señal visualmente con un osciloscopio (*Tektronix* TDS1012B) y auditivamente con un monitor (*Grass Technologies* AM10 Audio Monitor).

Como se mencionó en la sección 2.7.4, la importancia de las mediciones en HVC radica en que muchas neuronas de éste núcleo tienen actividad selectiva al canto propio (incluso en aves anestesiadas). Para registrar este fenómeno, se expone al ave con un protocolo de estímulos auditivos con canto propio, canto conespecífico y canto reverso, 10-20 repeticiones de cada

estímulo en orden aleatorio. Estos protocolos son generados por el software de adquisición y trasmitidos a través de un parlante colocado en el interior de la caja acústica.

Este circuito de adquisición de single (o multi) units conforma la estructura básica para la de toma de datos de actividad neuronal en los *Setups* del Experimento de Estimulación Antidrómica y Experimento de Colisión Antidrómica (secciones 6.5 y 6.6).

6.5 Estimulación Antidrómica

La estimulación antidrómica es una técnica que se utiliza para verificar si una neurona (o una población de neuronas) proyecta a un sitio de interés. Básicamente, la técnica consiste en medir actividad neuronal (tipo single-units) en un núcleo y estimular con pulsos de corriente el núcleo al que esta neurona supuestamente proyecta.

La racionalidad de la técnica radica en que, si se inyecta corriente en el sitio de proyección los estímulos se propagarán en el sentido opuesto a la transmisión sináptica (antidrómicamente) y se observará un "*hash*" de estimulación en la neurona de registro (ver ejemplos en la sección 2.12.3).

En este caso, el experimento consiste en estimular en el núcleo RA y registrar en HVC el efecto de la estimulación.

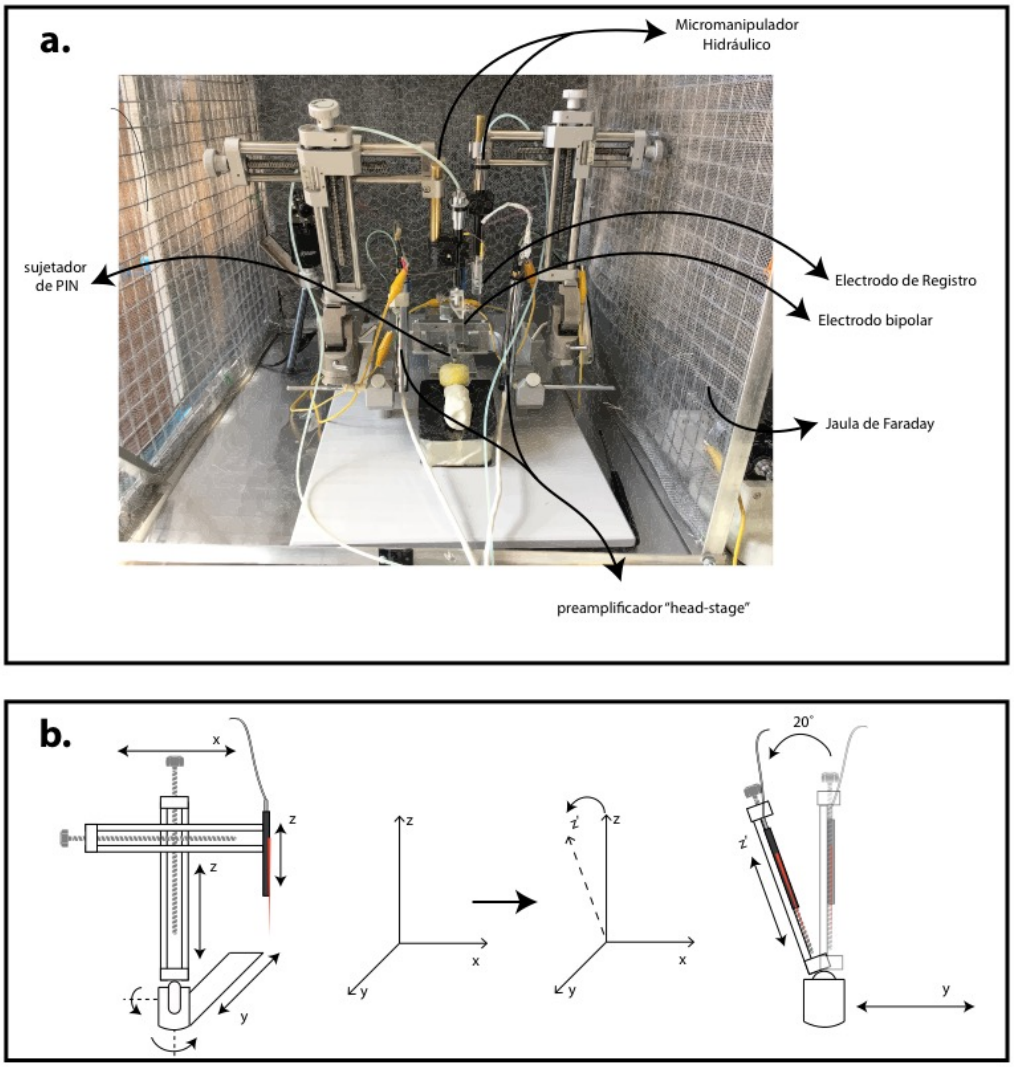


Figura 6.J: Estereotáxico de dos brazos. (a) Foto del setup de registro de mediciones neuronales. (b) (Izquierda) Esquema de los posibles movimientos de cada brazo del estereotáxico. (Derecha) Ejes de referencia para coordenadas estereotáxicas. Rotación de 20° del eje z.

6.5.1 Procedimientos quirúrgicos

Al igual que en los protocolos de medición de single-units y multi-units en HVC (sección 6.4) el protocolo de estimulación antidrómica requiere de dos cirugías independientes. En la primera etapa se implanta un PIN de fijación y durante la segunda se realizan las craneotomías finales y la inserción de los electrodos de registro y estimulación.

6.5.1.1 Implante de PIN

Se procede de la misma forma que en la sección 6.4.1.1, con las siguientes salvedades: 1) El PIN se implanta en el extremo opuesto entonces, el ave se ubica en posición decúbito dorsal *"de espaldas"* al experimentador. 2) Se realiza la craneotomía inicial de mayor tamaño (aproximadamente 6mm de diámetro), llegando hasta la inserción de los músculos del cuello. 3) Se coloca el PIN del lado opuesto (ver Figura 6.K).

6.5.1.2 Craneotomías finales, Registro y Estimulación Antidrómica

Como se mencionó anteriormente, el experimento de estimulación antidrómica requiere de la medición del núcleo HVC y la estimulación del núcleo RA ipsilateral de manera simultánea. Dado que ambos núcleos están ubicados aproximadamente sobre el mismo eje vertical (RA por debajo de HVC), se debe cuidar de insertar el electrodo de estimulación en RA sin dañar el núcleo HVC. Esto requiere realizar una penetración con una inclinación de 20 grados respecto de la vertical en dirección posterior, es decir, hacia el experimentador (ver Figura 6.J.b), hasta llegar al núcleo RA.

En primer lugar, se ubica el centro de coordenadas en el Punto Y, utilizando un electrodo "fake". Luego se ubican las coordenadas correspondientes a HVC (2.4 mm en dirección lateral) y se realiza una craneotomía removiendo la capa del cráneo restante y la duramadre.

En segundo lugar, utilizando el otro brazo del estereotáxico con una inclinación de 20 grados (eje z'), se posiciona el electrodo "fake" en el centro de coordenadas. Luego se ubica las coordenadas de la segunda craneotomía, por la cual se insertará el electrodo de estimulación (ver Figura 6.K). El centro de esta craneotomía estará en 2.52 mm en dirección lateral (x) y 1.86mm en dirección posterior (y). Se realiza una craneotomía amplia removiendo la última capa de cráneo y la duramadre. Luego se realiza una craneotomía adicional del lado contralateral para colocar el electrodo de referencia.

En tercer lugar, se insertarán los electrodos de registro y el electrodo bipolar de registro/estimulación. Primero, se inserta el electrodo de referencia en la craneotomía adicional. Luego se coloca sobre el brazo inclinado del estereotáxico el electrodo bipolar de registro/estimulación (*FHC* Concentric Bipolar Electrode, Lot \# 212242). Se posiciona nuevamente sobre el Punto Y, cuidando de que el electrodo no toque el cráneo. Luego, se mueve el electrodo hasta las coordenadas del centro de la craneotomía de RA y se lo inserta bajando suavemente con el micromanipulador del estereotáxico hasta que la punta penetra ligeramente el tejido. Seguidamente, utilizando el brazo libre del estereotáxico, se posiciona el electrodo de registro sobre las coordenadas de HVC y se lo inserta.

Finalmente, se hidrata el tejido con solución fisiológica, controlando que la "pileta" esté llena; se cierra la jaula de Faraday y la caja de aislación acústica. A continuación, valiéndose del micromanipulador hidráulico (*Narishige*) se bajan los electrodos muy despacio.

Entre 1.7 y 2.0mm de profundidad (eje z') suele encontrarse RA, lo cual se verifica por el patrón de disparos espontáneos de las neuronas[17]. HVC en cambio se encuentra más cerca de la superficie (aproximadamente 0.3 mm).

6.5.2 Setup

El setup requerido para el protocolo de estimulación antidrómica se esquematiza en la Figura 6.K.

Al circuito de adquisición de *single-units* (sección 6.4.2) se le agrega un canal más de adquisición para registrar la actividad en RA (con la misma configuración): segundo preamplificador (head-stage 2) y una amplificación/filtro por el canal 2 del amplificador diferencial *A-M Systems* (Microelectrode AC amplifier Model 1800).

Por otro lado, se arma un circuito de estimulación con un generador de funciones (*Standford Research Systems* Model ds345) conectado como "*trigger*" al estimulador (*Digitimer* DS3 Isolated Current Stimulator) y a un osciloscopio.

El experimento consiste en estimular RA con pulsos de corriente de amplitud y frecuencia constante durante 30 segundos.

Para llevar a cabo la estimulación en RA **primero se desconecta** el electrodo bipolar del head-stage 2 y se conecta al cable del estimulador. Esto abre el circuito de amplificación y evita que la corriente de estimulación dañe los equipos.

Luego se configura el generador de funciones para una función cuadrada de frecuencia 1Hz. Esta señal actúa como disparador ("trigger") sobre el estimulador que entrega pulsos de 2ms de duración por cada escalón positivo.

Se repite protocolo variando en cada caso la amplitud (30,50,100,150,300 y 500μA) dejando ≈1min entre cada protocolo de estimulación.

Se adquiere, además de la actividad de HVC, la salida del generador de funciones para poder alinear las señales durante el procesamiento posterior.

[17] RA tiene un patrón de actividad característico que consiste de una alta tasa de disparos espontáneos en forma de trenes.

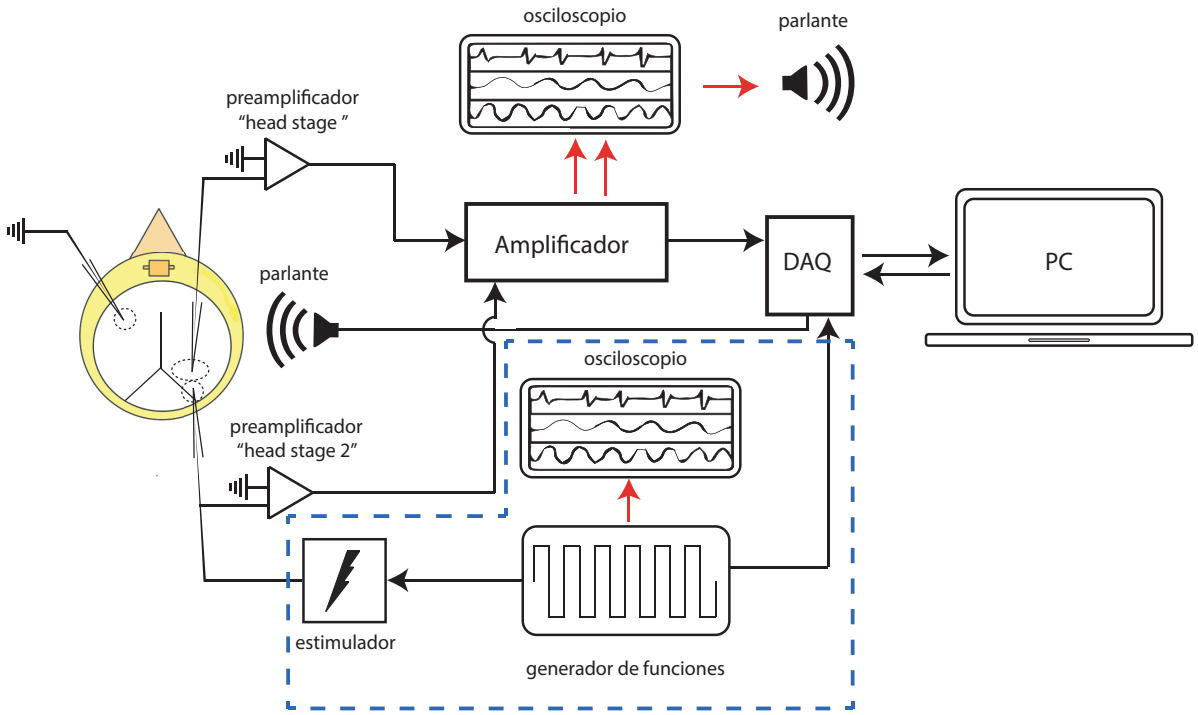


Figura 6.K: Esquema de craneotomía y setup de adquisición de *single units* y estimulación Antidrómica.

6.6 Experimento de Colisión antidrómica

El experimento de Colisión Antidrómica es una versión de Estimulación Antidrómica (sección 6.5) en la cual la estimulación en el núcleo que se encuentra *río abajo* (RA) en la conexión se da a casi inmediatamente después de un disparo espontáneo de neuronas en el núcleo *río arriba* (HVC). El objetivo de esta técnica es determinar si las neuronas que se están registrando en HVC proyectan directamente RA. Si éste fuera el caso, al estimular a unos pocos ms de ocurrido un *spike* espontáneo en HVC, la corriente eléctrica que viaja ortodrómicamente "colisiona" con la que viaja antidrómicamente. Esto se ve en un registro de single-units como la ausencia del "*hash*" seguido a la estimulación. Para comparar ambas señales, estos experimentos deben realizarse seguidos a los *experimentos de estimulación antidrómica*.

6.6.1 Setup

En la Figura 6.L se muestra el diagrama de conexiones del setup del experimento de colisión antidrómica.

El setup es básicamente el mismo al utilizado en la estimulación antidrómica con la siguiente salvedad: Se coloca un "detector de spikes" (detalle en la sección 6.6.1.1) seguido a la salida del canal 1 del amplificador (señal de HVC).

El detector de spikes genera un pulso cuadrado cuando censa actividad supra-umbral en HVC y *triggerea* al generador de funciones, esta vez seteado para que genere un pulso cuadrado de 4ms

de período. Este pulso tiene un escalón positivo a 2ms (1/2 período), lo cual *triggerea* al estimulador, que entrega un escalón de corriente a través del electrodo bipolar a RA. En la Tabla 5 se muestra la configuración del generador de funciones utilizado.

En resumen, esta técnica se diferencia a la de Estimulación Antidrómica en que, en lugar de estimular con una frecuencia constante, se estimula selectivamente 2ms después de un evento supra-umbral en HVC (presuntamente un spike).

Function	**Amplitude**	**Frequency**	**Phase**	**Trigger Source**	**Sweep/ modulate**	**Burst count**	**sweep**
Cuadrada	5Vpp	250Hz	180°	Positive-In	Burst	1	ON

Tabla 5: Configuración de Generador de Funciones para Experimento de Colisión Antidrómica.

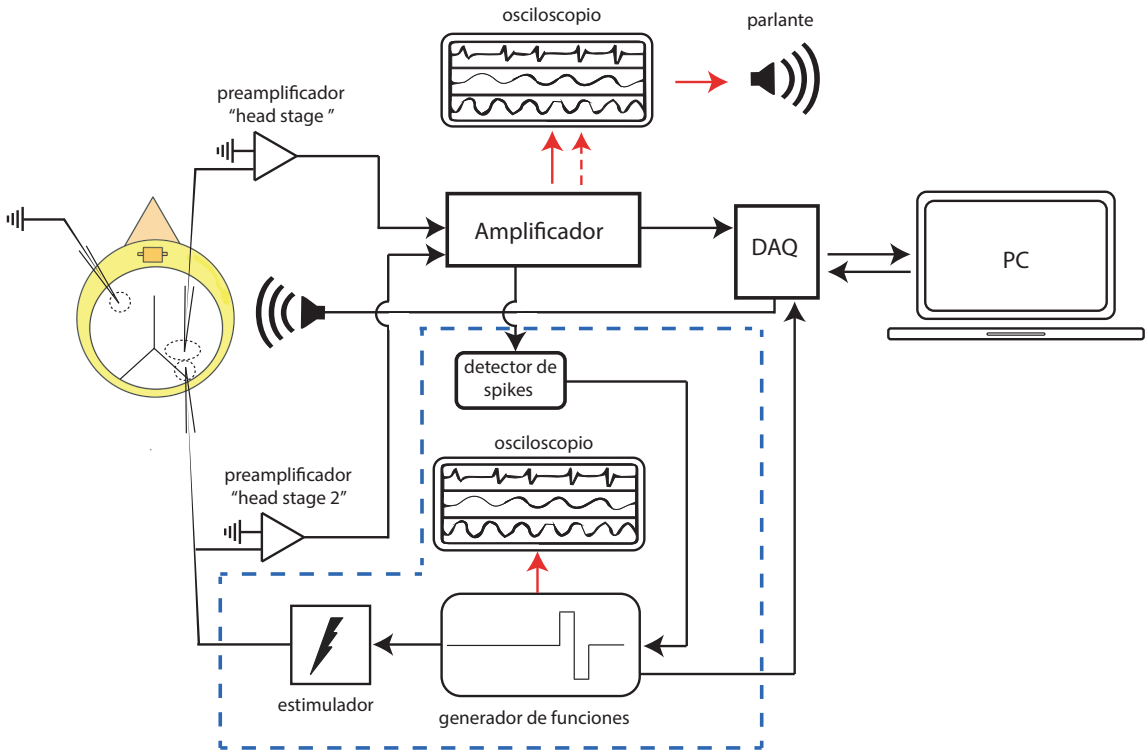


Figura 6.L: Esquema de craneotomía y setup de adquisición de single units con experimento de colisión antidrómica.

6.6.1.1 Detector de Spikes

Como se mencionó anteriormente, esta técnica requirió de la construcción de un detector de spikes que funcione como *trigger* para la estimulación. En la Figura 6.M se muestra una foto del Detector de spikes. El circuito tiene una entrada (señal de HVC) y una salida (*trigger*) junto con una serie de llaves y potenciómetros que permiten controlar las siguientes prestaciones:

- Amplificación: cuenta con un selector de ganancia (llave) de 1-10k y control manual de ganancia (potenciómetro).
- Selector de Polaridad de la señal (llave)
- LED indicador de actividad supra-umbral
- Salida: Pulso de *trigger* para estimulador externo.

Estas prestaciones permiten seleccionar la polaridad del umbral de detección (positivo o negativo), y controlar la amplitud mínima de la señal de entrada que genere un pulso de estimulación.

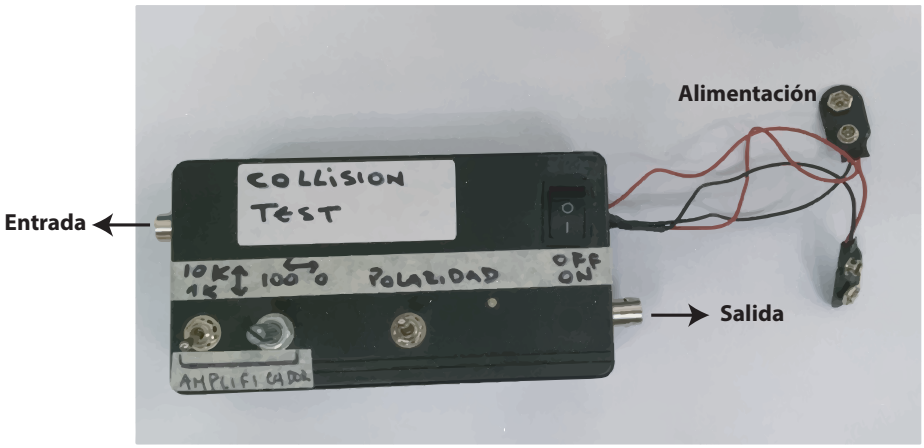


Figura 6.M: Vista superior del *Detector de Spikes* del Experimento de Colisión Antidrómica.

El la Figura 6.N se muestra un detalle del Circuito.

En primer lugar, la señal de entrada atraviesa una etapa de Amplificación utilizando un amplificador operacional TL082. Este integrado está conectado como amplificador inversor[18] cuya ganancia está dada por la relación entre dos resistencias: RI (Potenciómetro 0-10k) y RF (llave con dos Resistencias fijas 1-10k). La ganancia está dada por G=-RF/RI.

[18] Configuración que amplifica e invierte la polaridad de la señal.

Luego, la señal puede ser invertida nuevamente mediante una llave que permite conectar la salida de señal amplificada en la etapa anterior a otra entrada del TL082 (Ganancia 1), o "*puentear*" el integrado.

Seguido a esto se utiliza un chip inversor tl7404 como umbral. Si la señal supera un voltaje determinado se prende el LED y un timer ICM7555 (en modo monoestable) que genera un pulso de *trigger*.

Finalmente, la señal de salida es filtrada con un filtro pasa-bajos.

Este circuito es alimentado con 2 baterías 9V.

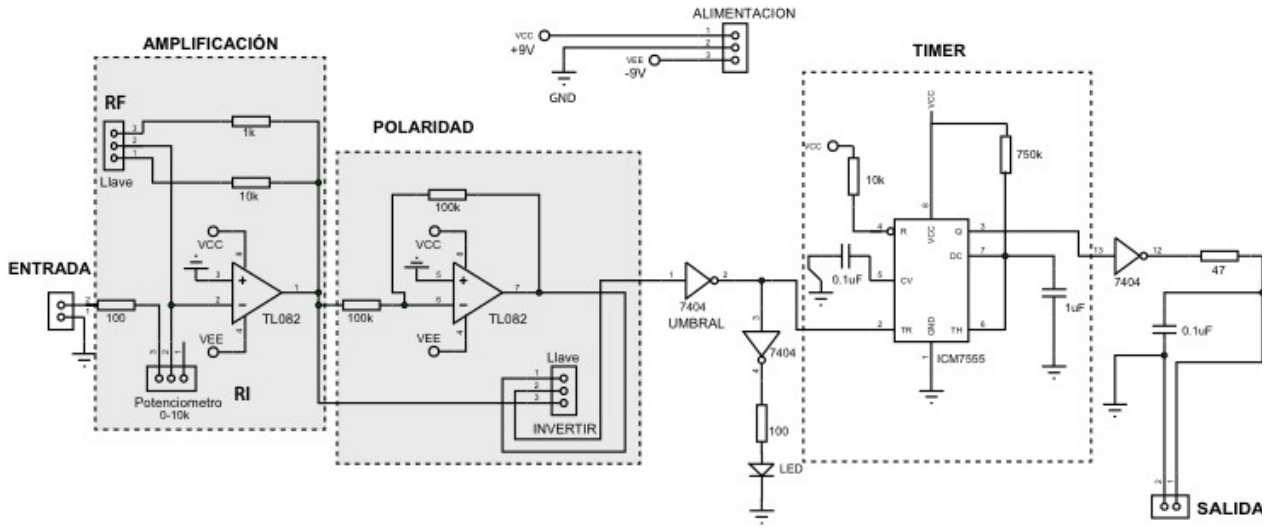


Figura 6.N: Detalle de circuito del *Detector del Spikes* para experimento de Colisión Antidrómica.

APÉNDICE 2: CÓDIGOS

6.7 Simulaciones numéricas

A continuación, se copian los códigos utilizados para simular la actividad promedio de los distintos núcleos propuestos para el control de las vocalizaciones (integral-pX-resubmission.c), para los distintos tipos de gestos (P0, P2, P1 y Pulsátiles).

De la misma manera, se copian los códigos utilizados para simular la dinámica de las membranas fonatorias (fona_circulo-PX-xxxxxx.c).

6.7.1 Códigos P0

integral-p0-resubmission.c

```
//---------------------------------------------
#include <stdio.h>
#include <math.h>
#include "rk4.c"
//---------------------------------------------
#define PI 3.1416
#define N_NAME1_AUX 30
#define IA 16807
#define IM 2147483647
#define AM (1.0/IM)
#define IQ 127773
#define IR 2836
#define NTAB 32
#define NDIV (1+(IM-1)/NTAB)
#define EPS 1.2e-7
#define RNMX (1.0-EPS)
//---------------------------------------------
struct Par {
                double F; double Fdelayed; double F2; double FnXII; double rx; double ry; double rz; double rw;double rgo; double rpam;} aa;

//---------------------------------------------
void takens(int n, double v[], double dv[], double t)
{
 double x,y,z,w,go,go2,go3,pam,vtb;

   x=v[0]; y=v[1]; z=v[2]; w=v[3]; go=v[4];go2=v[5]; go3=v[6]; pam=v[7]; vtb=v[8];

   dv[0]  = 250*(-x + 1/(1+exp(-(aa.rx +10*z+1.*aa.F+10*x -1.1*y ))));  //RAm exc
   dv[1]  = 250*(-y + 1/(1+exp(-(aa.ry +0*z+10.*x + 2*y +0.*pam))));          //RAm inh
   dv[2]  = 20.*(-z + 1/(1+exp(-(aa.rz+5.*aa.Fdelayed +6.*z-3*w ))));   //RA exc
   dv[3]  = 20.*(-w + 1/(1+exp(-(aa.rw+.05*aa.Fdelayed+0*aa.F2+6*z+-3*w ))));  //RA inh
   dv[4]  = 250*(-go + 1/(1+exp(-(aa.rgo+0.1*aa.FnXII +10.*(.05*z+0.05*x-0.*y) ))));//nXII
   dv[5]  = 250*(-go2 + 1/(1+exp(-(aa.rgo +10.*z) )));//dtb derecho
   dv[6]  = 250*(-go3 + 1/(1+exp(-(aa.rgo +1.*aa.FnXII) )));//dtb izquierdo
   dv[7]  = 250*(-pam + 1/(1+exp(-(aa.rpam +10.*z-10*x))));//PAM
   dv[8]  = 250*(-vtb + 1/(1+exp(-(aa.rgo +10.*pam) )));//vtb
return;
}

//---------------------------------------------
int main(){
  int i,j;
  double v[9],dt,t,phi1[3000];
//---------------------------------------------
FILE *ptr, *ptr2;
ptr=fopen("presion-tension-dtb2-dtb-vtb.p0.dat","w");
ptr2=fopen("neuronas-p0.dat","w");

   v[0] = 0.02; v[1] = 0.5; v[2] = 0.03; v[3]=0.01; v[4]=0.01; v[5]=0.01; v[6]=0.01; v[7]=0.01; v[8]=0.01;

   aa.F=0; aa.Fdelayed=0;aa.F2=0; aa.FnXII=0;
   aa.rx=-7.45;
   aa.ry=-11.5;
   aa.rz=-3.4;
   aa.rw=-7.;
   aa.rgo=-3; // garantiza que empezamos apagado
   aa.rpam=-0.;

      dt = 1/20000.0;

while(t < 4){

      aa.F=0;aa.Fdelayed=0;aa.FnXII=0;aa.F2=0.;
//EN EL PAPER LOS FnXII Y Fdelayed ESTAN NORMALIZADOS A 1, ENTONCES LOS ALFAS_FnXII Y ALFA_Fd LOS VALORES LOS MULTIPLIQUÉ POR 4
DIRECTO EN LAS ECUACIONES
                if((t>0.30)&&(t<0.32))aa.F=10;
                if((t>0.31)&&(t<0.33))aa.FnXII=10;
      if((t>0.33)&&(t<0.35))aa.Fdelayed=10;

                if((t>0.67)&&(t<0.69))aa.F=10;
```

```
                if((t>0.68)&&(t<0.70))aa.FnXII=10;
        if((t>0.70)&&(t<0.72))aa.Fdelayed=10;

                if((t>1.03)&&(t<1.05))aa.F=10;
                if((t>1.04)&&(t<1.06))aa.FnXII=10;
        if((t>1.06)&&(t<1.08))aa.Fdelayed=10;

      rk4(takens, v, 9, t, dt);
      t = t+dt;

    // printf("%lg\t%lg\n",v[7],v[4]);
                fprintf(ptr2,"%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\n",t,v[0],v[1],v[2],v[3],v[4],v[5],v[6],v[7],v[8], aa.F,aa.Fdelayed,aa.FnXII);
                fprintf(ptr,"%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\n",v[0],v[4],v[5],v[6],v[8]);
    }

}
//-------------------------------------------------------------------------------------------------------------
```

fona_circulo-P0-bilateral.c

```
#include <stdio.h>
#include <stdlib.h>
#include <math.h>

#define gamma 9000      //gamma 24000

#define PI2 6.2831853
#define IA 16807
#define IM 2147483647
#define AM (1.0/IM)
#define IQ 127773
#define IR 2836
#define NTAB 32
#define NDIV (1+(IM-1)/NTAB)
#define EPS 1.2e-7
#define RNMX (1.0-EPS)
#define Nforzante 100
#define Nforzados 100
#define N_NAME1_AUX 30
#define N_NAME2_AUX 30
#define S(x) 1/(1+exp(-(x/0.015)))

#define c 35000

struct Par {
                        double A1; double A2; double A3;
                        double Ancho1; double Ancho2; double Ancho3;
                        double r;
                        double forcing1; double forcing2;
                double RBoverLB; double s1overLG; double s1overLB; double s1overCH;
                        double LGoverLB; double RB;
                        double noise; double rdis; double kappa; double beta; double kappa2;
                        double vtb; double dtb;
        double vtb2; double dtb2; double vs;
} aa;


void takens(int n,double v[],double dv[],double t) {
        extern double PRESSURE,presion,acople;
        double x,y,i1,i2,i3,w2,x2,y2, x3, y3;

x=v[0]; y=v[1], i1=v[2], i2=v[3]; i3=v[4];x2=v[5],y2=v[6], w2=v[7];

// FUENTE 1
 dv[0]=  y;
 dv[1]= aa.beta*gamma*y-1.*gamma*(x-0.)*(x-0.)*y-aa.kappa*(x+.3*x*x*x)*gamma*gamma+gamma*gamma*aa.dtb-gamma*gamma*aa.vtb;
// FILTRO
 dv[2]=i2;
 dv[3]=-aa.s1overLG*aa.s1overCH*i1-aa.rdis*(aa.s1overLB+aa.s1overLG)*i2+i3*(aa.s1overLG*aa.s1overCH-
aa.rdis*aa.RB*aa.s1overLG*aa.s1overLB)+(aa.s1overLG)*aa.forcing2+aa.rdis*aa.s1overLG*aa.s1overLB*aa.forcing1;
 dv[4]=-(1/aa.s1overLG)*aa.s1overLB*i2-aa.RB*aa.s1overLB*i3+aa.s1overLB*aa.forcing1;
// FUENTE 2
 dv[5]= y2;
 dv[6]= aa.beta*gamma*y2-1.*gamma*(x2-0.)*(x2-0.)*y2-aa.kappa2*(x2+.3*x2*x2*x2)*gamma*gamma+gamma*gamma*aa.dtb2-gamma*gamma*aa.vtb2;
 dv[7]= 0.;


        return;
}

float ran1(long *idum)
{
                int j;
                long k;
                static long iy=0;
                static long iv[NTAB];
                float temp;

                if (*idum <= 0 || !iy) {
                        if (-(*idum) < 1) *idum=1;
                        else *idum = -(*idum);
                        for (j=NTAB+7;j>=0;j--) {
                                k=(*idum)/IQ;
                                *idum=IA*(*idum-k*IQ)-IR*k;
                                if (*idum < 0) *idum += IM;
                                if (j < NTAB) iv[j] = *idum;
                        }
                        iy=iv[0];
                }
                k=(*idum)/IQ;
                *idum=IA*(*idum-k*IQ)-IR*k;
                if (*idum < 0) *idum += IM;
                j=iy/NDIV;
                iy=iv[j];
```

```
                    iv[j] = *idum;
                    if ((temp=AM*iy) > RNMX) return RNMX;
                    else return temp;
}


void nombrar1_par1_par2(char *name_space1,int par1,int par2){
  sprintf(name_space1,"temp.%d.%d.dat",par1,par2);
return;
}


double PRESSURE=0.0; double presion, acople;


int main(){

  long idum=(-1);
  int i,j,taux,iii,ik,ikp,kk;
  int t,to,maxtau,tau1,tau2,tau3;
  double r12,r23,r21,r32,t12,t21,t23,t32,r34,t34,tiempot,tnoise,tcount;
  double *a,*bf,*bb,*cf,*cb,*df,*db;
  double ancho1,ancho2,ancho3,largo1,largo2,largo3;
  double dt, ddb,dbold,nada,atenua;
  double v[10];
  double preout;

 FILE *ptr,*ptr1,*ptr2,*ptr3;
       char nombre_archivo1[N_NAME1_AUX];

for(ik=1;ik<2;ik++){
for(ikp=1;ikp<2;ikp++){

nombrar1_par1_par2(nombre_archivo1,ik,ikp);
ptr1=fopen("salida-p0-bilateral.dat","w");
ptr2=fopen("presion-tension-dtb2-dtb-vtb.p0.dat","r");
//ptr3=fopen("RA.dat","r");
ptr=fopen("p0-bilateral.dat","w");

 v[0]=.000000000005;v[1]=0.00000000001;
 v[2]=.000000000001;v[3]=0.00000000001;
 v[4]=.000000000001;

v[5]=.0000000000045;v[6]=.000000000000001;

v[7]=0.;

aa.forcing1=0.;
aa.forcing2=0.;
tiempot=0.;
tcount=0.;
aa.noise=0;
tnoise=0;
aa.r=0.4;
aa.rdis=7000;
//atenua=ikp*5;
atenua=1;
      dt=1./(882000.0);

  to=8000*600; // dos veces el tiempo de la silaba que quiero integrar (el dt es 20 veces la frecuencia de sampleo 44100 y aca esta por 40)

  a=(double*) calloc(to,sizeof(double));
  bf=(double*) calloc(to,sizeof(double));
  bb=(double*) calloc(to,sizeof(double));
  cf=(double*) calloc(to,sizeof(double));
  cb=(double*) calloc(to,sizeof(double));

  db=(double*) calloc(to,sizeof(double));
  df=(double*) calloc(to,sizeof(double));


aa.Ancho1=0.2; aa.Ancho2=.2; aa.Ancho3=0.2;
ancho1 = aa.Ancho1; ancho2 = aa.Ancho2; ancho3 = ancho2; largo1 = 1.5; largo2 =1.5;
 largo3 = 1.0;

// largo de traquea de finch, cerca de 3.4 cm.

  r12=(ancho1-ancho2)/(ancho1+ancho2);r21=-r12;
  r23=(ancho2-ancho3)/(ancho2+ancho3);r32=-r23;
  t12=1+r12;t21=1+r21;
  t23=1+r23;t32=1+r32;

  tau1=rint(largo1/(c*dt+0.0));
  tau2=rint(largo2/(c*dt+0.0));
  tau3=rint(largo3/(c*dt+0.0));

  fprintf(stderr,"T1,T2,T3 = %d,%d,%d \n",tau1,tau2,tau3);
  maxtau=tau3;
  if(tau1>=tau2&&tau1>=tau3) maxtau=tau1;
  if(tau2>=tau1&&tau2>=tau3) maxtau=tau2;
  t=0;

  for (j=0;j<=maxtau;j++) {
    bf[j]=0;bb[j]=0;cf[j]=0;cb[j]=0;df[j]=0;db[j]=0;
  }

  t=maxtau;
  taux=0;

//aa.sloverCH=1/Ch

aa.s1overCH=(36*2.5*2/25.)*1e09; //para cerca de 2000
aa.s1overLB=1.*1e-04; // con 7, 2000, con 14, 2700
```

```
aa.s1overLG=(50*1e-03)/.5; //aqui entra, en el denominador, el parametro . 0.1 9000-0.5 4000-1 2900
aa.RB=1*1e07;

// ch, lg y lb adaptar un poco a canarios. lb, lenght beak, lg lenght glottis, Vh volume of helmholtz resonator

  while ((t<to)&&(v[1]>-50000000)){

tcount=tcount+dt;
//printf("%i\t%lg\n",kk,tcount);

    dbold=db[t];

    a[t]= (.50)* (1.01*(1.*(aa.A1*v[1]+aa.A2*v[6])))+bb[t-tau1];

// para usar una fuente, aa.A1 <> 0 y las otras cero. Para usar
// dos fuentes, aa.A1 y aa.A2 distinto de cero

    bb[t]=r12*a[t-tau1]+t21*cb[t-tau2];
    bf[t]=t12*a[t-tau1]+r21*cb[t-tau2];
    cb[t]=r23*bf[t-tau2]+t32*db[t-tau3];
    cf[t]=t23*bf[t-tau2]+r32*db[t-tau3];
    db[t]=-aa.r*cf[t-tau3];

ddb=(db[t]-dbold)/dt;
aa.forcing1=db[t];
aa.forcing2=ddb;

PRESSURE=a[t];

tiempot=tiempot+dt;

ancho1 = aa.Ancho1; ancho2 = aa.Ancho2;
r12=(ancho1-ancho2)/(ancho1+ancho2);r21=-r12;
  r23=(ancho2-ancho3)/(ancho2+ancho3);r32=-r23;
    t12=1+r12;t21=1+r21;
      t23=1+r23;t32=1+r32;


       rk4(takens,v,10,t+0.0,dt);
aa.noise=0;
preout=aa.RB*v[4];

if(taux==44) {

                                fprintf(ptr1,"%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\n",tiempot,aa.beta,aa.kappa,preout,aa.dtb,aa.vtb,aa.kappa2,aa.dtb2,aa.vtb2);
            fscanf(ptr2,"%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\n",&aa.beta,&aa.vs,&aa.dtb2,&aa.dtb,&aa.vtb);
            aa.beta=aa.beta*2-0.;
                                aa.kappa=aa.vs*(7+22);
                                aa.dtb2=aa.dtb2*20.+7.;
                                aa.dtb=aa.dtb*40-0;
                                aa.kappa2=aa.vs*(8.5+20);
        aa.vtb=aa.vtb*40+0;


                                        //fscanf(ptr3,"%lg\n",&aa.dtb);
                                        // aa.dtb=aa.dtb*1.;
                                taux=0;

                                fprintf(ptr,"%lg\n",preout);

          }
    taux++;
    fflush(NULL);

if((tiempot>0.)&&(tiempot<4.)){
aa.noise=.10*(ran1(&idum)-0.5);

aa.A1=1.; // low freq
aa.A2=1.; // high freq

    // MISMOS PARÁMETROS DE FILTRO QUE P2 //
    aa.r=0.4;
    aa.s1overCH=2.25e10;//(350/0.8)*1e09; //para cerca de 2000
    aa.s1overLB=1.*1e-04; // con 7, 2000, con 14, 2700
    aa.s1overLG=(0.025); //aqui entra, en el denominador, el parametro . 0.1 9000-0.5 4000-1 2900
    aa.RB=(.5)*1e07;
    aa.rdis=(50./5.)*(10000.);
    aa.noise=.0*(ran1(&idum)-0.5);
}
    t++;
  }
    free(a);
    free(bf);
    free(bb);
    free(cf);
    free(cb);
    free(df);
    free(db);
} //el ciclo nuevo ikp
}//el ciclo nuevo ik
}
//-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------
```

6.7.2 Códigos P2

integral-p2-resubmission.c

```
//-----------------------------------------
#include <stdio.h>
#include <math.h>
```

```
#include "rk4.c"
//-----------------------------------------------
#define PI 3.1416
#define N_NAME1_AUX 30
#define IA 16807
#define IM 2147483647
#define AM (1.0/IM)
#define IQ 127773
#define IR 2836
#define NTAB 32
#define NDIV (1+(IM-1)/NTAB)
#define EPS 1.2e-7
#define RNMX (1.0-EPS)
//-----------------------------------------------
struct Par {
                    double F; double Fdelayed; double F2; double FnXII; double rx; double ry; double rz; double rw;double rgo; double rpam;} aa;

void takens(int n, double v[], double dv[], double t)
{
  double x,y,z,w,go,go2,go3,pam,vtb;

    x=v[0]; y=v[1]; z=v[2]; w=v[3]; go=v[4];go2=v[5]; go3=v[6]; pam=v[7]; vtb=v[8];

    dv[0]  = 250*(-x + 1/(1+exp(-(aa.rx +9*z+1.*aa.F+9.85*x -5.25*y ))));  //RAm exc
    dv[1]  = 250*(-y + 1/(1+exp(-(aa.ry +9.45*z+9.*x + 1.6*y +0.*pam))));          //RAm inh
    dv[2]  = 20.*(-z + 1/(1+exp(-(aa.rz+1.*aa.Fdelayed +5.*z-10*w ))));   //RA exc
    dv[3]  = 20.*(-w + 1/(1+exp(-(aa.rw+.0*aa.Fdelayed+0*aa.F2+10*z+8*w ))));  //RA inh
    dv[4]  = 250*(-go + 1/(1+exp(-(aa.rgo+1.*aa.FnXII +10.*(0.3*z+0.3*x-0.*y+0.*pam) )))); //nXII
    dv[5]  = 250*(-go2 + 1/(1+exp(-(aa.rgo +10.*z) ))); //dtb derecho
    dv[6]  = 250*(-go3 + 1/(1+exp(-(aa.rgo +1.*aa.FnXII) ))); //dtb izquierdo
    dv[7]  = 250*(-pam + 1/(1+exp(-(aa.rpam +10.*z-10*x))));//PAM
    dv[8]  = 250*(-vtb + 1/(1+exp(-(aa.rpam +10.*pam) ))); //vtb

return;
}

//-----------------------------------------------
int main(){
  int i,j;
  double v[9],dt,t,phi1[3000];
//-----------------------------------------------
FILE *ptr, *ptr2;
ptr=fopen("presion-tension-dtb2-dtb-vtb.p2.dat","w");
ptr2=fopen("neuronas-p2-new.dat","w");

    v[0] = 0.02; v[1] = 0.5; v[2] = 0.03; v[3]=0.01; v[4]=0.01; v[5]=0.01; v[6]=0.01; v[7]=0.01; v[8]=0.01;

    aa.F=0.; aa.Fdelayed=0.;aa.F2=0.; aa.FnXII=0.;
    aa.rx=-7.45;
    aa.ry=-11.5;
    aa.rz=-3.83;
    aa.rw=-7.;
    aa.rgo=-3; // garantiza que empezamos apagado
    aa.rpam=-2.;

        dt = 1/20000.0;

while(t < 4){

        aa.F=0.;aa.Fdelayed=0.;aa.FnXII=0.;aa.F2=0.;
//EN EL PAPER LOS FnXII Y Fdelayed ESTAN NORMALIZADOS A 1, ENTONCES LOS ALFAS_FnXII Y ALFA_Fd LOS VALORES LOS MULTIPLIQUÉ POR 4
DIRECTO EN LAS ECUACIONES
        if((t>0.26)&&(t<0.285))aa.F=10;
        if((t>0.27)&&(t<0.285))aa.FnXII=10;
        if((t>0.29)&&(t<0.315))aa.Fdelayed=10;
      //  if((t>0.35)&&(t<0.38))aa.F2=40;

      if((t>0.38)&&(t<0.405))aa.F=10;
        if((t>0.39)&&(t<0.405))aa.FnXII=10;
        if((t>0.41)&&(t<0.435))aa.Fdelayed=10;

        if((t>0.50)&&(t<0.525))aa.F=10;
        if((t>0.51)&&(t<0.525))aa.FnXII=10;
        if((t>0.53)&&(t<0.555))aa.Fdelayed=10;

        if((t>0.62)&&(t<0.645))aa.F=10;
        if((t>0.63)&&(t<0.645))aa.FnXII=10;
        if((t>0.65)&&(t<0.675))aa.Fdelayed=10;

        if((t>0.74)&&(t<0.765))aa.F=10;
        if((t>0.75)&&(t<0.765))aa.FnXII=10;
        if((t>0.77)&&(t<0.795))aa.Fdelayed=10;

        if((t>0.86)&&(t<0.885))aa.F=10;
        if((t>0.87)&&(t<0.885))aa.FnXII=10;
        if((t>0.89)&&(t<0.915))aa.Fdelayed=10;

        if((t>0.98)&&(t<1.005))aa.F=10;
        if((t>0.99)&&(t<1.005))aa.FnXII=10;
        if((t>1.01)&&(t<1.035))aa.Fdelayed=10;

        if((t>1.10)&&(t<1.125))aa.F=10;
        if((t>1.11)&&(t<1.125))aa.FnXII=10;
        if((t>1.13)&&(t<1.155))aa.Fdelayed=10;


        if((t>1.22)&&(t<1.245))aa.F=10;
        if((t>1.23)&&(t<1.245))aa.FnXII=10;
        if((t>1.25)&&(t<1.275))aa.Fdelayed=10;


      rk4(takens, v, 9, t, dt);
      t = t+dt;
```

```
   // printf("%lg\t%lg\n",v[7],v[4]);
                        fprintf(ptr2,"%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\n",t,v[0],v[1],v[2],v[3],v[4],v[5],v[6],v[7],v[8], aa.F,aa.Fdelayed,aa.FnXII);
                        fprintf(ptr,"%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\n",v[0],v[4],v[5],v[6],v[8]);
   }

//-----------------------------------------------

}
//-----------------------------------------------------------------------------------------------------------
```

fona_circulo.p2-bilateral.c

```
#include <stdio.h>
#include <stdlib.h>
#include <math.h>

#define gamma 9000      //gamma 9000

#define PI2 6.2831853
#define IA 16807
#define IM 2147483647
#define AM (1.0/IM)
#define IQ 127773
#define IR 2836
#define NTAB 32
#define NDIV (1+(IM-1)/NTAB)
#define EPS 1.2e-7
#define RNMX (1.0-EPS)
#define Nforzante 100
#define Nforzados 100
#define N_NAME1_AUX 30
#define N_NAME2_AUX 30
#define S(x) 1/(1+exp(-(x/0.015)))

#define c 35000

struct Par {
                                double A1; double A2; double A3;
                                double Ancho1; double Ancho2; double Ancho3;
                                double r;
                                double forcing1; double forcing2;
                        double RBoverLB; double s1overLG; double s1overLB; double s1overCH;
                                double LGoverLB; double RB;
                                double noise; double rdis; double kappa; double beta; double kappa2;
                                double vtb; double dtb;
   double vtb2; double dtb2; double vs;
} aa;


void takens(int n,double v[],double dv[],double t) {
      extern double PRESSURE,presion,acople;
      double x,y,i1,i2,i3,w2,x2,y2, x3, y3;

x=v[0]; y=v[1], i1=v[2], i2=v[3]; i3=v[4];x2=v[5],y2=v[6], w2=v[7];

// FUENTE 1
 dv[0]=  y;
 dv[1]= aa.beta*gamma*y-1.*gamma*(x-0.)*(x-0.)*y-aa.kappa*(x+.3*x*x*x)*gamma*gamma+gamma*gamma*aa.dtb-gamma*gamma*aa.vtb;
// FILTRO
 dv[2]=i2;
 dv[3]=-aa.s1overLG*aa.s1overCH*i1-aa.rdis*(aa.s1overLB+aa.s1overLG)*i2+i3*(aa.s1overLG*aa.s1overCH-
aa.rdis*aa.RB*aa.s1overLG*aa.s1overLB)+(aa.s1overLG)*aa.forcing2+aa.rdis*aa.s1overLG*aa.s1overLB*aa.forcing1;
 dv[4]=-(1/aa.s1overLG)*aa.s1overLB*i2-aa.RB*aa.s1overLB*i3+aa.s1overLB*aa.forcing1;
// FUENTE 2
 dv[5]= y2;
 dv[6]= aa.beta*gamma*y2-1.*gamma*(x2-0.)*(x2-0.)*y2-aa.kappa2*(x2+.3*x2*x2*x2)*gamma*gamma+gamma*gamma*aa.dtb2-gamma*gamma*aa.vtb2;
 dv[7]= 0.;


      return;
}

float ran1(long *idum)
{
                        int j;
                        long k;
                        static long iy=0;
                        static long iv[NTAB];
                        float temp;

                        if (*idum <= 0 || !iy) {
                                if (-(*idum) < 1) *idum=1;
                                else *idum = -(*idum);
                                for (j=NTAB+7;j>=0;j--) {
                                        k=(*idum)/IQ;
                                        *idum=IA*(*idum-k*IQ)-IR*k;
                                        if (*idum < 0) *idum += IM;
                                        if (j < NTAB) iv[j] = *idum;
                                }
                                iy=iv[0];
                        }
                        k=(*idum)/IQ;
                        *idum=IA*(*idum-k*IQ)-IR*k;
                        if (*idum < 0) *idum += IM;
                        j=iy/NDIV;
                        iy=iv[j];
                        iv[j] = *idum;
                        if ((temp=AM*iy) > RNMX) return RNMX;
                        else return temp;
}


void nombrar1_par1_par2(char *name_space1,int par1,int par2){
```

```
 sprintf(name_space1,"temp.%d.%d.dat",par1,par2);
return;
}

double PRESSURE=0.0; double presion, acople;


int main(){

 long idum=(-1);
 int i,j,taux,iii,ik,ikp,kk;
 int t,to,maxtau,tau1,tau2,tau3;
 double r12,r23,r21,r32,t12,t21,t23,t32,r34,t34,tiempot,tnoise,tcount;
 double *a,*bf,*bb,*cf,*cb,*df,*db;
 double ancho1,ancho2,ancho3,largo1,largo2,largo3;
 double dt, ddb,dbold,nada,atenua;
 double v[10];
 double preout;


 FILE *ptr,*ptr1,*ptr2,*ptr3;
      char nombre_archivo1[N_NAME1_AUX];

for(ik=1;ik<2;ik++){
for(ikp=1;ikp<2;ikp++){

nombrar1_par1_par2(nombre_archivo1,ik,ikp);
ptr1=fopen("salida-p2-bilateral2.dat","w");
ptr2=fopen("presion-tension-dtb2-dtb-vtb.p2.dat","r");
//ptr3=fopen("vtb.dat","r");
ptr=fopen("p2-bilateral0.dat","w");

 v[0]=.000000000005;v[1]=0.00000000001;
 v[2]=.000000000001;v[3]=0.00000000001;
 v[4]=.000000000001;

v[5]=.0000000000045;v[6]=.000000000000001;

v[7]=0.;


aa.forcing1=0.;
aa.forcing2=0.;
tiempot=0.;
tcount=0.;
aa.noise=0;
tnoise=0;
aa.r=0.4;
aa.rdis=7000;
//atenua=ikp*5;
atenua=1;
      dt=1./(882000.0);

 to=8000*400; // dos veces el tiempo de la silaba que quiero integrar (el dt es 20 veces la frecuencia de sampleo 44100 y aca esta por 40)

 a=(double*) calloc(to,sizeof(double));
 bf=(double*) calloc(to,sizeof(double));
 bb=(double*) calloc(to,sizeof(double));
 cf=(double*) calloc(to,sizeof(double));
 cb=(double*) calloc(to,sizeof(double));

 db=(double*) calloc(to,sizeof(double));
 df=(double*) calloc(to,sizeof(double));


aa.Ancho1=0.2; aa.Ancho2=.2; aa.Ancho3=0.2;
ancho1 = aa.Ancho1; ancho2 = aa.Ancho2; ancho3 = ancho2; largo1 = 1.5; largo2 =1.5;
 largo3 = 1.0;

// largo de traquea de finch, cerca de 3.4 cm.

 r12=(ancho1-ancho2)/(ancho1+ancho2);r21=-r12;
 r23=(ancho2-ancho3)/(ancho2+ancho3);r32=-r23;
 t12=1+r12;t21=1+r21;
 t23=1+r23;t32=1+r32;

 tau1=rint(largo1/(c*dt+0.0));
 tau2=rint(largo2/(c*dt+0.0));
 tau3=rint(largo3/(c*dt+0.0));

 fprintf(stderr,"T1,T2,T3 = %d,%d,%d \n",tau1,tau2,tau3);
 maxtau=tau3;
 if(tau1>=tau2&&tau1>=tau3) maxtau=tau1;
 if(tau2>=tau1&&tau2>=tau3) maxtau=tau2;
 t=0;

 for (j=0;j<=maxtau;j++) {
  bf[j]=0;bb[j]=0;cf[j]=0;cb[j]=0;df[j]=0;db[j]=0;
 }

 t=maxtau;
 taux=0;

//aa.sloverCH=1/Ch

aa.s1overCH=(36*2.5*2/25.)*1e09; //para cerca de 2000
aa.s1overLB=1.*1e-04; // con 7, 2000, con 14, 2700
aa.s1overLG=(50*1e-03)/.5; //aqui entra, en el denominador, el parametro . 0.1 9000-0.5 4000-1 2900
aa.RB=1*1e07;

// ch, lg y lb adaptar un poco a canarios. lb, lenght beak, lg lenght glottis, Vh volume of helmholtz resonator

 while ((t<to)&&(v[1]>-5000000)){
```

```
//for(kk=0;kk<500000;kk++) {   //kk=tiempo -> 1/2f*44100

tcount=tcount+dt;
//printf("%i\t%lg\n",kk,tcount);


   dbold=db[t];


   a[t]= (.50)* (1.01*(1.*(aa.A1*v[1]+aa.A2*v[6])))+bb[t-tau1];

// para usar una fuente, aa.A1 <> 0 y las otras cero. Para usar
// dos fuentes, aa.A1 y aa.A2 distinto de cero

   bb[t]=r12*a[t-tau1]+t21*cb[t-tau2];
   bf[t]=t12*a[t-tau1]+r21*cb[t-tau2];
   cb[t]=r23*bf[t-tau2]+t32*db[t-tau3];
   cf[t]=t23*bf[t-tau2]+r32*db[t-tau3];
   db[t]=-aa.r*cf[t-tau3];

ddb=(db[t]-dbold)/dt;
aa.forcing1=db[t];
aa.forcing2=ddb;

PRESSURE=a[t];

tiempot=tiempot+dt;

ancho1 = aa.Ancho1; ancho2 = aa.Ancho2;
r12=(ancho1-ancho2)/(ancho1+ancho2);r21=-r12;
  r23=(ancho2-ancho3)/(ancho2+ancho3);r32=-r23;
    t12=1+r12;t21=1+r21;
      t23=1+r23;t32=1+r32;


       rk4(takens,v,10,t+0.0,dt);
aa.noise=0;
preout=aa.RB*v[4];

if(taux==44) {

                                fprintf(ptr1,"%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\n",tiempot,aa.beta,aa.kappa,preout,aa.dtb,aa.vtb,aa.kappa2,aa.dtb2,aa.vtb2);
            fscanf(ptr2,"%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\n",&aa.beta,&aa.vs,&aa.dtb2,&aa.dtb,&aa.vtb);
               aa.beta=aa.beta*2.-0.;
               aa.kappa=aa.vs*1.+1.5;
               aa.dtb2=aa.dtb2*30.+2.7;//18000.-900;//800.-6;
               aa.dtb=aa.dtb*15.-2.;
               aa.kappa2=aa.vs*3.+0.7;
               aa.vtb=aa.vtb*25.-3;
               aa.vtb2=aa.vtb*5.;


       taux=0;
                                fprintf(ptr,"%lg\n",preout);

           }
   taux++;
   fflush(NULL);

if((tiempot>0.096)&&(tiempot<0.31)){
aa.noise=.10*(ran1(&idum)-0.5);
   aa.A1=1.; //low freq
   aa.A2=1.; // high freq

aa.r=0.4;

   aa.s1overCH=2.25e10;//(350/0.8)*1e09; //para cerca de 2000
aa.s1overLB=1.*1e-04; // con 7, 2000, con 14, 2700
aa.s1overLG=(0.025); //aqui entra, en el denominador, el parametro . 0.1 9000-0.5 4000-1 2900
aa.RB=(.5)*1e07;
aa.rdis=(50./5.)*(10000.);
aa.noise=.0*(ran1(&idum)-0.5);

}
  //  kk++;
    t++;
  }
//}

   free(a);
   free(bf);
   free(bb);
   free(cf);
   free(cb);
   free(df);
   free(db);

} //el ciclo nuevo ikp
}//el ciclo nuevo ik


}
//-------------------------------------------------------------------------------------------------------
```

6.7.3 Códigos P1

integral-p1-resubmision.c

```
//---------------------------------------------
#include <stdio.h>
#include <math.h>
#include "rk4.c"
//---------------------------------------------
#define PI 3.1416
#define N_NAME1_AUX 30
#define IA 16807
#define IM 2147483647
#define AM (1.0/IM)
#define IQ 127773
#define IR 2836
#define NTAB 32
#define NDIV (1+(IM-1)/NTAB)
#define EPS 1.2e-7
#define RNMX (1.0-EPS)
//---------------------------------------------
struct Par {
                double F; double Fdelayed; double F2; double FnXII; double rx; double ry; double rz; double rw;double rgo; double rpam;} aa;

//---------------------------------------------
void takens(int n, double v[], double dv[], double t)
{
 double x,y,z,w,go,go2,go3,pam,vtb;

   x=v[0]; y=v[1]; z=v[2]; w=v[3]; go=v[4];go2=v[5]; go3=v[6]; pam=v[7]; vtb=v[8];

   dv[0]  = 250*(-x + 1/(1+exp(-(aa.rx +4.5*z+0.*aa.F+10.*x -4.5*y ))));  //RAm exc
   dv[1]  = 250*(-y + 1/(1+exp(-(aa.ry +4.5*z+10.*x + 2*y +0.*pam))));          //RAm inh
   dv[2]  = 20.*(-z + 1/(1+exp(-(aa.rz+35.*aa.Fdelayed +10*z-10*w ))));   //RA exc
   dv[3]  = 20.*(-w + 1/(1+exp(-(aa.rw+.0*aa.Fdelayed+25*aa.F2+10*z+2*w ))));  //RA inh
   dv[4]  = 250*(-go + 1/(1+exp(-(aa.rgo+0.*aa.FnXII +10.*(.1*z+0.17*x-0.*y+0.6*pam) )))); //nXII
   dv[5]  = 250*(-go2 + 1/(1+exp(-(aa.rgo +1.*z) ))); //dtb derecho
   dv[6]  = 250*(-go3 + 1/(1+exp(-(aa.rgo +0.*aa.FnXII) ))); //dtb izquierdo
   dv[7]  = 250*(-pam + 1/(1+exp(-(aa.rpam +1.*z-10*x))));//PAM
   dv[8]  = 250*(-vtb + 1/(1+exp(-(aa.rgo +10.*pam) ))); //vtb

return;
}

//---------------------------------------------
int main(){
  int i,j;
  double v[9],dt,t,phi1[3000];
//---------------------------------------------
FILE *ptr, *ptr2;
ptr=fopen("presion-tension-dtb2-dtb-vtb.p1-down.dat","w");
ptr2=fopen("neuronas-p1_down.dat","w")

   v[0] = 0.02; v[1] = 0.5; v[2] = 0.03; v[3]=0.01; v[4]=0.01; v[5]=0.01; v[6]=0.01; v[7]=0.01; v[8]=0.01;

   aa.F=0; aa.Fdelayed=0;aa.F2=0; aa.FnXII=0;
   aa.rx=-7.55;
   aa.ry=-11.5;
   aa.rz=-3.5;
   aa.rw=-12.;
   aa.rgo=-3.; // garantiza que empezamos apagado
   aa.rpam=-0.;

      dt = 1/20000.0;

   while(t < 4){
      aa.F=0;aa.Fdelayed=0;aa.F2=0;aa.FnXII=0;
      if((t>1.)&&(t<1.04))aa.F=10;
                  if((t>1.01)&&(t<1.05))aa.FnXII=10;
      if((t>1.06)&&(t<1.1))aa.Fdelayed=10;
      if((t>2.00)&&(t<2.04))aa.F2=10;

   //   if((t>2)&&(t<2.01))aa.F=50;
   //    if((t>2.01)&&(t<2.02))aa.Fdelayed=50;

     rk4(takens, v, 9, t, dt);
     t = t+dt;

   // printf("%lg\t%lg\n",v[7],v[4]);
                  fprintf(ptr2,"%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\n",t,v[0],v[1],v[2],v[3],v[4],v[5],v[7],                                    v[8],
aa.F,aa.F2,aa.Fdelayed,aa.FnXII);
                  fprintf(ptr,"%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\n",v[0],v[4],v[5],v[6],v[8]);
   }

//---------------------------------------------

}
//-------------------------------------------------------------------------------------------------------------
```

fona_circulo_p1_down.c

```
#include <stdio.h>
#include <stdlib.h>
#include <math.h>
#include "rk4.c"

#define gamma 9000 //24000

#define PI2 6.2831853
#define IA 16807
#define IM 2147483647
#define AM (1.0/IM)
#define IQ 127773
#define IR 2836
#define NTAB 32
#define NDIV (1+(IM-1)/NTAB)
#define EPS 1.2e-7
```

```
#define RNMX (1.0-EPS)
#define Nforzante 100
#define Nforzados 100
#define N_NAME1_AUX 30
#define N_NAME2_AUX 30
#define S(x) 1/(1+exp(-(x/0.015)))
#define c 35000

struct Par {
                                double A1; double A2; double A3; double dum;
                                double Ancho1; double Ancho2; double Ancho3;
                                double r;
                                double forcing1; double forcing2;
                        double RBoverLB; double s1overLG; double s1overLB; double s1overCH;
                                double LGoverLB; double RB;
                                double noise; double rdis; double kappa; double beta; double kappa2;
                                double vtb; double dtb;
                                double vtb2; double dtb2; double env; double vs;
} aa;
void takens(int n,double v[],double dv[],double t) {
        extern double PRESSURE,presion,acople;
        double x,y,i1,i2,i3,w2,x2,y2, x3, y3 ;

x=v[0]; y=v[1], i1=v[2], i2=v[3]; i3=v[4];x2=v[5],y2=v[6], w2=v[7],

// FUENTE 1
 dv[0]=  y;
 dv[1]= aa.beta*gamma*y-1.*gamma*(x-0.1)*(x-0.1)*y-aa.kappa*(x+.3*x*x*x)*gamma*gamma+gamma*gamma*aa.dtb-gamma*gamma*aa.vtb;
// FILTRO
 dv[2]=i2;
 dv[3]=-aa.s1overLG*aa.s1overCH*i1-aa.rdis*(aa.s1overLB+aa.s1overLG)*i2+i3*(aa.s1overLG*aa.s1overCH-
aa.rdis*aa.RB*aa.s1overLG*aa.s1overLB)+(aa.s1overLG)*aa.forcing2+aa.rdis*aa.s1overLG*aa.s1overLB*aa.forcing1;
 dv[4]=-(1/aa.s1overLG)*aa.s1overLB*i2-aa.RB*aa.s1overLB*i3+aa.s1overLB*aa.forcing1;
// FUENTE 2
 dv[5]= y2;
 dv[6]= aa.beta*gamma*y2-1.*gamma*(x2-0.1)*(x2-0.1)*y2-aa.kappa2*(x2+.3*x2*x2*x2)*gamma*gamma+gamma*gamma*aa.dtb2-gamma*gamma*aa.vtb2;
 dv[7]= 0.;


        return;
}

float ran1(long *idum)
{
                        int j;
                        long k;
                        static long iy=0;
                        static long iv[NTAB];
                        float temp;

                        if (*idum <= 0 || !iy) {
                                if (-(*idum) < 1) *idum=1;
                                else *idum = -(*idum);
                                for (j=NTAB+7;j>=0;j--) {
                                        k=(*idum)/IQ;
                                        *idum=IA*(*idum-k*IQ)-IR*k;
                                        if (*idum < 0) *idum += IM;
                                        if (j < NTAB) iv[j] = *idum;
                                }
                                iy=iv[0];
                        }
                        k=(*idum)/IQ;
                        *idum=IA*(*idum-k*IQ)-IR*k;
                        if (*idum < 0) *idum += IM;
                        j=iy/NDIV;
                        iy=iv[j];
                        iv[j] = *idum;
                        if ((temp=AM*iy) > RNMX) return RNMX;
                        else return temp;
}

void nombrar1_par1_par2(char *name_space1,int par1,int par2){
  sprintf(name_space1,"d3-suavetemp.%d.%d.dat",par1,par2);
return;
}

double PRESSURE=0.0; double presion, acople;


int main(){

  long idum=(-1);
  int i,j,taux,iii,ik,ikp,kk;
  int t,to,maxtau,tau1,tau2,tau3;
  double r12,r23,r21,r32,t12,t21,t23,t32,r34,t34,tiempot,tnoise,tcount;
  double *a,*bf,*bb,*cf,*cb,*df,*db;
  double ancho1,ancho2,ancho3,largo1,largo2,largo3;
  double dt, ddb,dbold,nada,atenua;
  double v[15];
  double preout;
  double dum;


 FILE *ptr,*ptr1,*ptr2,*ptr3;
        char nombre_archivo1[N_NAME1_AUX];

for(ik=1;ik<2;ik++){
for(ikp=1;ikp<2;ikp++){

nombrar1_par1_par2(nombre_archivo1,ik,ikp);
ptr1=fopen("salida-p1-down2.dat","w");
ptr2=fopen("presion-tension-dtb2-dtb-vtb.p1-down.dat","r");
//ptr3=fopen("vtb.dat","r");
```

```
ptr=fopen("p1-down2.dat","w");

 v[0]=.000000000005;v[1]=0.00000000001;
 v[2]=.000000000001;v[3]=0.00000000001;
 v[4]=.000000000001;
 v[5]=.000000000005;v[6]=.000000000000001;

aa.forcing1=0.;
aa.forcing2=0.;
tiempot=0.;
tcount=0.;
aa.noise=0;
tnoise=0;

//atenua=ikp*5;
atenua=1;
      dt=1./(882000.0);

  to=8000*1600; //441000; // tiempo*dt (en este caso 882000)

  a=(double*) calloc(to,sizeof(double));
  bf=(double*) calloc(to,sizeof(double));
  bb=(double*) calloc(to,sizeof(double));
  cf=(double*) calloc(to,sizeof(double));
  cb=(double*) calloc(to,sizeof(double));
  db=(double*) calloc(to,sizeof(double));
  df=(double*) calloc(to,sizeof(double));


aa.Ancho1=0.2; aa.Ancho2=.2; aa.Ancho3=0.2;
ancho1 = aa.Ancho1; ancho2 = aa.Ancho2; ancho3 = ancho2; largo1 = 1.5; largo2 =1.5;
 largo3 = 1.0;

// largo de traquea de finch, cerca de 3.4 cm.

  r12=(ancho1-ancho2)/(ancho1+ancho2);r21=-r12;
  r23=(ancho2-ancho3)/(ancho2+ancho3);r32=-r23;
  t12=1+r12;t21=1+r21;
  t23=1+r23;t32=1+r32;

  tau1=rint(largo1/(c*dt+0.0));
  tau2=rint(largo2/(c*dt+0.0));
  tau3=rint(largo3/(c*dt+0.0));

  fprintf(stderr,"caminando--->T1,T2,T3 = %d,%d,%d \n",tau1,tau2,tau3);
  maxtau=tau3;
  if(tau1>=tau2&&tau1>=tau3) maxtau=tau1;
  if(tau2>=tau1&&tau2>=tau3) maxtau=tau2;
  t=0;

  for (j=0;j<=maxtau;j++) {
    bf[j]=0;bb[j]=0;cf[j]=0;cb[j]=0;df[j]=0;db[j]=0;
  }

  t=maxtau;
  taux=0;

//aa.sloverCH=1/Ch

aa.s1overCH=1.4;
aa.s1overLG=1.8;
aa.rdis=10000;
aa.r=0.2;
aa.s1overLB=1.*1e-04;

// ch, lg y lb adaptar un poco a canarios. lb, lenght beak, lg lenght glottis, Vh volume of helmholtz resonator

while ((t<to)&&(v[1]>-5000000)){

    dbold=db[t];

    a[t]= (.50)* (1.01*(1.*(aa.A1*v[1]+aa.A2*v[6])))+bb[t-tau1];

// para usar una fuente, aa.A1 <> 0 y las otras cero. Para usar
// dos fuentes, aa.A1 y aa.A2 distinto de cero

    bb[t]=r12*a[t-tau1]+t21*cb[t-tau2];
    bf[t]=t12*a[t-tau1]+r21*cb[t-tau2];
    cb[t]=r23*bf[t-tau2]+t32*db[t-tau3];
    cf[t]=t23*bf[t-tau2]+r32*db[t-tau3];
    db[t]=-aa.r*cf[t-tau3];

ddb=(db[t]-dbold)/dt;
aa.forcing1=db[t];
aa.forcing2=ddb;

PRESSURE=a[t];

tiempot=tiempot+dt;

ancho1 = aa.Ancho1; ancho2 = aa.Ancho2;
r12=(ancho1-ancho2)/(ancho1+ancho2);r21=-r12;
  r23=(ancho2-ancho3)/(ancho2+ancho3);r32=-r23;
    t12=1+r12;t21=1+r21;
      t23=1+r23;t32=1+r32;


       rk4(takens,v,16,t+0.0,dt);
aa.noise=0;
preout=aa.RB*v[4];//*aa.env;//*aa.env;


if(taux==44) {
```

```
                fprintf(ptr1,"%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\n",tiempot,aa.beta,aa.kappa,preout,aa.dtb,aa.vtb,aa.kappa2,aa.dtb2,aa.vtb2);
        fscanf(ptr2,"%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\n",&aa.beta,&aa.vs,&aa.dtb2,&aa.dtb, &aa.vtb);
        aa.beta=aa.beta*2-0.85;
                        aa.kappa=aa.vs*1.5-0.;
                        aa.dtb=aa.dtb*1;//100;
                         aa.kappa2=aa.vs*1+3;
                        aa.dtb2=aa.dtb2*10+3;//8000+0;
    aa.vtb=aa.vtb*5-0.1;

                        taux=0;
                        fprintf(ptr,"%lg\n",preout);
                        }
  taux++;
  fflush(NULL);


if((tiempot>1.25)&&(tiempot<=2.4)){
aa.noise=.10*(ran1(&idum)-0.5);
aa.A2=1.;
aa.A1=1.;
  aa.kappa=aa.vs*1.7+1.5;

  //FILTRO
  aa.r=0.2;
  aa.s1overCH=(1.5)*1e11; //para cerca de 2000
  aa.s1overLB=1.*1e-04; // con 7, 2000, con 14, 2700
  aa.s1overLG=(0.0014); //aqui entra, en el denominador, el parametro . 0.1 9000-0.5 4000-1 2900
  aa.RB=(.5)*1e07;
  aa.rdis=(30)*(100000.);
  aa.noise=.3*(ran1(&idum)-0.5);


 /*
aa.r=0.0000001;
aa.s1overLB=1.*1e-03;
aa.RB=(.5)*1e07;
aa.noise=1.*(ran1(&idum)-0.5);
*/
}
  t++;

}
fprintf(stderr,"samporote\n");

  free(a);
  free(bf);
  free(bb);
  free(cf);
  free(cb);
  free(df);
  free(db);

} //el ciclo nuevo ikp
}//el ciclo nuevo ik



}
//---------------------------------------------------------------------------------------------------------
```

6.7.4 Códigos PULSATIL

Integral-pulsatil-resubmission.c

```
//---------------------------------------------
#include <stdio.h>
#include <math.h>
#include "rk4.c"
//---------------------------------------------
#define PI 3.1416
#define N_NAME1_AUX 30
#define IA 16807
#define IM 2147483647
#define AM (1.0/IM)
#define IQ 127773
#define IR 2836
#define NTAB 32
#define NDIV (1+(IM-1)/NTAB)
#define EPS 1.2e-7
#define RNMX (1.0-EPS)
//---------------------------------------------
struct Par {
                double F; double Fdelayed; double F2; double FnXII; double rx; double ry; double rz; double rw; double rgo;double rpam;} aa;

//---------------------------------------------
void takens(int n, double v[], double dv[], double t)
{
  double x,y,z,w,go,go2,go3,pam,vtb;

  x=v[0]; y=v[1]; z=v[2]; w=v[3]; go=v[4];go2=v[5]; go3=v[6]; pam=v[7]; vtb=v[8];

  dv[0]  = 250*(-x + 1/(1+exp(-(aa.rx+6.0*z+0.*aa.F+10.*x -6.2*y ))));  //RAm exc
  dv[1]  = 250*(-y + 1/(1+exp(-(aa.ry+6.0*z+10.*x + 2*y +0.*pam))));          //RAm inh
  dv[2]  = 20.*(-z + 1/(1+exp(-(aa.rz+5.*aa.Fdelayed+0.*aa.F2 +10*z-10*w ))));  //RA exc
  dv[3]  = 20.*(-w + 1/(1+exp(-(aa.rw+.0*aa.Fdelayed+5*aa.F2+10*z+2*w ))));  //RA inh
  dv[4]  = 250*(-go + 1/(1+exp(-(aa.rgo+1.*aa.FnXII +10.*(.15*z+.11*x-0.*y+0.*pam) )))); //nXII
  dv[5]  = 250*(-go2 + 1/(1+exp(-(aa.rgo +1.*z) ))); //dtb derecho
```

```
   dv[6]  = 250*(-go3 + 1/(1+exp(-(aa.rgo +1.*aa.FnXII) ))); //dtb izquierdo
   dv[7]  = 250*(-pam + 1/(1+exp(-(aa.rpam +0.*z-10.*x))));//PAM
   dv[8]  = 250*(-vtb + 1/(1+exp(-(aa.rpam +10.*pam) ))); //vtb

return;
}

//-----------------------------------------------
int main(){
  int i,j;
  double v[9],dt,t,phi1[3000];
//-----------------------------------------------
   FILE *ptr, *ptr2;
   ptr=fopen("presion-tension-dtb2-dtb-vtb.pulsatil-up.dat","w");
   ptr2=fopen("neuronas-pulsatil_up.dat","w");

   v[0] = 0.02; v[1] = 0.5; v[2] = 0.03; v[3]=0.01; v[4]=0.01; v[5]=0.01; v[6]=0.01; v[7]=0.01; v[8]=0.1;

   aa.F=0; aa.Fdelayed=0;aa.F2=0; aa.FnXII=0;
   aa.rx=-7.5;
   aa.ry=-11.5;
   aa.rz=-5.25;
   aa.rw=-12.;
   aa.rgo=-3.; // garantiza que empezamos apagado
   aa.rpam=-0.;


      dt = 1/20000.0;

   while(t < 4){
      aa.F=0;aa.Fdelayed=0;aa.F2=0;aa.FnXII=0;
      if((t>1.)&&(t<1.04))aa.F=10;
      if((t>1.01)&&(t<1.05))aa.FnXII=0;
      if((t>1.06)&&(t<1.1))aa.Fdelayed=10;
      if((t>1.76)&&(t<1.8))aa.F2=10;

   //   if((t>2)&&(t<2.01))aa.F=50;
   //    if((t>2.01)&&(t<2.02))aa.Fdelayed=50;

      rk4(takens, v, 9, t, dt);
      t = t+dt;

      // printf("%lg\t%lg\n",v[7],v[4]);
      fprintf(ptr2,"%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\n",t,v[0],v[1],v[2],v[3],v[4],v[5],v[6],v[7],v[8], aa.F,aa.F2,aa.Fdelayed,aa.FnXII);
      fprintf(ptr,"%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\n",v[0],v[4],v[5],v[6],v[8]);
   }
}
//-----------------------------------------------------------------------------------------------------------
```

fona_circulo_pulsatil_up.c

```
#include <stdio.h>
#include <stdlib.h>
#include <math.h>
#include "rk4.c"

#define gamma 9000//24000

#define PI2 6.2831853
#define IA 16807
#define IM 2147483647
#define AM (1.0/IM)
#define IQ 127773
#define IR 2836
#define NTAB 32
#define NDIV (1+(IM-1)/NTAB)
#define EPS 1.2e-7
#define RNMX (1.0-EPS)
#define Nforzante 100
#define Nforzados 100
#define N_NAME1_AUX 30
#define N_NAME2_AUX 30
#define S(x) 1/(1+exp(-(x/0.015)))

#define c 35000

struct Par {
                                double A1; double A2; double A3; double dum;
                                double Ancho1; double Ancho2; double Ancho3;
                                double r;
                                double forcing1; double forcing2;
                        double RBoverLB; double s1overLG; double s1overLB; double s1overCH;
                                double LGoverLB; double RB;
                                double noise; double rdis; double kappa; double beta; double kappa2;
                                double vtb; double dtb;
                                double vtb2; double dtb2; double env; double vs;
} aa;


void takens(int n,double v[],double dv[],double t) {
      extern double PRESSURE,presion,acople;
      double x,y,i1,i2,i3,w2,x2,y2, x3, y3 ;

x=v[0]; y=v[1], i1=v[2], i2=v[3]; i3=v[4];x2=v[5],y2=v[6], w2=v[7],

// FUENTE 1
 dv[0]=  y;
 dv[1]= aa.beta*gamma*y-1.*gamma*(x-0.)*(x-0.)*y-aa.kappa*(x+.3*x*x*x)*gamma*gamma+gamma*gamma*aa.dtb-gamma*gamma*aa.vtb;
// FILTRO
 dv[2]=i2;
 dv[3]=-aa.s1overLG*aa.s1overCH*i1-aa.rdis*(aa.s1overLB+aa.s1overLG)*i2+i3*(aa.s1overLG*aa.s1overCH-
aa.rdis*aa.RB*aa.s1overLG*aa.s1overLB)+(aa.s1overLG)*aa.forcing2+aa.rdis*aa.s1overLG*aa.s1overLB*aa.forcing1;
 dv[4]=-(1/aa.s1overLG)*aa.s1overLB*i2-aa.RB*aa.s1overLB*i3+aa.s1overLB*aa.forcing1;
// FUENTE 2
```

```
 dv[5]= y2;
 dv[6]= aa.beta*gamma*y2-1.*gamma*(x2-0.)*(x2-0.)*y2-aa.kappa2*(x2+.3*x2*x2*x2)*gamma*gamma+gamma*gamma*aa.dtb2-gamma*gamma*aa.vtb2;
 dv[7]= 0.;


      return;
}

float ran1(long *idum)
{
                    int j;
                    long k;
                    static long iy=0;
                    static long iv[NTAB];
                    float temp;

                    if (*idum <= 0 || !iy) {
                                if (-(*idum) < 1) *idum=1;
                                else *idum = -(*idum);
                                for (j=NTAB+7;j>=0;j--) {
                                            k=(*idum)/IQ;
                                            *idum=IA*(*idum-k*IQ)-IR*k;
                                            if (*idum < 0) *idum += IM;
                                            if (j < NTAB) iv[j] = *idum;
                                }
                                iy=iv[0];
                    }
                    k=(*idum)/IQ;
                    *idum=IA*(*idum-k*IQ)-IR*k;
                    if (*idum < 0) *idum += IM;
                    j=iy/NDIV;
                    iy=iv[j];
                    iv[j] = *idum;
                    if ((temp=AM*iy) > RNMX) return RNMX;
                    else return temp;
}

void nombrar1_par1_par2(char *name_space1,int par1,int par2){
  sprintf(name_space1,"d3-suavetemp.%d.%d.dat",par1,par2);
return;
}

double PRESSURE=0.0; double presion, acople;


int main(){

  long idum=(-1);
  int i,j,taux,iii,ik,ikp,kk;
  int t,to,maxtau,tau1,tau2,tau3;
  double r12,r23,r21,r32,t12,t21,t23,t32,r34,t34,tiempot,tnoise,tcount;
  double *a,*bf,*bb,*cf,*cb,*df,*db;
  double ancho1,ancho2,ancho3,largo1,largo2,largo3;
  double dt, ddb,dbold,nada,atenua;
  double v[15];
  double preout;
  double dum;

 FILE *ptr,*ptr1,*ptr2,*ptr3;
      char nombre_archivo1[N_NAME1_AUX];

for(ik=1;ik<2;ik++){
for(ikp=1;ikp<2;ikp++){

nombrar1_par1_par2(nombre_archivo1,ik,ikp);
ptr1=fopen("salida-pulsatil-up.dat","w");
ptr2=fopen("presion-tension-dtb2-dtb-vtb.pulsatil-up.dat","r");
//ptr3=fopen("vtb.dat","r");
ptr=fopen("pulsatil-up.dat","w");

 v[0]=.000000000005;v[1]=0.00000000001;
 v[2]=.000000000001;v[3]=0.00000000001;
 v[4]=.000000000001;
 v[5]=.000000000005;v[6]=.000000000000001;


aa.forcing1=0.;
aa.forcing2=0.;
tiempot=0.;
tcount=0.;
aa.noise=0;
tnoise=0;

//atenua=ikp*5;
atenua=1;
      dt=1./(882000.0);

  to=8000*800; //441000; // tiempo*dt (en este caso 882000)

  a=(double*) calloc(to,sizeof(double));
  bf=(double*) calloc(to,sizeof(double));
  bb=(double*) calloc(to,sizeof(double));
  cf=(double*) calloc(to,sizeof(double));
  cb=(double*) calloc(to,sizeof(double));
  db=(double*) calloc(to,sizeof(double));
  df=(double*) calloc(to,sizeof(double));

aa.Ancho1=0.2; aa.Ancho2=.2; aa.Ancho3=0.2;
ancho1 = aa.Ancho1; ancho2 = aa.Ancho2; ancho3 = ancho2; largo1 = 1.5; largo2 =1.5;
 largo3 = 1.0;

// largo de traquea de finch, cerca de 3.4 cm.
```

```
  r12=(ancho1-ancho2)/(ancho1+ancho2);r21=-r12;
  r23=(ancho2-ancho3)/(ancho2+ancho3);r32=-r23;
  t12=1+r12;t21=1+r21;
  t23=1+r23;t32=1+r32;

  tau1=rint(largo1/(c*dt+0.0));
  tau2=rint(largo2/(c*dt+0.0));
  tau3=rint(largo3/(c*dt+0.0));

  fprintf(stderr,"caminando--->T1,T2,T3 = %d,%d,%d \n",tau1,tau2,tau3);
  maxtau=tau3;
  if(tau1>=tau2&&tau1>=tau3) maxtau=tau1;
  if(tau2>=tau1&&tau2>=tau3) maxtau=tau2;
  t=0;

  for (j=0;j<=maxtau;j++) {
   bf[j]=0;bb[j]=0;cf[j]=0;cb[j]=0;df[j]=0;db[j]=0;
  }

  t=maxtau;
  taux=0;

//aa.sloverCH=1/Ch

aa.s1overCH=1.4;
aa.s1overLG=1.8;
aa.rdis=10000;
aa.r=0.2;
aa.s1overLB=1.*1e-04;

// ch, lg y lb adaptar un poco a canarios. lb, lenght beak, lg lenght glottis, Vh volume of helmholtz resonator

while ((t<to)&&(v[1]>-5000000)){

    dbold=db[t];

    a[t]= (.50)* (1.01*(1.*(aa.A1*v[1]+aa.A2*v[6])))+bb[t-tau1];

// para usar una fuente, aa.A1 <> 0 y las otras cero. Para usar
// dos fuentes, aa.A1 y aa.A2 distinto de cero

    bb[t]=r12*a[t-tau1]+t21*cb[t-tau2];
    bf[t]=t12*a[t-tau1]+r21*cb[t-tau2];
    cb[t]=r23*bf[t-tau2]+t32*db[t-tau3];
    cf[t]=t23*bf[t-tau2]+r32*db[t-tau3];
    db[t]=-aa.r*cf[t-tau3];

ddb=(db[t]-dbold)/dt;
aa.forcing1=db[t];
aa.forcing2=ddb;

PRESSURE=a[t];

tiempot=tiempot+dt;

ancho1 = aa.Ancho1; ancho2 = aa.Ancho2;
r12=(ancho1-ancho2)/(ancho1+ancho2);r21=-r12;
  r23=(ancho2-ancho3)/(ancho2+ancho3);r32=-r23;
    t12=1+r12;t21=1+r21;
      t23=1+r23;t32=1+r32;


       rk4(takens,v,16,t+0.0,dt);
aa.noise=0;
preout=aa.RB*v[4];//*aa.env;//*aa.env;


if(taux==44) {

                    fprintf(ptr1,"%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\n",tiempot,aa.beta,aa.kappa,preout,aa.dtb,aa.vtb,aa.kappa2,aa.dtb2,aa.vtb2);
            fscanf(ptr2,"%lg\t%lg\t%lg\t%lg\t%lg\n",&aa.beta,&aa.vs,&aa.dtb,&aa.dtb2,&aa.vtb);
       aa.beta=aa.beta*1-0.25;
                                  aa.kappa=aa.vs*1.6+0.1;
       aa.dtb=aa.dtb*1.;//10-4.7;//100;
                                   aa.kappa2=aa.vs*30.-0.;
                                  aa.dtb2=aa.dtb2*1;//8000+0;
       aa.vtb2=aa.vtb*0.-0.;

                                  taux=0;
                                  fprintf(ptr,"%lg\n",preout);
                                  }
   taux++;
   fflush(NULL);

if((tiempot>1.23)&&(tiempot<=1.79)){
aa.noise=.10*(ran1(&idum)-0.5);
aa.A2=1.;
aa.A1=0.;

   aa.kappa2=aa.kappa2-0.22;

//aa.r=0.000005;
aa.r=0.9;
//aa.s1overLB=1.*1e-03;
//aa.RB=(.5)*1e07;
//aa.noise=1.*(ran1(&idum)-0.5);

   aa.s1overCH=(3.0)*1e11; //para cerca de 2000
   aa.s1overLB=1.*1e-04; // con 7, 2000, con 14, 2700
   aa.s1overLG=(0.0018); //aqui entra, en el denominador, el parametro . 0.1 9000-0.5 4000-1 2900
   aa.RB=(.9)*1e07;
   aa.rdis=(5)*(100000.);
```

```
   aa.noise=.7*(ran1(&idum)-0.5);
}

   t++;

}
fprintf(stderr,"samporote\n");

   free(a);
   free(bf);
   free(bb);
   free(cf);
   free(cb);
   free(df);
   free(db);

} //el ciclo nuevo ikp
}//el ciclo nuevo ik


}
```

6.8 Programas de Adquisición de MATLAB

En esta sección se copian los programas de adquisición de las distintas variables fisiológicas reportadas en esta tesis.

6.8.1 Adquisición de Presión y actividad electromiográfica (EMG)

AVIMAT_v2017_01_3.m

```
%%%
```

```
        end
  end
  %  wait(AI,tiempo_file+1) %espera que que se termine la adquisición
    channels=getdata(AI); %guarda los datos en la variable
    stop(AI)
%--------------------------------------------------------------------------
  vs1 = channels(1:fin,2);
  vs2 = channels(1:fin,3);
  pressure = channels(1:fin,4); %me quedo con los datos que sirven
  sound = channels(1:fin,1);
  delete(AI);
  clear AI channels;
%--------------------------------------------------------------------------
    %para dar nombre a los archivos
    n=n+1;
     cuando=fix(clock);
     fecha=[num2str(cuando(1),'%02i'),'-',num2str(cuando(2),'%02i'),'-',num2str(cuando(3),'%02i')];
     hora=[num2str(cuando(4),'%02i') '.' num2str(cuando(5),'%02i') '.' num2str(cuando(6),'%02i')];
     carpeta=[carpeta_base,'\',fecha];

     if (length(dir(carpeta))==0)
         mkdir(carpeta);
     end
     name_s=[carpeta '\' 's_' nombreave '_' fecha '_' hora '_']; %ACÁ VAN LOS NOMBRES INTERCAMBIADOS(chanchada)
     name_p=[carpeta '\' 'p_' nombreave '_' fecha '_' hora '_'];
     name_vs1=[carpeta '\' 'vs1_' nombreave '_' fecha '_' hora '_'];
     name_vs2=[carpeta '\' 'vs2_' nombreave '_' fecha '_' hora '_'];
     grab=[nombreave '_' hora]
     s=int2str(n);   %pase de numero a string
     filename_s=[name_s,num2str(s,'%03i'),'.wav']; %genera el nombre del archivo de sonido
     filename_p=[name_p,s,'.wav']; %genera el nombre del archivo de presion
     filename_vs1=[name_vs1,s,'.wav']; %genera el nombre del archivo de vs1
     filename_vs2=[name_vs2,s,'.wav']; %genera el nombre del archivo de vs2
     %filenamed_s=[name_s,s,'.dat'];
     %filenamed_p=[name_p,s,'.dat'];
if length(sound)>SampleRate*1.5 %para que grabe files de mas de 1.5 seg

     wavwrite(normalizaruncanal(sound),SampleRate,filename_s); % saves as .wav files
end
     wavwrite(normalizaruncanal(pressure),44150,filename_p); %normalized
     wavwrite(normalizaruncanal(vs1),44150,filename_vs1); %normalized
     wavwrite(normalizaruncanal(vs2),44150,filename_vs2); %normalized
     %dlmwrite(filenamed_s,son,'delimiter','\t','precision',6)
     %dlmwrite(filenamed_s,pre,'delimiter','\t','precision',6)
 % end

 %chequea si ya terminò el tiempo màximo que se puso para madir
 if(etime(clock,t_start)<=tiempo_medir)
     seguir=1;
 else
     seguir=0;
 end
end
beep
```

%%%

```
end

%%%
```

```
% uiwait(handles.figure1);


% --- Outputs from this function are returned to the command line.
function varargout = Programa_OutputFcn(hObject, eventdata, handles)
% varargout  cell array for returning output args (see VARARGOUT);
% hObject    handle to figure
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Get default command line output from handles structure
varargout{1} = handles.output;

%%%
```

```
% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%       See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'), get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end



function txt_Nrep_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to txt_Nrep (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject,'String') returns contents of txt_Nrep as text
%        str2double(get(hObject,'String')) returns contents of txt_Nrep as a double


% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function txt_Nrep_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to txt_Nrep (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%       See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'), get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end



function txt_tiempo_file_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to txt_tiempo_file (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Hints: get(hObject,'String') returns contents of txt_tiempo_file as text
%        str2double(get(hObject,'String')) returns contents of txt_tiempo_file as a double


% --- Executes during object creation, after setting all properties.
function txt_tiempo_file_CreateFcn(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to txt_tiempo_file (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    empty - handles not created until after all CreateFcns called

% Hint: edit controls usually have a white background on Windows.
%       See ISPC and COMPUTER.
if ispc && isequal(get(hObject,'BackgroundColor'), get(0,'defaultUicontrolBackgroundColor'))
    set(hObject,'BackgroundColor','white');
end


% --- Ejecuta el llamado para hacer las mediciones en el experimento.
% Utiliza las variables 'txt_basefolder' para determinar la carpeta base,
% 'txt_repet', para obtener el numero de repeticion, 'txt_Nrep' para
% obtener el numero de veces de repeticion de cada estimulo y
% 'txt_tiempo_file' para el tiempo de cada file. Con eso, llama a cada uno
% de los subscripts que hacen cada parte:
% * namegen.m -> toma las variables y genera el nombre de la carpeta
% * crealista.m -> generador de la lista de estimulos a presentar y
% 'estimulos.txt'. !NOTA: esta version quedo igual que estaba antes, me
% estoy centrando en poner todo en la GUI antes de modificar mucho las
% subrutinas involucradas.
%
function pbGo_Callback(hObject, eventdata, handles)
%if isempty(daq.getDevices)==1
%    msgbox('No se detectaron dispositivos DAQ en el sistema', 'Error', 'error')
%    return
% end
par.base_folder=get(handles.txt_basefolder,'String');
par.repeticion=str2double(get(handles.txt_repet,'String'));
par.Nrep=str2double(get(handles.txt_Nrep,'String'));
par.tiempo_file=str2double(get(handles.txt_tiempo_file,'String'));
[status,exp.foldername]=namegen(par);
% Chequeo si se pudo crear el directorio nuevo o no
if status==0 % Si no se creo....
    return   % No ejecuta nada mas
end
[par.stimulus_folder,exp.estimulos,exp.lista]=crealista(par,exp.foldername);
acquiredata(par,exp,handles);
% hObject    handle to pbGo (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)


% --- Executes on button press in pbTest.
function pbTest_Callback(hObject, eventdata, handles)
%if isempty(daq.getDevices)==1
%    msgbox('No se detectaron dispositivos DAQ en el sistema', 'Error', 'error')
%    return
% end
par.base_folder=get(handles.txt_basefolder,'String');
par.Nrep=1;
[par.stimulus_folder,exp.estimulos,exp.lista]=crealista_test(par);
presentdata(par,exp);


% hObject    handle to pbTest (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)
```

```
% --- Executes on button press in pbEspontanea.
function pbEspontanea_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to pbEspontanea (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)
%if isempty(daq.getDevices)==1 || isempty(daqhwinfo.InstalledAdaptors)==1
%    msgbox('No se detectaron dispositivos DAQ en el sistema', 'Error', 'error')
%    return
par.base_folder=get(handles.txt_basefolder,'String');
par.repeticion=str2double(get(handles.txt_repet,'String'));
par.tiempo_file=str2double(get(handles.txt_tiempo_file,'String'));
acquirespdata(par,handles)

% --- Executes on button press in pbAbort.
function pbAbort_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to pbAbort (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)



% --- Executes on button press in aquirestimuli.
function aquirestimuli_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject    handle to aquirestimuli (see GCBO)
% eventdata  reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles    structure with handles and user data (see GUIDATA)
par.base_folder=get(handles.txt_basefolder,'String');
par.repeticion=str2double(get(handles.txt_repet,'String'));
par.tiempo_file=str2double(get(handles.txt_tiempo_file,'String'));
acquirestimuli(par,handles)


%%%
```

```
  delete(ai);
  clear ai ao;
%%%
```

```
% number of bands of our image (should be 3 because it's RGB)

nBands = get(video, 'NumberOfBands');
% create an empty image container and show it on axPreview

imagen = image(zeros(imHeight, imWidth, nBands), 'parent', ejes);

%UNTITLED Summary of this function goes here
%   Detailed explanation goes here


end

%%%
```

```
%-----------------------------------------------------------------------
carpeta_estimulos= [carpeta_base '\' 'estimulos']; % defino la subcarpeta donde se encuentran los estimulos
lista=dir(fullfile(carpeta_estimulos,'*.wav')); %chequea por estimulos en formato 'txt' y los lista
n=length(lista); %cantidad de estimulos que se encuentran en la carpeta al momento de empezar el exp
N=zeros(1,n);
Ntot=0; %Ntot=contador de cuÃ¡ntos estÃmulos se van presentando en la cadena
while(Ntot<(n*Nrep)) % !!!! acÃ¡ cambio la cantidad de estÃmulos que quiera presentar
for i=1:(n+1)
intervalo(i)=(i-1)/n;
end
r=rand; % Nos quedamos con rand nomÃ s?
j=n+1;
while(r<intervalo(j))
   j=j-1;
end
if(N(j)<Nrep)
estimulo_selec(Ntot+1)=j; % aca habria que abrir el archivo respectivo
N(j)=N(j)+1;
else
   N(j)=N(j);
end
Ntot=sum(N);
end
%N %chequeo el N
%estimulo_selec %chequeo la cadena al azar
cd(carpeta_mediciones)
fin=fopen('estimulos.txt','w');
for i=1:Ntot
   fprintf(fin, '%d\t %s\n',estimulo_selec(i), lista(estimulo_selec(i)).name);
end
fclose(fin);
clear n j; %libero variables
cd(carpeta_base)
%-----------------------------------------------------------------------
% Listo generaciÃ³n de cadena                                          %
%-----------------------------------------------------------------------
%-----------------------------------------------------------------------
% 2. Seteo los parÃ¡metros de las mediciones                           %
%-----------------------------------------------------------------------

t_start=clock;
n=1;

daqreset % Importante resetear el daq antes de arrancar.

%-----------------------------------------------------------------------
% Seteo el input
%-----------------------------------------------------------------------
while(n<Ntot+1) %DA EL Nï¿½MERO DE ARCHIVOS TOTALES A GRABAR

    ai = analoginput('nidaq','Dev1');    % set the device

    Duration         =  tiempo_file;
    SampleRate       = 20000;       % en Samples/sec (S/s)
    SamplesPerTrigger = Duration * SampleRate;   % number of total Samples

%-----------------------------------------------------------------------
  addchannel(ai, 0);
  set(ai, 'SampleRate',       SampleRate);
  set(ai, 'SamplesPerTrigger', SamplesPerTrigger);
  ai.TriggerType = 'Immediate'; %asegura que el input empiece cuando se manda el comando START
  ai.ExternalTriggerDriveLine = 'RTSI0'; %Set the analog input system to signal on RTSI line 0 when it starts.
                                % serÃ¡ 0 porque el ejemplo usa
                                % canal 0?
  ai
%-----------------------------------------------------------------------
% Seteo el output
%-----------------------------------------------------------------------
%---------- Leo el archivo que corresponda
nombre_estimulo=lista(estimulo_selec(n)).name;
cd(carpeta_estimulos);
[output_signal,fs]=wavread(nombre_estimulo);
cd(carpeta_base);
%---------- Seteo parÃ¡metros (canales, trigger, samplerate)
ao=analogoutput('nidaq','Dev2');
addchannel(ao,0);
ao.SampleRate = fs;
ao
ao.TriggerType = 'HwDigital'; % Recibe el trigger de una lÃnea de hardware (RTSI0)
ao.HwDigitalTriggerSource = 'RTSI0';
ao.TriggerCondition = 'PositiveEdge'; % triggerea al comienzo del pulso
%-----------------------------------------------------------------------
% Arranco la placa, notar que el output se arranca antes que el input
%-----------------------------------------------------------------------
%Primero : asegurarse que el output arranca en 0
putsample(ao,0)
%Segundo : mando la seÃ±al al buffer de salida
putdata(ao,output_signal)
% Tercero: comienza la adquisiciÃ³n
start(ao)
start(ai)

  [data, time] = getdata(ai);
  %[data2, time2] = getdata(ao); esto queda para ver como testeamos
  wait([ai,ao],2) % espera a que termine
  stop(ai)
  stop(ao)
%-----------------------------------------------------------------------
  channel0 = data(:,1);
  delete(ai);
  clear ai ao;
%-----------------------------------------------------------------------
% Escribo el archivo
```

```
%-------------------------------------------------------------------------
    a=int2str(estimulo_selec(n));
    s=int2str(n);   %pase de numeri a string
    nombrearchiv=['trigger','n_',s,'_estimulo_',a,'.dat']
    cd(carpeta_mediciones)
    file=fopen(nombrearchiv,'w');
    for i=1:SamplesPerTrigger
    fprintf(file,'%d\n',channel0(i));
    end
    fclose(file)
    cd(carpeta_base)

    n=n+1;
end

beep

%%%
```