



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Física

Biomecánica y circuitos neuronales de control motor en el canto de aves oscinas

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

Lic. Santiago Boari

Directora de tesis: Ana Amador

Consejero de estudios: Gabriel B. Mindlin

Lugar de trabajo: Laboratorio de Sistemas Dinámicos, Departamento de Física,
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2019

Fecha de defensa: 28/03/2019

Biomecánica y circuitos neuronales de control motor en el canto de aves oscinas

Resumen

Las aves canoras son un modelo animal por excelencia para el estudio del aprendizaje y la producción vocal. Estas aves aprenden sus vocalizaciones a partir de la imitación de un tutor y poseen estructuras en el cerebro - denominadas núcleos neuronales - que presentan funciones relacionadas con el aprendizaje, producción, mantenimiento y percepción del canto propio (el “sistema neuronal del canto”). El núcleo neuronal cortical HVC presenta un rol sensorimotor, integrando la vía motora del canto y recibiendo información auditiva altamente procesada. Más aún, se ha mostrado previamente que la respuesta de las neuronas de HVC a la presentación de la grabación del canto propio del ave presenta un patrón de actividad similar que el registrado durante la producción del canto.

En esta tesis se presentan experimentos de electrofisiología en los cuales se estudió la respuesta auditiva en el núcleo neuronal HVC, buscando comprender características de la codificación neuronal del canto. Los experimentos realizados en diamantes mandarines (*Taeniopygia guttata*) estudiaron la intensidad relativa de la respuesta frente a cantos sintéticos en comparación con la respuesta generada por presentaciones del canto propio. En estos experimentos se estudió, en primer lugar, la respuesta ante cantos sintetizados con un modelo de baja dimensión para la biomecánica del órgano fonador. En segundo lugar, se estudió la respuesta de las neuronas ante modificaciones del canto natural, dadas por la inversión temporal de la envolvente de las sílabas del canto. En ambos casos, las respuestas en el núcleo telencefálico HVC resultaron ser una buena herramienta para estudiar la codificación neuronal de estímulos auditivos complejos.

La segunda parte de esta tesis está enfocada en un debate actual sobre la codificación neuronal del canto en aves oscinas. Por un lado, estudios previos han propuesto que el núcleo neuronal HVC presenta actividad continua durante el canto, generando así la “cadena del tiempo” del programa motor. Sin embargo, por otro lado existen evidencias experimentales recientes que han desafiado esta visión, atribuyendo a HVC la codificación de instancias significativas durante el canto. Este debate generó una nueva conceptualización sobre el funcionamiento del sistema neuronal del canto en canarios (*Serinus canaria*), a partir del modelado de la arquitectura de circuitos neuronales involucrados y sus respectivas dinámicas en la generación de los patrones motores necesarios para la producción del canto. Este marco teórico (*modelo de gestos*) realiza predicciones precisas y refutables respecto de la actividad del núcleo HVC durante la producción de los distintos tipos de sílabas en el repertorio del canario. En esta tesis, se realizaron experimentos electrofisiológicos *in vivo* para poner a prueba las hipótesis elaboradas con el modelo teórico. A diferencia de los experimentos en diamantes mandarines, se buscó un observable que representase la actividad neuronal a gran escala. En particular, se estudió el potencial de campo local (o LFP) y se estableció su relación con la actividad - individual y colectiva - de las neuronas del núcleo telencefálico HVC.

Los registros mostraron que la actividad neuronal en el núcleo está correlacionada espacialmente y que las respuestas auditivas al canto propio presentan patrones de excitación marcada en instancias específicas del canto, apoyando las hipótesis propuesta por el *modelo de gestos*. En particular, se encontraron oscilaciones en la actividad neuronal, con una respuesta sincronizada en frecuencia y fase durante distintos segmentos de los cantos presentados. Notablemente, la frecuencia de las oscilaciones

del LFP coincide con la tasa silábica del canto. Las instancias encontradas en los LFP coinciden con lo observado en los perfiles de actividad conjunta de múltiples neuronas, así como en la actividad de neuronas individuales. Estos fenómenos conforman evidencia de la codificación neuronal de instancias significativas del canto en HVC, y permiten evaluar las predicciones del modelo de arquitectura de los circuitos neuronales, en particular para un tipo de sílabas en el repertorio del canto de canarios. Por todos estos motivos, estos hallazgos presentan una nueva perspectiva en el estudio de la codificación neuronal, del procesamiento auditivo del canto y su relación con la producción vocal en aves canoras.

Biomechanics and neural circuits of motor control in birdsong

Abstract

Songbirds are an animal model of choice for the study of vocal production and learning. These birds, which learn their vocalizations by imitation of a tutor have brain structures - called neuronal nuclei - functionally related to the learning, production, maintenance and perception of their own song (the “song system”). Cortical neuronal nucleus HVC has a sensorimotor role, integrating the song motor pathway and receiving highly processed auditory information. Moreover, it has previously been shown that the auditory response of HVC neurons to a recording of the bird’s own song has a pattern of activity similar to that recorded during song production. This thesis presents electrophysiology experiments in which auditory responses were studied at neural nucleus HVC, seeking to understand features of the neural coding of song. Experiments on zebra finches (*Taeniopygia guttata*) studied the relative response strength to synthetic songs compared to the response elicited by the bird’s own song. In these experiments, the response to songs synthesized using a low-dimensional model for the biomechanics of the vocal organ was studied. Secondly, the study focused on the neural response to changes in the natural song, given by the temporal inversion of the envelope of song syllables. In both cases, responses in the telencephalic nucleus HVC proved to be a powerful tool to study the neural coding of complex auditory stimuli.

The second part of this thesis is focused on a current debate on the neural coding of birdsong. On the one hand, previous studies have proposed that nucleus HVC presents continuous activity during singing, thus generating the “time frame” for the motor program. On the other hand, recent experimental evidence has challenged this vision, attributing HVC with the coding of significant song instances. This debate triggered a new conceptualization for the functioning of the song system in canaries (*Serinus canaria*), given by a neural architecture model of the circuits of neural nuclei involved and their respective dynamics in the production of song. This theoretical framework (*gestures model*) makes precise and testable predictions regarding the activity of HVC during the production of the different syllable types found in the canary repertoire. In this thesis, *in vivo* electrophysiology recordings were conducted to test the hypotheses given by the theoretical framework. Unlike experiments in zebra finches, an observable to study large-scale neuronal activity was sought. Therefore, the local field potential (or LFP) was studied, as well as its relationship with the activity of the neurons - both individually and globally - in telencephalic nucleus HVC.

The recordings showed that neural activity is spatially correlated and that the auditory responses to the bird’s own song present patterns of excitation during specific instances of the song, thus providing support for the hypotheses given by the *gestures model*. In particular, oscillations of the neural activity were described, with frequency- and phase- locking responses during different segments of the songs. Remarkably, LFP oscillation frequency corresponds to the syllabic rate of song. Instances found in the LFPs coincide with features of the multiunit activity profile and also with the activity of individual neurons. These phenomena constitute evidence of the neural coding of significant instances of song in HVC, and allow to evaluate the predictions of the neural architecture model, in particular for a specific type of syllables in the canary song repertoire. For all of the above, these findings present a

new perspective in the study of the neural coding and of auditory song processing and its relationship with vocal production in songbirds.

Agradecimientos

Escribiendo esta tesis es imposible no ganar perspectiva de los últimos cinco años. Cada palabra contenida en estas páginas es un testamento a las incontables horas de trabajo que la hicieron posible. Los finales siempre son difíciles. Son momentos de quiebre, de transición. Un antes; y un después. El *durante* del final es siempre un momento de introspección. Es el momento de la perspectiva, de sopesar lo vivido y lo aprendido. El doctorado ha sido, sin lugar a dudas, una gran aventura. Una aventura que jamás habría sido posible sin el apoyo de las personas que me rodean y que día a día hacen que quiera ser una mejor versión de mí mismo y haga todo lo que esté a mi alcance para lograr mis objetivos. Como cualquier logro, sólo es relevante - y posible - al compartirlo. Por eso, un paso importante de este proceso es plasmar agradecimiento donde se debe.

A quien hizo posible esta aventura en primer lugar. Ana, mi directora, para quien no tengo más que palabras de infinita admiración, respeto y cariño. En mi tesis de licenciatura te llamé mi mentora; durante el doctorado no hice más que reforzar a cada paso tu imagen en ese rol. Gracias. Por la paciencia, por las pilas, por las preguntas, por el aguante, por ayudarme a crecer. Por todo.

A Gabo, por ser el mejor consejero (¡y no sólo de estudios!) que se puede tener. Por compartir siempre el trabajo con entusiasmo y pasión.

A la gente del labo que acompañó en garra y espíritu. A Gogui y Germán, “homies” por siempre. A Ceci (“Is this the real life?”). A Juan, Gonza y Javi. A todo el grupo, por hacer que en el trabajo haya día a día un ambiente en el cual compartir.

Esta tesis también fue posible gracias a todas las personas que me acompañaron durante estos años. A Lautu, por elegir compartir cada día conmigo. Por dejarme elegir compartir cada día con vos. Por decidir convertirme en mi familia. A mi familia, ¡por estar siempre!. A mamá y papá, Gabriela y Gustavo. Por enseñarme sobre las cosas importantes. Por acompañarme en cada paso. Por alegrarse de los triunfos y no darle importancia a las derrotas. A mis hermanos, Seba y Sofi, por enseñarme lo que significa ser un hermano mayor, y por llenarme de orgullo al verlos crecer. A los hermanos elegidos, Emilio y Naza, sin quienes la vida no tendría el mismo sabor. A Guada y Lucho, por encontrar la forma de estar, incluso a la distancia (y ojalá, ¡por más aventuras compartidas en el futuro!). A Flor, la socióloga que se animó a ir a por el mundo. A Sam, por la compañía, las risas, la confianza. A Belén, la compi de un curso que se convirtió en compi de la vida. A Pancho, por las charlas y los vinos. Estos años no habrían sido lo mismo sin vos.

A todos, y a muchos más. Gracias.-

*A los sueños,
que nunca falten.*

Abreviaturas y acrónimos

AUTO: canto sintético generado por una reconstrucción automática de los parámetros de un modelo de baja dimensión para la producción vocal.

BOS: canto propio del ave.

CON: canto conespecífico (de un ave de la misma especie)

SMP: sistema motor del canto. Conjunto de núcleos involucrados en la producción vocal.

EEG: electroencefalograma.

EMG: electromiografía.

GTE: instancia de transición de gestos.

HVC (nombre propio): núcleo neuronal sensorimotor en el cerebro de las aves canoras, involucrado en la producción del canto y en tareas de percepción auditiva.

IRR: irregularidad espectral.

LFP: potencial de campo local (del inglés, *Local Field Potential*). Medida de actividad neuronal.

LFP_{avg} : LFP promediado en ensayos.

MAP: perfil de actividad en respuesta al motivo de canto.

MOD: canto modificado (sílabas invertidas por envolvente).

MUA: Perfil de actividad multi-unidad (del inglés, *Multi-Unit Activity*). Medida de la actividad conjunta de múltiples neuronas.

RRS: intensidad relativa de respuesta.

RRV: variabilidad relativa de respuesta.

SC: espectroide central.

SNC: Sistema Nervioso Central.

REV: canto propio invertido temporalmente.

SYN: canto sintetizado por un modelo de baja dimensión de producción vocal.

P0,P2,P1,P1b: tipos silábicos en el canto de canarios, en orden creciente de tasa silábica.

RA: núcleo robusto del arcopallio. Núcleo al cual proyecta HVC como parte del SMP.

Índice general

Abreviaturas y acrónimos	IX
Índice general	XI
1 Introducción	1
1.1. Preámbulo	1
1.2. El estudio del canto de aves	1
1.3. Qué compone un canto	4
1.4. La física del canto de aves y los gestos motores	7
1.5. Registros neuronales	11
1.5.A. Descripción de técnicas de registro de actividad neurofisiológica . . .	11
Registros extracelulares de potenciales de acción	13
Potencial de campo medio (LFP) y su relación con actividad neuronal	14
1.6. Circuito neuronal del canto: organización en núcleos	19
1.6.A. HVC es un núcleo neuronal sensorimotor	20
1.6.B. La visión “de arriba hacia abajo”	22
1.6.C. Una visión integrada	23
1.7. Modelado del sistema del canto en canarios	24
1.7.A. El modelo “circular”	25
1.8. Sobre esta Tesis	30
2 Reconstrucción automática de gestos motores	33
2.1. Motivaciones	33
2.2. Métodos teóricos	34
2.2.A. Reconstrucción automática de gestos	34
2.3. Métodos experimentales	36
2.3.A. Sujetos experimentales	37
2.3.B. Estímulos	37
2.3.C. Cirugías	37
	XI

2.3.D.	Registros electrofisiológicos	38
2.3.E.	Análisis y procesamiento de señales neuronales	38
	Clasificación de espigas	38
	Cuantificación de la actividad	40
2.4.	Resultados	41
2.4.A.	Cantos sintetizados automáticamente	41
2.4.B.	Experimentos electrofisiológicos	43
2.5.	Discusiones	46
3	Codificación de la envolvente de sonido	49
3.1.	Motivaciones	49
3.2.	Métodos	50
3.2.A.	Análisis de sonido y modificaciones	50
	Modificación de la envolvente de sonido	50
	Características del timbre de los cantos	52
3.2.B.	Experimentos de electrofisiología	52
	Estímulos presentados	53
	Procesamiento y análisis de las señales neuronales	53
3.3.	Resultados	55
3.4.	Discusiones	59
4	Codificación del canto en HVC: mediciones de potencial de campo (LFP)	63
4.1.	Motivaciones	63
4.2.	Métodos	64
4.2.A.	El canto de los canarios	64
4.2.B.	Determinación del canto propio	67
	Sujetos experimentales	67
	Análisis de los cantos grabados	68
4.2.C.	Experimentos de electrofisiología	73
	Estímulos presentados	75
	Cirugías	75
	Registros electrofisiológicos	76
	Procesamiento y análisis de las señales	80
4.3.	Resultados	85
4.3.A.	El potencial de campo local promediado en ensayos	86
4.3.B.	El LFP captura respuestas al canto propio	86
4.3.C.	El LFP indica transiciones entre frases de canto	90

4.3.D.	El LFP presenta sincronización en frecuencia a segmentos de canto . .	94
4.3.E.	El LFP presenta sincronización en fase al estímulo	97
4.3.F.	Respuesta estructurada en frases	99
4.3.G.	Resultados agrupados	104
4.4.	Discusiones	108
5	Relación del LFP con la actividad de neuronas en HVC	115
5.1.	Motivaciones	115
5.2.	Métodos	116
5.2.A.	Actividad de múltiples neuronas	116
5.2.B.	Extensión de la actividad en la sonda	119
5.2.C.	Relación entre las señales de actividad neuronal	119
5.2.D.	Actividad de neuronas individuales en núcleo HVC	120
5.3.	Resultados	124
5.3.A.	La respuesta conjunta de múltiples neuronas	124
5.3.B.	Extensión y correlación espacial	126
5.3.C.	Relación MUA-LFP	132
	Correlación temporal de las señales	132
	Determinación de instancias prominentes	133
	Ejemplos de respuesta a P1 y P0	134
	Promediado en eventos	136
5.3.D.	Sincronización de múltiples unidades en HVC	143
5.3.E.	Actividad de neuronas únicas	144
	Pulsátiles (P1b)	146
	Oscilaciones (P1)	148
	Oscilaciones (P2)	148
	Sílabas tipo P0	150
5.4.	Discusiones	156
6	Conclusiones	161
7	Apéndices	167
7.1.	Sitios de penetración en HVC	167
7.2.	Sondas de registro	167
	Bibliografía	171

Introducción

1.1. Preámbulo

En esta tesis, el objetivo principal es el estudio de la codificación neuronal del canto en aves canoras. En el estudio de esta temática, esta tesis presenta una mirada a partir del enfoque neuroetológico (estudio del comportamiento animal y sus correlatos en el sistema nervioso). En este sentido, se considera que el comportamiento emerge de una delicada interacción entre el sistema nervioso central, el cuerpo y el medio ambiente. Al tratar la codificación neuronal de un comportamiento aprendido y complejo como es el canto, esta visión integradora es crucial. Por este motivo, en esta introducción se recopilan y desarrollan temáticas variadas en pos de representar conceptualmente el conjunto de las hipótesis que impulsan el trabajo experimental contenido en esta tesis. En particular, me enfocaré en conocimientos previos sobre la codificación del canto a nivel del sistema nervioso central, en el funcionamiento de la biomecánica del órgano fonador y en la integración entre las partes. Los experimentos que se desarrollan a lo largo de los capítulos consisten en mediciones electrofisiológicas de actividad neuronal, por lo cual también se introducen conceptos experimentales relevantes previo al desarrollo específico en cada capítulo.

1.2. El estudio del canto de aves

El estudio del canto de aves se estableció como modelo animal para estudiar vocalizaciones aprendidas a partir de mediados del siglo XX. Aunque no se pretende dar aquí una cuenta detallada de la historia del campo, propongo repasar algunos de sus hitos a lo largo de los últimos 60 años.

En la década de 1950, el invento del espectrógrafo de sonido (“sonógrafo”) y su uso en el laboratorio hizo posible obtener una representación objetiva del canto para estudiar la duración, amplitud y frecuencia de las vocalizaciones (Thorpe, 1954). En este trabajo seminal se utilizó por primera vez esta herramienta para obtener una visualización del canto, consolidando así una forma de registro que hiciera factible el estudio de las vocalizaciones. Lo que fue de particular impacto en este trabajo fue que Thorpe utilizó la - entonces novedosa - herramienta para estudiar la ontogenia del canto en pinzones (*Fringilla coelebs*).

Con el crecimiento del campo a partir del uso del sonógrafo, comenzaron a surgir estudios definiendo las etapas del aprendizaje (Marler, 1970; Marler & Tamura, 1964; Thorpe, 1958), junto a la identificación de procesos de aprendizaje motor y el rol de la experiencia y retroalimentación auditivas (Konishi, 1965a,b, 1978; Nottebohm, 1968; Slater, 1983). Con la construcción de un atlas del cerebro de los canarios domésticos (*Serinus canaria*) (Stokes et al., 1974), surgió una particular estrategia experimental para identificar funcionalidad en las distintas regiones del cerebro. Esta estrategia consistió en estudiar las variaciones en las vocalizaciones producidas por un ave en condiciones normales y compararlas con grabaciones luego de que se hubiera lesionado alguna región del cerebro. De esta manera, se logró una descripción de una serie de grupos localizados de tejido nervioso de alta densidad neuronal (núcleos neuronales), así como las proyecciones que unen dichos núcleos (Nottebohm et al., 1976). Este estudio sentó las bases de lo que hoy conocemos como el “sistema neuronal del canto”, y la estrategia de lesiones ha sido utilizada en numerosos estudios para entender el rol de las distintas partes del cerebro y en distintas especies de aves (por ej., Bottjer et al., 1984; Brainard & Doupe, 2000; Scharff & Nottebohm, 1991)).

El aprendizaje vocal, aunque un tema de sumo interés en sí mismo, hizo que el campo creciera enormemente. Esto se debe a que, de las aproximadamente 9000 especies de aves que conocemos hoy, unas 4000 especies corresponden a aves canoras u oscinas, que aprenden sus vocalizaciones (Kroodsma & Pickert, 1984). Este tipo de aprendizaje es una característica de rara ocurrencia en el reino animal, y que los humanos compartimos con cetáceos, algunas especies de murciélagos, las aves canoras, los loros y colibríes y los elefantes. Mientras que en algunas especies de primates no humanos se encuentra una asociación aprendida de vocalizaciones a distintos contextos, en las aves canoras se conjuga un modelo animal particularmente atractivo, ya que comparten con los humanos las características de un aprendizaje vocal mediado por la experiencia auditiva. Adicionalmente, las aves canoras son animales propicios para el estudio y manipulación en el laboratorio, convirtiéndolos así en el modelo animal por excelencia para el estudio de las bases neuronales del aprendizaje, mantenimiento, percepción y producción de vocalizaciones complejas.

En la década de 1980, Nottebohm mostró por primera vez la presencia de neurogénesis adulta en el cerebro de canarios (Goldman & Nottebohm, 1983). La neurogénesis adulta en sí misma era un tópico aún en debate, haciendo que las aves oscinas como modelo animal ganaran inclu-

so más atención de la comunidad científica. Adicionalmente, también mostró que los canarios presentan un aprendizaje abierto, incorporando nuevas vocalizaciones entre una primavera y la siguiente, y que este fenómeno tiene correlatos en la anatomía del cerebro, dado por el aumento de volumen del núcleo HVC (un núcleo cortical involucrado en la producción y la percepción del canto) (Nottebohm et al., 1986).

En la misma década, a partir de estudios de lesiones se mostró que existen núcleos involucrados específicamente en tareas de aprendizaje (Bottjer et al., 1984). Adicionalmente, Margoliash encontró un resultado de suma importancia: estudiando la respuesta al canto en gorriones de corona blanca (*Zonotrichia leucophrys*), mostró que existen neuronas selectivas al canto propio del ave en el núcleo HVC (Margoliash, 1983, 1986). Este fenómeno abrió las puertas a numerosos estudios - que incluso hoy - estudian la actividad selectiva de HVC. Entre otros motivos, la importancia de este fenómeno recayó en que las neuronas selectivas al canto propio podrían estar involucradas en el proceso de aprendizaje (Doupe & Konishi, 1991).

Desde entonces, la selectividad de neuronas en el núcleo HVC ha sido el foco de numerosos estudios, y una discusión más detallada tanto de las estructuras neuronales como de los resultados más importantes en esta línea se deja para una sección posterior, debido a su relevancia para los temas tratados en esta tesis (ver Sección 1.6).

Desde un punto de vista anatómico, las aves oscinas presentan la musculatura más compleja para el control de la siringe dentro del orden de las passeriformes, así como núcleos neuronales específicamente dedicados al aprendizaje, mantenimiento y producción del canto. En conjunto, esto les permite realizar vocalizaciones extremadamente complejas, presentando cantos elaborados y diversos. Los núcleos que conforman el sistema del canto en el sistema nervioso central (SNC) deben modular la actividad respiratoria y conjugar la actividad de una gran cantidad de músculos para ejercer el control motor del órgano fonador, la siringe. La siringe está compuesta por una estructura cartilaginosa que contiene al tejido que forma dos fuentes de sonido, cada una de las cuales consta de un par de labios que se ubican cerca de la unión tráqueo-bronquial. Este complejo está rodeado por seis pares de músculos que ejercen el control mecánico del órgano (Riede & Goller, 2010). Ambos lados de la siringe pueden actuar de manera sincronizada (Nowicki & Capranica, 1986) o actuar como una fuente sonora de manera independiente (Hartley & Suthers, 1990). La válvula vocal se forma por obstrucción del lumen bronquial cuando los labios se juntan debido a la acción de músculos aductores. Durante mucho tiempo, se creyó que las vibraciones de la membrana timpanoforme medial (MTM) actuaban como una fuente de sonido. Estudios de endoscopia mostraron que si bien la MTM es capaz de vibrar cuando existe un flujo de aire, no lo hace en el caso de la siringe de las aves canoras (Larsen & Goller, 1999). Un gran avance en la comprensión del funcionamiento de la siringe vino dado por estudios de la dinámica del proceso de fonación, a partir del modelado biofísico del aparato vocal. De esta manera, se estableció que el mecanismo de producción de sonido es a partir de la generación de oscilaciones

auto-sostenidas de las membranas que conforman los labios, análogo a lo que sucede para el caso de las cuerdas vocales humanas durante la generación de sonidos voceados (Gardner et al., 2001; Laje et al., 2002; Mindlin et al., 2003), (Laje & Mindlin, 2005; Mindlin & Laje, 2006).

La posibilidad de utilizar a las aves canoras como modelo animal para comprender cómo se reconfigura un cerebro en el proceso de desarrollo, aprendizaje y producción del comportamiento vocal - así como sus posibles aplicaciones para el caso humano - han convertido al estudio del control motor en canto de aves en un problema interdisciplinario. Dada la similitud en los procesos de producción de vocalizaciones y el aprendizaje a partir de un tutor adulto, el estudio de estos procesos en las aves ha conducido a avances en el conocimiento de aprendizaje en habla humana (Berwick & Chomsky, 2013; Bolhuis et al., 2010; Doupe & Kuhl, 1999; Kuhl, 2003). Adicionalmente, descubrimientos en humanos han generado nuevas áreas de investigación en el canto de aves, como el descubrimiento que un gen relacionado al desarrollo de áreas relacionadas con el habla (*FoxP2*) también se encuentra en núcleos relacionados con el canto en aves (artículo de revisión: (Fisher & Scharff, 2009)). Por esto, el campo se nutre de herramientas de múltiples disciplinas para dilucidar el funcionamiento del sistema (Catchpole & Slater, 2008). Para una comprensión completa del comportamiento, es esencial que las visiones logren converger en un modelo unificado de producción vocal.

1.3. Qué compone un canto

Las aves son capaces de distintos tipos de vocalizaciones. Los cantos son vocalizaciones complejas, típicamente producidas por los machos en temporada de apareamiento. Existen excepciones a esta regla, con especies de aves canoras en las cuales las hembras también cantan, incluso fuera de la temporada de apareamiento. En contraste, el otro tipo de vocalizaciones, las llamadas son vocalizaciones más cortas, simples y son producidas tanto por machos como hembras durante todo el año. Las llamadas ocurren típicamente en contextos funcionales, como exclamar una alerta, estado de alarma o durante el vuelo (Catchpole & Slater, 2008).

La complejidad de los cantos varía entre las distintas especies de aves canoras; mientras que algunas presentan un canto adulto altamente estereotipado y con muy poca variación como los diamantes mandarines (*Taeniopygia guttata*) o los gorriónes de corona blanca (*Zonotrichia leucophrys*), otras pueden realizar distintos tipos de canto o reorganizar las unidades básicas del canto en cada rendición, como los estorninos (*Sturnus vulgaris*), los ruiseñores (*Luscinia megarhynchos*) o los canarios (*Serinus canaria*), (Catchpole & Slater, 2008; Nottebohm et al., 1986).

En Figura 1.1 se muestran el canto de un diamante mandarín y de un canario doméstico. En la figura se adopta la representación espectrográfica del canto discutida en Sección 1.2, a partir de los sonogramas del canto. Un sonograma es una representación de la evolución temporal del contenido espectral de la señal de sonido: el eje horizontal es el tiempo, el vertical el eje de las

frecuencias, cuya intensidad relativa (en escala logarítmica, dB) está representada en una escala de colores (con * se muestra el análisis de Fourier de un segmento del canto). En este caso, la intensidad está representada con una escala de grises en la cual blanco es el mínimo valor de intensidad y negro el máximo. El cómputo del sonograma se realiza mediante la transformada de Fourier de tiempos cortos (STFT) para ventanas a lo largo de la señal sonora. En esta representación, la definición deseada para el espectro en frecuencias y la resolución temporal entran en juego. En procesamiento de señales, esto se conoce como el límite de Gabor (Gabor, 1946; Hall, 2006). Específicamente, esto significa que una señal no puede estar limitada en tiempo y frecuencia:

$$\sigma_t \times \sigma_f \geq \frac{1}{4\pi} \quad (1.1)$$

, donde σ_t y σ_f son las desviaciones estándares de los estimadores en tiempo y frecuencia, respectivamente. Un caso especial de Ecuación 1.1 en el que vale la igualdad (caso óptimo en análisis de tiempo-frecuencia) es cuando la ventana es Gaussiana. El uso de este tipo de transformadas y representaciones excede al campo de canto de aves, y es también aplicable a estudios de fonética y habla (Boersma & Van Heuven, 2001, Praat), así como análisis espectral de señales que varían en el tiempo. Salvo que se indique lo contrario, los sonogramas presentes en esta tesis estarán realizados con ventanas Gaussianas de 10 ms de duración. Dado que la ventana Gaussiana pone más peso a las muestras centrales, se puede aumentar la resolución temporal de la representación en el sonograma a partir de realizar un análisis con ventanas deslizantes, superponiendo muestras entre ventanas consecutivas. Los sonogramas mostrados en Figura 1.1, por ejemplo, fueron realizados superponiendo el 95 % de las muestras entre ventanas consecutivas, dando una traza de evolución temporal suave durante cada segmento del canto.

En esta representación, es sencillo describir las unidades que conforman el canto. Notar, en primer lugar, la diferencia de escalas antes mencionada: el canto de un diamante mandarín dura una fracción de tiempo muy pequeña respecto del canto de un canario. Los diamantes mandari- nes presentan un canto adulto estereotipado que, una vez cristalizado, mantienen durante toda su vida. En esta especie, los machos comienzan su canto con una serie de sílabas introductorias de corta duración seguidas de una secuencia de unidades de canto complejas (sílabas) que conforman el “motivo” de canto. Este motivo, si bien cristalizado, puede presentar leves variaciones dependiendo del contexto: canto dirigido a la hembra de ejecución estereotipada o canto espontáneo, con mayor variabilidad (Sossinka & Böhner, 1980).

Por otro lado, el canto del canario es de mayor duración y presenta mayor variabilidad que el caso del diamante mandarín. También en esta especie son los machos quienes cantan. El canto, en este caso, es una secuencia de frases. Las frases, a su vez están formadas por la repetición de unidades del canto, denominadas sílabas. Una sílaba, a su vez, puede estar formada por una

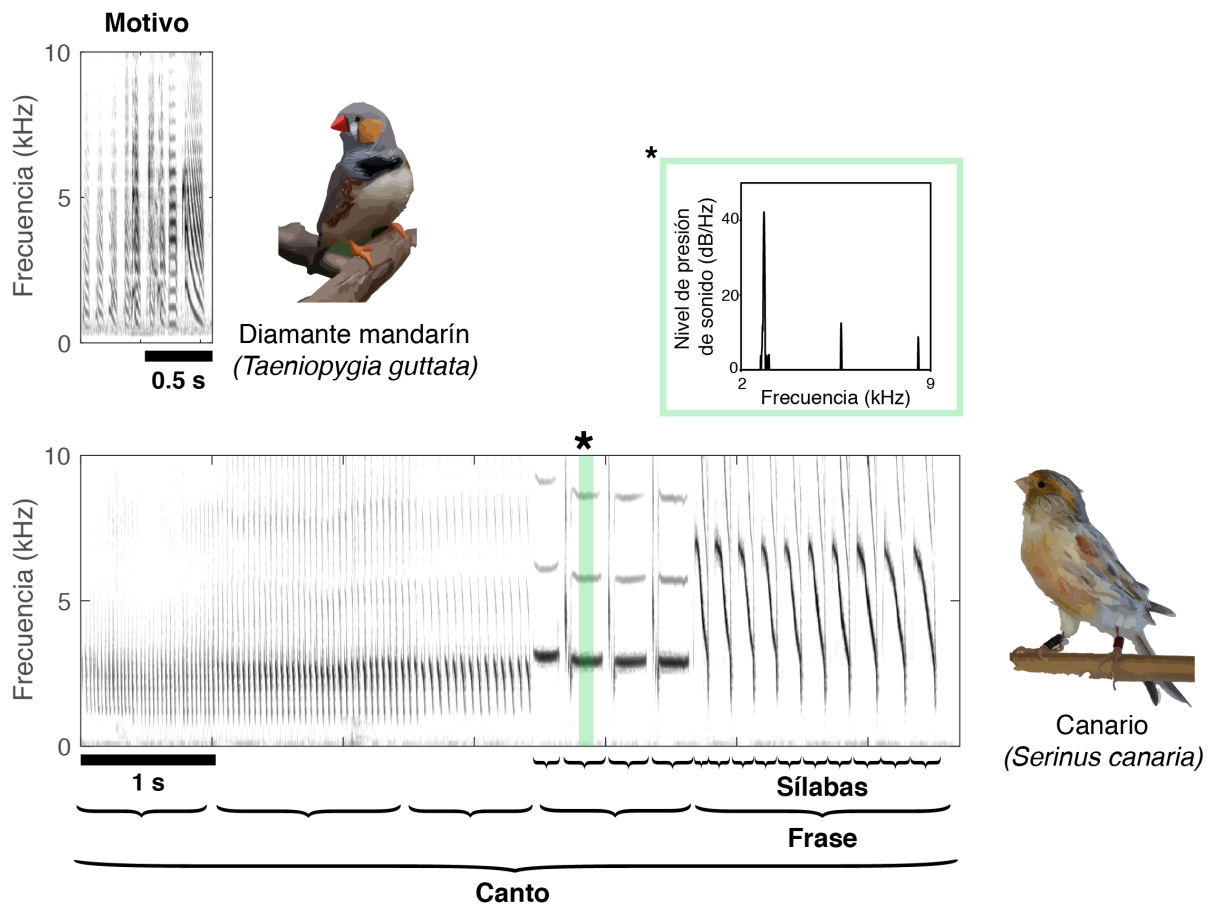


Figura 1.1: Cantos de dos especies de aves oscinas y su representación espectrográfica. Canto de un diamante mandarín (*Taeniopygia guttata*, panel superior) y de un canario (*Serinus canaria*, panel inferior). Un sonograma representa la evolución del contenido espectral del canto. El eje horizontal representa tiempo y el vertical es el dominio espectral. La intensidad relativa (en dB) está representada con una escala de grises (blanco: intensidad mínima; negro: intensidad máxima, ver detalles en texto). Una nota es una traza continua en la representación espectrográfica. Una sílaba (unidad del canto) puede estar conformada por una o más notas. Una frase de canto está formada por la repetición de una sílaba. Una secuencia dada de frases conforma un canto (canarios); una secuencia estereotipada de sílabas corresponde a un motivo de canto (diamantes mandarines). En diamantes mandarines, el motivo es invariable, mientras que los canarios pueden alterar la secuencia de frases en cada rendición. Recuadro: corte espectral del segmento marcado con (*).

o más notas (traza continua y suave en la representación espectrográfica). Los canarios pueden reorganizar las sílabas en su repertorio para vocalizar distintas secuencias de canto (Belzner et al., 2009; Markowitz et al., 2013; Nottebohm & Nottebohm, 1978) y existen cambios estacionales año a año en los cuales pueden incorporar nuevas. Estos cambios son modulados hormonalmente y esto provoca cambios anatómicos a nivel del sistema neuronal del canto (Nottebohm et al., 1986). Es interesante que los cambios hormonales puedan ser también desencadenados en las hembras de la especie: el tratamiento con testosterona en hembras adultas genera el crecimiento de núcleos de control vocal, haciendo que desarrollen canto similar al de un macho (Nottebohm, 1980).

1.4. La física del canto de aves y los gestos motores

Como se expuso anteriormente, comprender los mecanismos de producción del canto requiere conjugar conocimientos de múltiples disciplinas, abarcando los funcionamientos del órgano vocal y los circuitos neuronales que conforman el substrato del canto.

Para entender el funcionamiento del órgano vocal de las aves, la siringe, fue necesario tanto la descripción anatómica como el estudio de la dinámica de este sistema durante el canto. El canto es producido por la conjugación de patrones respiratorios con la acción de los músculos de la siringe. A partir de estudios de electromiografía (EMG), se estableció que los músculos dorsales están asociados al comienzo del comportamiento vocal, funcionando como mecanismos de apertura, mientras que la tensión de los músculos ventrales está correlacionada con la frecuencia de las vocalizaciones (Riede & Goller, 2010; Suthers et al., 1999). Las aves canoras pueden controlar cada par de labios para actuar como una fuente sonora independiente (Suthers, 1997) así como actuar de manera coordinada y sincronizada (Goller & Suthers, 1999). La estructura de la siringe puede mostrar un dimorfismo sexual entre los machos y las hembras de la especie, representando así la posibilidad de generar vocalizaciones más complejas en las especies que las presentan (Riede et al., 2010). La coordinación con patrones motores también juega un rol crucial en la posibilidad de producir segmentos de canto de larga duración (como el caso del canario, mostrado en Figura 1.1). Estudios de la presión de los sacos aéreos a partir de introducir una cánula y un transductor de presión mostraron que la producción de sílabas va acompañada de un gesto espiratorio. Adicionalmente, durante la producción de frases de larga duración, las aves realizan “mini-inspiraciones” entre una sílaba y la siguiente (Hartley & Suthers, 1990, 1989). A nivel del tracto vocal superior, se encontró que las aves utilizan la cavidad orofaríngea-esofágica como cámara de resonancia, y que son capaces de sintonizar todo el tracto al rango de frecuencias fundamentales del canto (Riede et al., 2006).

Desde la Física y en particular, la Biomecánica, uno de los aportes a la problemática estuvo enfocado en comprender, a partir de experimentación y modelado, los mecanismos básicos

de funcionamiento del órgano vocal. La conjugación de los gestos de presión con la actividad muscular genera la vibración de los labios de la siringe. Estas vibraciones, que modulan el flujo de aire, presentan una dinámica de alta complejidad a partir de oscilaciones auto-sostenidas. En este tipo de oscilaciones, la pérdida de energía debido a la fricción es compensada en cada ciclo a partir del traspaso de energía del flujo de aire hacia las membranas, generando una onda de propagación ascendente en éstas (Mindlin & Laje, 2006). Modelar el funcionamiento de este órgano vocal complejo puede parecer desalentador, teniendo en cuenta la cantidad de variables que podrían ser necesarias para describir la dinámica subyacente. Sin embargo, trabajos previos de modelado de las cuerdas vocales en humanos ya habían sentado las bases para describir la generación de oscilaciones a partir de un flujo de aire en una membrana (Titze & Martin, 1998). En esta descripción se separan los movimientos en dos modos: oscilaciones laterales de la membrana y un movimiento de “aleteo”. El primer tipo de dinámica describe a los labios como dos masas de tejido alejándose o acercándose entre sí. El aleteo está conformado, en cambio, por la formación de perfiles convergentes o divergentes cuando los labios están alejándose o acercándose entre sí, respectivamente. Esta dinámica captura la generación de las oscilaciones auto-sostenidas en los labios, y es compatible con observaciones de endoscopía de las vibraciones de las membranas durante el canto (Fee et al., 1998; Goller & Larsen, 2002).

El modelo computacional para la producción del canto de aves consiste en ecuaciones que describen la dinámica de la separación entre los labios de la siringe y el procesamiento de la señal generada por la fuente sonora por parte del tracto vocal (Amador & Mindlin, 2008; Mindlin & Laje, 2006; Perl et al., 2011). Este es un modelo de dinámica no lineal de baja dimensión, en la cual los parámetros libres están relacionados con la tensión en los músculos que rodean la siringe (k_1) y la presión de los sacos aéreos (p_{sub}). La dinámica del órgano fonador puede describirse a partir de las ecuaciones de Newton para cada labio, cada uno de los cuales se plantea como un tejido elástico capaz de desplazamientos laterales y de sostener ondas longitudinales. Esto permite realizar el cálculo de la presión entre los labios, un paso esencial en la derivación de las ecuaciones físicas del movimiento. El sistema de ecuaciones puede ser reducido a un sistema más simplificado de ecuaciones o “forma normal” (Guckenheimer & Holmes, 2013). Una forma normal de un sistema representa el mínimo conjunto de ecuaciones no lineales capaz de reproducir los comportamientos encontrados en el sistema original. En efecto, el sistema mostrado en Ecuación 1.2, Ecuación 1.3 presenta regímenes dinámicos equivalentes a los del sistema original (Sitt et al., 2010). Las ecuaciones del modelo simplificado son:

$$\frac{dx}{dt} = y \tag{1.2}$$

$$\frac{dy}{dt} = \alpha\gamma^2 - \beta\gamma^2x - \gamma^2x^3 - \gamma x^2y + \gamma^2x^2 - \gamma xy \tag{1.3}$$

, donde x representa la posición de los labios siríngeos y, por lo tanto, describe la dinámica de una fuente de fonación. γ es un parámetro de escala, estático y los parámetros adimensionales α y β son dependientes del tiempo. Éstos están relacionados con la presión de los sacos aéreos y la tensión labial de la siringe, respectivamente (variables que el ave puede controlar durante el canto). De esta manera, los parámetros dependientes del tiempo en el modelo pueden ser contrastados con medidas fisiológicas que los animales controlan durante el canto (Mindlin et al., 2003; Perl et al., 2011; Zysman et al., 2005). A este modelo para la fuente sonora se le agrega el filtrado dado por el tracto vocal superior: la tráquea, modelada como una serie de tubos interconectados y la cavidad orofaríngea-esofágica, modelada como un resonador de Helmholtz, (Perl et al., 2011). De esta manera, el sonido generado a nivel de la fuente sonora es filtrado por el tracto vocal hasta convertirse en un sonido vocalizado.

En la figura Figura 1.2 se muestra un ejemplo de canto sintetizado a partir de la integración numérica de las ecuaciones de forma normal. En (a) se muestra el sonograma de un canto de diamante mandarín, y en (b) el sonograma del canto sintetizado. En (c) se muestran las trazas temporales de (α, β) que impulsan las distintas soluciones que permiten reproducir la frecuencia fundamental y el contenido espectral del canto original. Cada traza continua en estos parámetros es denominada como un gesto motor. Sus extremos, denominados GTE corresponden a discontinuidades en las trazas, o a transiciones entre las distintas soluciones. Para el canto sintetizado en este ejemplo, se ajustó el par (α, β) a cada segmento del canto.

La razón por la que este sistema dinámico simple puede explicar muchos de los sonidos presentes en los cantos de diamantes mandarines es que a pesar de ser una versión simplificada del modelo físico, las ecuaciones de forma normal mantienen los mismos tipos de bifurcaciones que dan lugar tanto a sonidos tonales (oscilaciones que nacen con frecuencia definida y amplitud nula, bifurcación de Hopf) como a sonidos de alto contenido espectral (oscilaciones del tipo excitable, que nacen con amplitud finita y frecuencia nula, nodo silla en ciclo límite, SNILC). De esta manera, el proceso dinámico en el que se genera un régimen oscilatorio determina la relación entre el contenido armónico de la señal y su frecuencia. Con estos distintos mecanismos para el nacimiento de oscilaciones, se ha podido reproducir el repertorio de canarios (Gardner et al., 2001, *Serinus canaria*), chingolos (Laje et al., 2002, *Zonotrichia capensis*), zorzaes (Mindlin et al., 2003, *Toxostoma rufum*) y diamantes mandarines (Amador & Mindlin, 2008, *Taeniopygia guttata*). En particular, el mecanismo de la bifurcación de Hopf permite obtener a partir del modelo sonidos tonales como los encontrados típicamente en el canto de canarios, mientras que las oscilaciones nacidas en una bifurcación de nodo-silla en ciclo límite permite obtener sonidos espectralmente ricos, como los encontrados en el canto de los diamantes mandarines.

El modelo utilizado para la fuente sonora se ha caracterizado ampliamente, por ejemplo, mostrando que las oscilaciones nacidas en una bifurcación SNILC dan lugar a sonidos cuyo contenido armónico (espectral) y frecuencia fundamental obedecen a relaciones específicas (Sitt

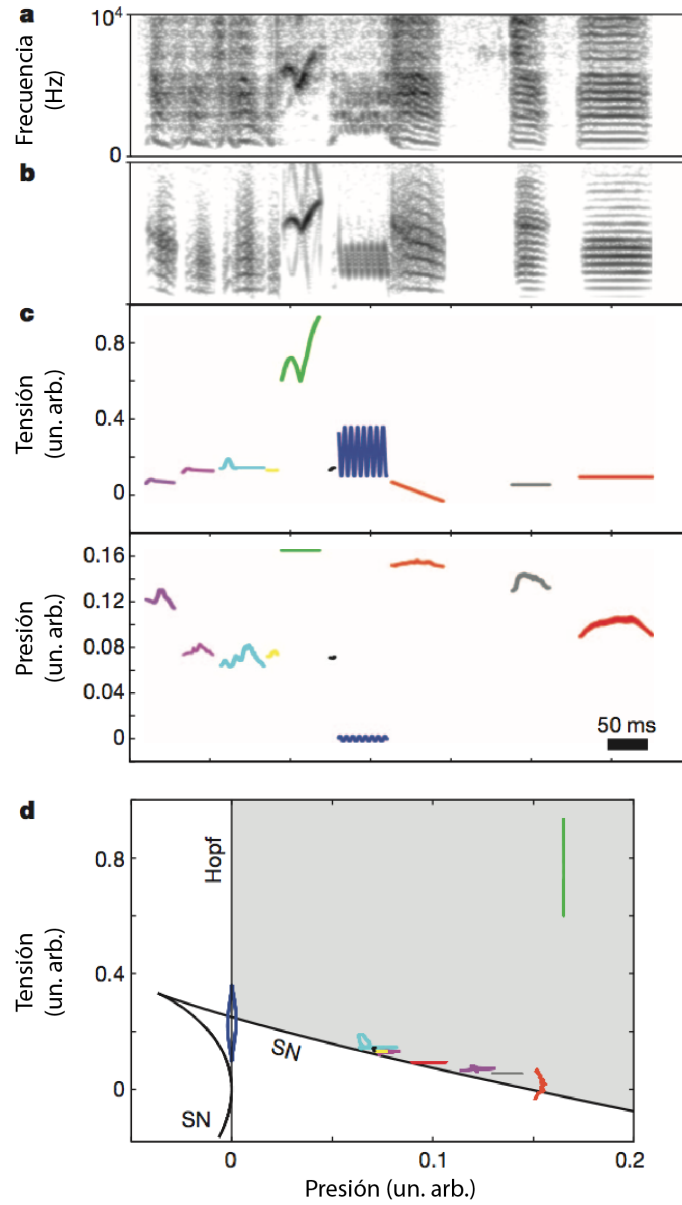


Figura 1.2: Ejemplo de canto sintetizado (adaptado de (Amador et al., 2013)). En (a) se muestra el sonograma del canto original, en (b) el sonograma del canto sintetizado a partir del modelo. En (c) y (d) se muestran las instrucciones motoras, dadas por $\alpha(t)$ y $\beta(t)$ (parámetros relacionados con la presión en los sacos aéreos y la tensión en los labios de la siringe, respectivamente). Estos parámetros dependientes del tiempo son ajustados a cada segmento del canto original para poder reproducir soluciones que tengan la misma frecuencia fundamental y contenido espectral que el canto original. En (e) se muestra el diagrama de bifurcaciones del modelo, y las trayectorias en el espacio de parámetros de las trazas mostradas en (c). Notar que la mayoría de estas trazas están en la cercanía de una bifurcación de nodo silla en ciclo límite, debido a que corresponden a fonación con alto contenido espectral.

et al., 2008). Esta relación se observó empíricamente en las vocalizaciones de los diamantes mandarines que contienen sonidos de baja frecuencia (frecuencia fundamental ≤ 1.2 kHz). De esta manera, un paso preliminar para el procedimiento de reconstrucción de los gestos motores involucrados consistió en generar una base de datos donde, para diferentes valores de los parámetros (α, β) , se enumere la frecuencia fundamental ω y el índice de contenido espectral (SCI, centroide normalizado a la frecuencia fundamental, ver (Sitt et al., 2008)). Esta base de datos fue generada a partir de la integración de las ecuaciones del modelo completo (fuente de sonido no lineal y filtros lineales (Perl et al., 2011)) para cada punto (α, β) en el espacio de parámetros en la región de interés. Este proceso requiere de un ajuste de las ecuaciones del modelo a cada segmento del canto (para más detalle, ver Capítulo 2). Para una revisión reciente sobre el modelado de producción de canto de aves y su extensión para incluir la física del sonido generado por vórtices, ver (Mindlin, 2017).

La descripción del funcionamiento del órgano vocal en términos de un sistema no lineal de baja dimensión proveyó una herramienta poderosa en el estudio del canto de aves. En primer lugar, permitió explicar los principios físicos del funcionamiento de las fuentes de sonido (oscilaciones auto-sostenidas de las membranas). Esto permitió mostrar que, en gran medida, la riqueza de los sonidos producidos por las aves emerge como una consecuencia de las propiedades dadas por la dinámica del aparato vocal (Amador & Mindlin, 2008; Gardner et al., 2001). Estos avances significativos en el entendimiento de la producción del canto llevó a formular una conjetura que podría tener un impacto profundo en cómo se conceptualizan los mecanismos del control motor: **si gran parte de la complejidad del comportamiento emerge a nivel de la periferia, ¿es posible que un programa motor “simple” a nivel del SNC esté impulsando al órgano fonador, y que sea este, mediante su rica dinámica el que aporta gran parte de la complejidad en el comportamiento?**. En gran medida, el trabajo de esta tesis está embebido en esta línea de pensamiento.

1.5. Registros neuronales

1.5.A. Descripción de técnicas de registro de actividad neurofisiológica

El interés por entender el funcionamiento del sistema nervioso central ha implicado el desarrollo de múltiples técnicas para sondear su actividad. Dentro del conjunto de técnicas, la electrofisiología es una rama que se centra en medir la actividad eléctrica de células y tejidos. Sus orígenes pueden trazarse hasta las observaciones de Luigi Galvani en el siglo XVIII, cuando descubrió que una chispa podía inducir movimiento en una pata disecada de rana (Verkhatsky et al., 2006).

A mediados del siglo XX, en su trabajo seminal de 1952, Hodgkin y Huxley desarrollaron

un sistema de medición que les permitió caracterizar de manera intracelular los bio-potenciales generados en los axones gigantes de calamar. Los electrodos de registro consistían en capilares de vidrio llenos de agua de mar. De esta manera, a través de una serie de experimentos y modelado matemático, se logró avanzar en el conocimiento de la generación de potenciales de acción por parte de las neuronas (Hodgkin & Huxley, 1952).

Ente los años 1950 y 1960, surgen los primeros registros extracelulares de la actividad de neuronas únicas *in vivo* en la corteza en gatos, lo que permitió estudiar la estructura y funcionalidad de distintas zonas de la corteza cerebral. Estos registros, a diferencia de los de Hodgkin y Huxley, fueron realizados con microelectrodos de metal (Hubel, 1959; Mountcastle, 1956).

Los avances tecnológicos de la segunda mitad del siglo XX y un sostenido esfuerzo por intentar comprender el funcionamiento del sistema nervioso llevó al desarrollo de técnicas revolucionarias. Para nombrar algunos ejemplos, en la década de 1970, Erwin Neher y Bert Sakmann desarrollaron la técnica que hizo posible medir por primera vez la corriente de un canal iónico en la membrana celular de neuronas, abriendo la posibilidad a la descripción y el estudio de las propiedades y los mecanismos de los distintos tipos de canales (Neher et al., 1978). Desde la década de 1980 en adelante, la electrofisiología - y en particular sus aplicaciones a bioprostética - han visto un sostenido interés y desarrollo en generar registros extracelulares estables de la actividad de múltiples neuronas *in vivo*, en parte por su potencialidad para el desarrollo de interfases cerebro-máquina (Nicolas-Alonso & Gomez-Gil, 2012). El avance tecnológico ha venido acompañado de métodos computacionales que permitan discriminar, a partir de un registro extracelular, las trazas de actividad de neuronas individuales (para artículos de revisión sobre el tema, (Lewicki, 1998; Rey et al., 2015b)).

En las últimas décadas, ha existido un desarrollo sostenido en registros de actividad neuronal a gran escala en el cerebro. En estos registros se ha encontrado un renovado interés por la presencia de oscilaciones de la actividad neuronal en circuitos corticales, comúnmente observadas en los potenciales de campo local o LFP (del inglés, *Local Field Potential*) (Buzsáki, 2004; Buzsáki & Draguhn, 2004; Destexhe et al., 1999). Adicionalmente, los registros realizados con sondas con arreglos multi-electrodo permiten obtener una muestra de la actividad de un conjunto de neuronas en un volumen del cerebro y estudiar la relación de la actividad de neuronas únicas con los potenciales de campo (Buzsáki et al., 2012).

Dada la variedad de técnicas electrofisiológicas posibles, es importante entender la diferencia entre ellas. En particular, la diferencia entre registros intracelulares, extracelulares y registros de la actividad de grandes conjuntos de neuronas. Un resumen de los valores de magnitud típicos involucrados en las señales de 3 tipos de registros se muestra a continuación (adaptada de (Gosselin, 2011)). Como puede verse en la tabla, los potenciales de acción medidos de manera intracelular - como en los registros de Hodgkin y Huxley - son señales, típicamente, de dos a tres órdenes de magnitud mayor en amplitud que los registros extracelulares. Sin embargo, la posibi-

lidad de registrar la actividad de grandes conjuntos de neuronas en simultáneo y en particular, con el desarrollo de arreglos multi-electrodo, hace que la técnica de registro extracelular *in vivo* sea ampliamente utilizada. Hoy en día, también existen técnicas ópticas para sondear la actividad de una gran población de neuronas a partir de tintes sensibles al calcio y técnicas avanzadas de microscopía. Sin embargo, debido a que los transientes de estas tintes son una medida indirecta del disparo de un potencial de acción por parte de las neuronas, la electrofisiología extracelular sigue proveyendo la evidencia más directa de la actividad de neuronas en el SNC. Por esto, el uso de las técnicas en conjunto también ha cobrado relevancia (Scanziani & Häusser, 2009).

Señal	Amplitud	Ancho de banda	Electrodos
PA intracelular	50 - 500 μV_{pp}	100 Hz - 10 kHz	Micropipeta de vidrio
PA extracelular	10 - 70 mV_{pp}	100 Hz - 10 kHz	Microelectrodo de metal/sonda de sílice
Potencial de campo local (LFP)	0.5 - 5 mV_{pp}	1 mHz - 200 Hz	Microelectrodo de metal/sonda de sílice

Tabla 1.1: Distintos órdenes de magnitud en registros electrofisiológicos de actividad en el SNC para el caso de potenciales intracelulares, extracelulares y LFP (adaptada de (Gosselin, 2011)).

Registros extracelulares de potenciales de acción

Como se discutió en la sección anterior, una de las estrategias más extendidas para realizar experimentos que involucran la medición de actividad neuronal *in vivo* son los registros extracelulares. Para este fin se utilizan microelectrodos fabricados con algún metal (p. ej, tungsteno) que pueden presentarse como un único canal o en arreglos de tetrodos para mediciones de más de un canal. Más recientemente, una alternativa para mediciones extracelulares está dada por las sondas de sílice con arreglos multi-electrodo que presentan un gran número de sitios de medición (p. ej, sondas Neuronexus, (Hetke et al., 2011)).

Para poder realizar los registros, es necesario contar con la infraestructura necesaria para poder realizar cirugías a los animales y acceder de esta manera con los electrodos de medición al tejido cerebral. Como autor de esta tesis, realicé el curso reglamentario organizado por la Comisión Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL-FCEyN, UBA) previo a la manipulación de cualquier animal en experimentación. El entrenamiento específico en el manejo de los animales y de las cirugías necesarias para los experimentos estuvo a cargo de la Dra. Ana Amador. Adicionalmente, los métodos y protocolos de las cirugías fueron utilizados previamente por la Dra. Ana Amador y colaboradores (por ejemplo, Daniel Margoliash, protocolos aprobados en IACUC-Universidad de Chicago, EEUU) y aprobados por la CICUAL-FCEN (UBA). Por último, el Laboratorio de Sistemas Dinámicos cuenta con una veterinaria contratada,

la Dra. María de los Angeles Suárez, quien colaboró y supervisó en las áreas quirúrgicas y de control sanitario de los animales mientras éstos estuvieran en el laboratorio.

En esta tesis se discutirán los resultados obtenidos a partir de experimentos en animales anestesiados. Mientras que los detalles de los sistemas de adquisición y control, así como los tipos de señales registradas serán discutidos en cada capítulo, en esta sección se dan las bases de la medida de interés: registros extracelulares de la actividad neuronal en el núcleo HVC del sistema neuronal del canto en animales anestesiados.

En Figura 1.3 se muestra un esquema de las dimensiones involucradas y el registro extracelular de un potencial de acción. En (a) se muestra un corte sagital del cerebro de un diamante mandarín (tinción de Nissl utilizando violeta de cresilo). En (b) se muestra una ampliación de la región marcada en (a), donde pueden verse los cuerpos neuronales discretos teñidos en la preparación. Las señales medidas corresponden a actividad neuronal registrada en un entorno de la punta del microelectrodo (representado conceptualmente como un “radio de detección”). Si la calidad del registro es suficiente, esto implica que la señal se compone de potenciales de acción definidos con una buena relación señal/ruido. Entre los potenciales de acción registrados, pueden existir “espigas” de distinta forma y amplitud (ver espigas de distintos tamaños en (c)). Estas características del potencial registrado extracelularmente dependen de las condiciones espaciales en el registro (la distancia entre la neurona que originó el potencial de acción y el electrodo, la orientación, etc., (Gold et al., 2006)).

Si la impedancia del electrodo es lo suficientemente alta, es posible incluso separar potenciales de acción de una única neurona en los registros extracelulares. Este fenómeno se ilustra adicionalmente en un segmento de registro en Figura 1.4. En (a) se muestran una serie de potenciales de acción cuya amplitud se mantiene estable a lo largo de la medición y se distingue claramente del ruido eléctrico de fondo. En este marco, se denominan a estas mediciones “mediciones extracelulares de unidad única”.

Potencial de campo medio (LFP) y su relación con actividad neuronal

A principios del siglo XX, Hans Berger demostró la existencia de ondas de actividad eléctrica en el cerebro humano, inventando efectivamente la electroencefalografía (EEG). Aunque trabajos contemporáneos habían demostrado la existencia de este comportamiento en registros con animales, fue Berger quien describió en detalle, a partir de registros en humanos, la presencia de ondas de gran amplitud con una frecuencia de 10 Hz y también ondas de menor amplitud y mayor frecuencia. Los nombres asignados a estas ondas originalmente (ondas alfa y ondas beta, respectivamente), siguen siendo actualmente la forma en que se designa a este rango de frecuencias en las oscilaciones de la actividad neuronal (Buzsaki, 2006).

La medición de EEG consiste en una medida no invasiva de la actividad eléctrica del cerebro

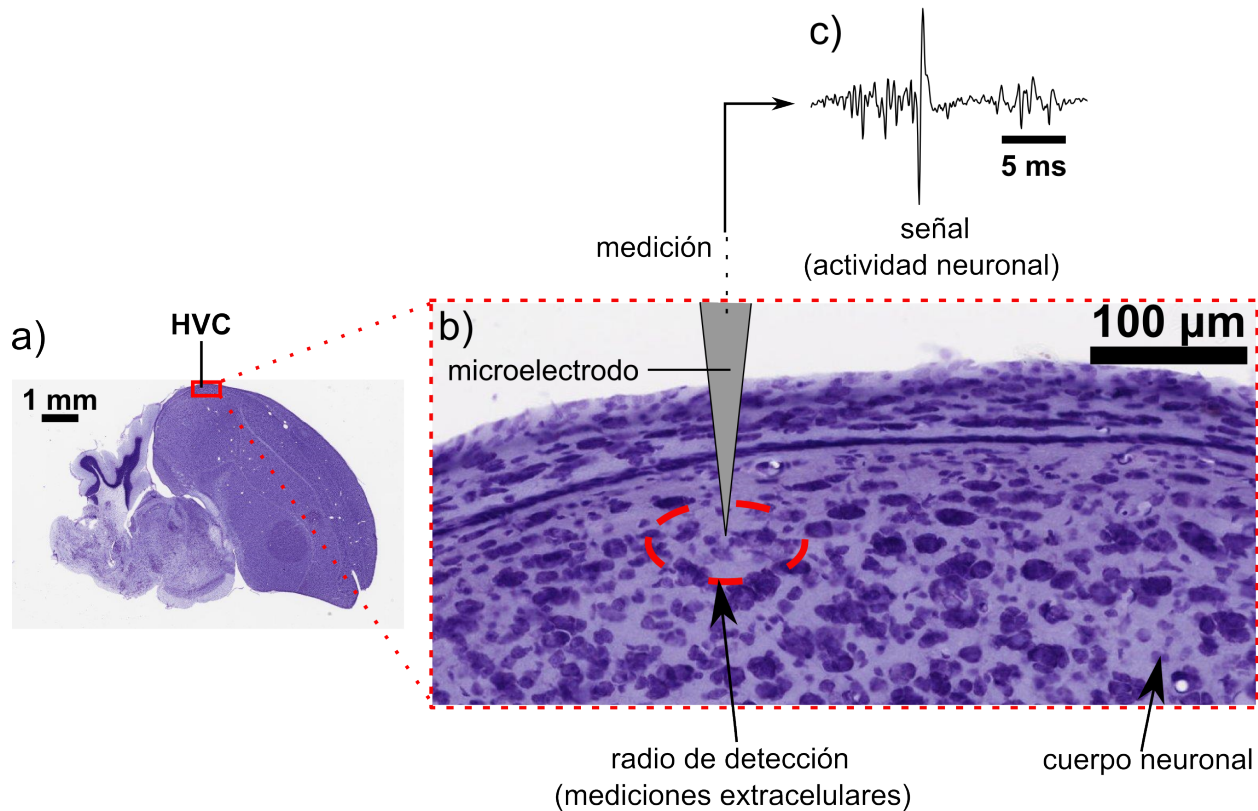


Figura 1.3: Mediciones extracelulares de actividad neuronal realizadas en un cerebro de diamante mandarín. (a) Corte sagital del cerebro de un diamante mandarín. Tinción de Nissl utilizando violeta de cresilo. Las zonas más oscuras representan zonas de mayor densidad de neuronas (núcleos neuronales). Se muestra la zona del corte donde se encuentra el núcleo HVC, de interés en el desarrollo de esta tesis. (b) Detalle de la zona enmarcada en rojo en (a) con una escala de 100 μm . Pueden apreciarse los cuerpos neuronales como manchas oscuras. Se muestra esquemáticamente la punta de un microelectrodo de tungsteno de alta impedancia y su "radio de detección". (c) Fragmento de una señal temporal medida con el microelectrodo, detallando un potencial de acción neuronal.

a partir del posicionamiento de electrodos macroscópicos en el cuero cabelludo. En cada punto de medición, el voltaje medido tiene contribuciones de la actividad promediada en una región cuya magnitud es del orden de los 10 cm^2 . Debido a esto, a la distorsión y atenuación de la señal al atravesar el cráneo y a la distancia a las fuentes, esta medición no provee información sobre los circuitos locales que la generan. Una alternativa no invasiva y de alta resolución espacial, utilizada en diagnóstico en humanos, es la magnetoencefalografía (MEG), cuya resolución espacial es del orden del milímetro.

Las mediciones de la actividad a gran escala en el interior del cráneo están dadas por la electrocorticografía (ECoG), cuando se utilizan electrodos subdurales, y por el potencial de campo local o LFP cuando se utilizan electrodos en profundidad (Buzsáki et al., 2012). Con estos electrodos profundos, también es posible recuperar la actividad de neuronas individuales (Rey et al.,

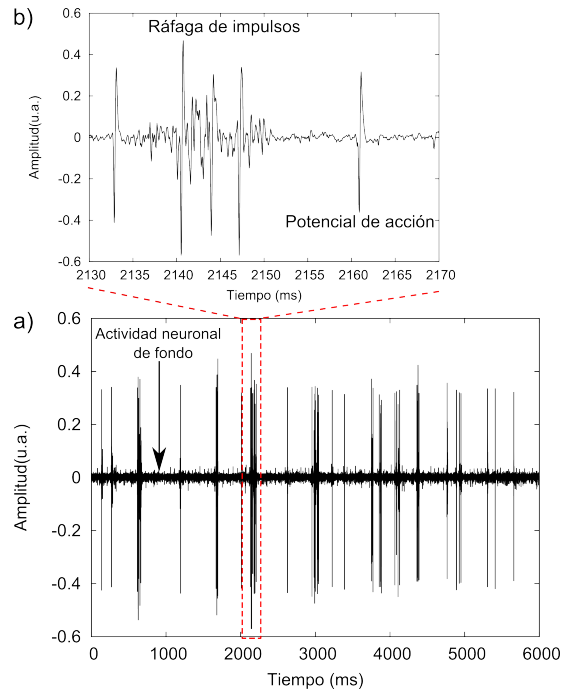


Figura 1.4: Medicion extracelular de unidad única. (a) Señal temporal correspondiente a un registro de actividad neuronal, mostrando espigas (potenciales de acción detectados de manera extracelular) y actividad de fondo. (b) Detalle temporal, mostrando espigas aisladas y ráfagas de impulsos neuronales. Siempre que puedan separarse los aportes de la señal provenientes de distintas neuronas se refiere a la medición como una “medición extracelular de unidad única”.

2015a). De las 3 mediciones a gran escala, el LFP es la que mayor resolución espacial y más información sobre los patrones de disparo en las neuronas de los circuitos locales provee, debido a la cercanía con las fuentes que lo generan. Una de las posibles explicaciones del hecho de que los potenciales de acción individuales tengan una participación limitada en las actividades de EEG y LFP es que el tejido extracelular actúa como un filtro pasa-bajos, atenuando pronunciadamente los eventos de altas frecuencias como los potenciales de acción. Sin embargo, los eventos de baja frecuencia como los potenciales sinápticos se atenúan menos con la distancia (Bédard et al., 2006). Este comportamiento dependiente de la frecuencia es una propiedad observada en los registros extracelulares: como se discutió en Sección 1.5.A, la amplitud de las espigas detectadas tiene una dependencia importante de la distancia al electrodo.

Para cualquiera de las mediciones mencionadas (EEG, ECoG, LFP), la medición es un voltaje, V_e . El término “potencial de campo local” se refiere a la medida extracelular de un voltaje (medida escalar) relacionada con la actividad promediada en una cierta región del cerebro, y no debería confundirse con la definición física de *campo*. Es la variación espacial de V_e la que genera un campo eléctrico, pero el término potencial de campo local se utiliza por su amplia adaptación.

El advenimiento de los arreglos multielectrodo posibilitó el registro de información espacial

detallada sobre la actividad eléctrica en el cerebro, a partir del registro en múltiples sitios en simultáneo. Las sondas de sílice (del inglés, *silicon probes*) se presentan en una gran variedad de configuraciones espaciales, con una cantidad de sitios de medición que sigue en crecimiento. El desarrollo de estas nuevas tecnologías, en conjunto con la miniaturización y migración hacia circuitos integrados permitió reemplazar los sistemas de adquisición y control analógicos históricamente usados en electrofisiología. Esto, a su vez, posibilitó escalar rápidamente el número de canales que se pueden registrar en simultáneo. Conjunto a las nuevas técnicas de registro y adquisición, han surgido nuevas herramientas para el análisis de estos grandes cuerpos de datos (Buzsáki, 2004; Obien et al., 2014).

La mayoría de los fenómenos descriptos a nivel del EEG, y estudiados en mayor detalle a escala de circuitos locales a partir de los LFP han sido estudiados en el neocórtex en mamíferos. En particular, los modelos más detallados sobre el origen de las señales medidas en EEG, ECoG y los LFP dan especial énfasis en la importancia de la geometría de las neuronas piramidales y la organización laminar de las capas del neocórtex como principales contribuyentes a las señales medidas. A través de registros y modelado matemático, se considera al EEG medido en mamíferos como un promediado macroscópico de los LFP en distintas regiones. Sin embargo - aunque no se profundiza sobre ello - los autores mencionan que la geometría de las neuronas piramidales no es la única alternativa que hace posible obtener contribuciones importantes a un potencial macroscópico (para un análisis detallado de las fuentes que generan los LFP, ver (Buzsáki et al., 2012; Einevoll et al., 2013)).

En las oscilaciones de la actividad neuronal se han encontrado importantes correlatos con el comportamiento, relacionados con el procesamiento sensorial, el planeamiento motor y con funciones de más alto nivel como la atención y memoria. Para dar algunos ejemplos: estudios han mostrado que las oscilaciones presentes en el LFP están relacionadas en el procesamiento de información visual en corteza primaria en primates no humanos (Belitski et al., 2008; Mazzoni et al., 2011) o en la percepción del movimiento de los bigotes en corteza somatosensorial de ratas (Temereanca & Simons, 2003). Adicionalmente, se ha propuesto que la fase de la oscilación en que disparan los potenciales de acción provee información adicional al sistema en la discriminación de estímulos (Huxter et al., 2003; Montemurro et al., 2008). A partir de mediciones del LFP en la corteza parietal posterior es posible predecir el movimiento de brazos en primates, mostrando el potencial de este tipo de mediciones para la construcción de interfaces cerebro-máquina (Scherberger et al., 2005). La modificación o eliminación de este tipo de oscilaciones puede causar un déficit en el comportamiento, mostrado por ejemplo, para el caso de memoria espacial en ratas (Girardeau et al., 2009). Es importante marcar que cada uno de estos fenómenos puede estar asociado a distintas bandas de frecuencias en la medición, y que incluso puede haber múltiples bandas activas, transmitiendo información independiente en el procesamiento de un estímulo (Belitski et al., 2008). Por este motivo, es común encontrar en la literatura la des-

cripción del LFP a partir de la descomposición en las bandas de frecuencias activas durante el comportamiento estudiado.

En humanos, múltiples estudios han estudiado la importancia de la presencia de oscilaciones en tareas relacionadas al comportamiento, pero las medidas son realizadas típicamente con técnicas no invasivas. Sin embargo, es posible registrar potenciales de campo local en, por ejemplo, pacientes que son sometidos a neurocirugía para realizar un implante de estimulación cerebral profunda (DBS, del inglés, *deep brain stimulation*) para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Recientemente, se ha propuesto el uso de la medición del LFP como variable de control para el futuro de la técnica de DBS (Priori et al., 2013).

La relevancia de las oscilaciones del cerebro y el LFP han sido el foco de numerosos trabajos a lo largo de los años (Buzsaki, 2006). Sin embargo, la evidencia proveniente del estudio del LFP en modelos animales no mamíferos es menos extensa. Esto se debe, en parte, a las diferencias estructurales que éstos presentan respecto de los mamíferos, al no presentar el neocórtex. Esto, a su vez, dificulta la posible traslación de los conocimientos adquiridos en el estudio de las oscilaciones cerebrales en esos sistemas. Sin embargo, a pesar de las diferencias estructurales se encuentra que en aves, por ejemplo, las etapas de sueño están asociadas a la presencia de oscilaciones similares (Low et al., 2008) y que las oscilaciones están relacionadas con el disparo sincrónico de múltiples neuronas en regiones del cerebro anterior y de ganglios de la base (estudios en diamantes mandarines anestesiados, (Beckers & Rattenborg, 2015; Beckers et al., 2014; Yanagihara & Hessler, 2012). Adicionalmente, un estudio reciente mostró la predominancia de una banda de 25–30 Hz durante la producción vocal en diamantes mandarines (Markowitz et al., 2015). En este trabajo se describió la codificación en fase previamente discutida para mamíferos, en la cual dos sub-poblaciones de neuronas en un núcleo sensorimotor disparan en distintas fases de un ritmo a 30 Hz del LFP. Estudios *in vitro* en rebanadas de cerebro que incluyen neuronas del mismo núcleo encontraron que la estimulación dada por un impulso de corriente es suficiente para generar oscilaciones de 30 Hz en el LFP, y que la actividad de neuronas está coordinada con los potenciales generados de esta manera (Solis & Perkel, 2005). Es interesante notar que para el caso de diamantes mandarines, una frecuencia de 30 Hz puede estar relacionada directamente con la organización temporal del canto (Norton & Scharff, 2016). Algunos estudios han utilizado la medida del LFP para estudiar las respuestas auditivas a llamadas en áreas específicamente dedicadas a procesamiento auditivo (Beckers & Gahr, 2010; Schachter, 2016).

Dado el especial interés que existe en comprender los mecanismos involucrados en la producción vocal, poco se sabe sobre el potencial de campo local en áreas dedicadas a la producción vocal en aves. En particular, esto se debe al foco que existe en el campo por estudiar la acción de neuronas individuales en la producción motora. Este es un tópico que retomaremos en Capítulo 4.

1.6. Circuito neuronal del canto: organización en núcleos

Como se mencionó en Sección 1.2, las aves canoras presentan circuitos neuronales especializados que están dedicados al aprendizaje, producción y mantenimiento del canto. Esta arquitectura se conoce, en su conjunto, como el sistema neuronal del canto (ver Figura 1.5). A lo largo de los años, una descripción anatómica detallada y experimentos de lesiones en distintos núcleos han revelado su rol en la codificación del canto. El circuito del canto puede dividirse en dos sistemas mayores: el sistema motor del canto (SMP, por su nombre en inglés *Song Motor Pathway*) y el sistema anterior del prosencéfalo (AFP, por su nombre en inglés *Anterior Forebrain Pathway*). Ambos sistemas derivan la entrada del núcleo telencefálico del canto, denominado HVC (nombre propio). HVC recibe información auditiva de una estructura de núcleos neuronales, análoga a la corteza auditiva en mamíferos.

Lesiones en el SMP destruyen o afectan seriamente la producción vocal, indicando una funcionalidad esencial en el control motor del canto. Lesiones en el AFP, en cambio, no afectan al canto aprendido pero sí reducen su plasticidad. Las neuronas que conforman el SMP y el AFP presentan algún tipo de respuesta a estímulos auditivos, indicando una conexión funcional entre la información auditiva y el control vocal (Mooney, 2009a,b).

El sistema del canto constituye una red altamente distribuida en varias regiones del cerebro, transportando señales motoras descendentes y flujos ascendentes de señales auditivas, señales propioceptivas e información motora recurrente. El AFP y el SMP tienen origen en dos poblaciones distintas bien definidas de neuronas proyectoras de HVC. Las neuronas HVC_{RA} inervan al núcleo robusto del arcopallio (RA) que, a su vez, contiene neuronas que proyectan axones largos en el tronco encefálico y desencadena en neuronas motoras de la siringe y neuronas respiratorias premotoras. De esta manera, el SMP provee la base anatómica mediante la cual el telencéfalo controla la vocalización, una estructura que tiene similitudes con el caso humano.

El otro tipo de neuronas proyectoras de HVC (HVC_X) inervan a área X y, pasando por DLM y LMAN, conectan indirectamente a HVC y RA a través del AFP. Las neuronas proyectoras de LMAN se bifurcan: unas desencadenan sinapsis excitadoras rápidas en RA y otras terminan en área X, generando así un bucle de retroalimentación dentro del circuito. Lo importante de esto es que el AFP sólo puede influenciar las instrucciones motoras a través del núcleo RA.

RA inerva a varios núcleos, entre los cuales se encuentra el nXIIts, cuyos axones inervan directamente los músculos que rodean la siringe, y los núcleos retroambigualis RAm y parambigualis PAm, que cumplen roles en el ritmo inspiratorio/espíatorio del ave. Estos circuitos presentan fuertes similitudes con las vías cerebrales de producción vocal en mamíferos (Brainard & Doupe, 2013). De particular interés para esta tesis es el núcleo telencefálico HVC, un núcleo en el cual se combinan las representaciones motoras y auditivas del canto. Esto se debe a que las neuronas de HVC muestran actividad relacionada con la producción del canto, pero también pueden ser

excitadas por la presentación auditiva del canto propio del ave (Margoliash, 1986; McCasland & Konishi, 1981; Prather et al., 2008; Yu & Margoliash, 1996). Esta propiedad se extiende a todos los núcleos del sistema del canto “río abajo” de HVC, y la respuesta neuronal es más fuerte para el canto propio que para cualquier otro estímulo auditivo (por ejemplo, (Dave & Margoliash, 2000; Doupe & Konishi, 1991; Solis & Doupe, 1999)). Esta respuesta selectiva al canto propio surge durante el aprendizaje y se conserva en la edad adulta (Doupe & Solis, 1997; Nick & Konishi, 2005; Solis & Doupe, 1997). Adicionalmente, el daño a la periferia vocal produce una alteración auditiva que modifica la respuesta de las neuronas selectivas (Roy & Mooney, 2007; Solis & Doupe, 2000). Resulta interesante, además, que las neuronas de HVC muestran propiedades de reflejo auditivo-vocal. Es decir, el mismo patrón de actividad es generado tanto durante el canto como durante la percepción del canto propio (Dave & Margoliash, 2000; Mooney, 2014; Prather et al., 2008).

Es interesante notar que no existe demora entre el patrón auditivo y el motor, efecto que convierte a HVC en un buen candidato para explorar la integración sensorimotora. Al representar una estructura análoga a corteza, HVC ha sido el objeto de múltiples estudios por representar la ventaja de ser un núcleo fácilmente accesible para realizar los registros neurofisiológicos. En el campo de estudio de canto de aves, existe una prevalencia en estudiar la codificación neuronal al nivel de estructuras corticales, posicionando a HVC en la parte superior de la jerarquía de control motor y procesamiento sensorial. En esta sección, presento dos hipótesis actuales para la codificación sensorimotora en aves canoras y el rol asignado a HVC en cada una de ellas.

1.6.A. HVC es un núcleo neuronal sensorimotor

Experimentos electrofisiológicos han demostrado que el núcleo telencefálico HVC contiene neuronas cuyas respuestas auditivas tienen una característica particular (Margoliash & Konishi, 1985). Estas células, conocidas como “neuronas selectivas al canto” responden con una intensidad significativamente mayor a la presentación del canto propio del ave, siendo que no responden a la presentación auditiva de tonos puros o ruido blanco. Más aún, en diamantes mandarines existe una gran preferencia de respuesta del canto propio por sobre la presentación de cantos de otros individuos de la misma especie. La modificación sistemática de algunos de los parámetros del canto ha mostrado que las respuestas neuronales de HVC dependen de las características espectrales y temporales del canto (Margoliash, 1983, 1986; Theunissen & Doupe, 1998). Si bien las neuronas del sistema de canto son sensibles a manipulaciones acústicas, es desconocido si estas manipulaciones son relevantes para las representaciones internas que el ave utiliza para producir y percibir sus vocalizaciones.

Las propiedades auditivas altamente selectivas de las neuronas y el hecho de que estas características surgen durante el aprendizaje del canto sugieren que estas neuronas juegan un

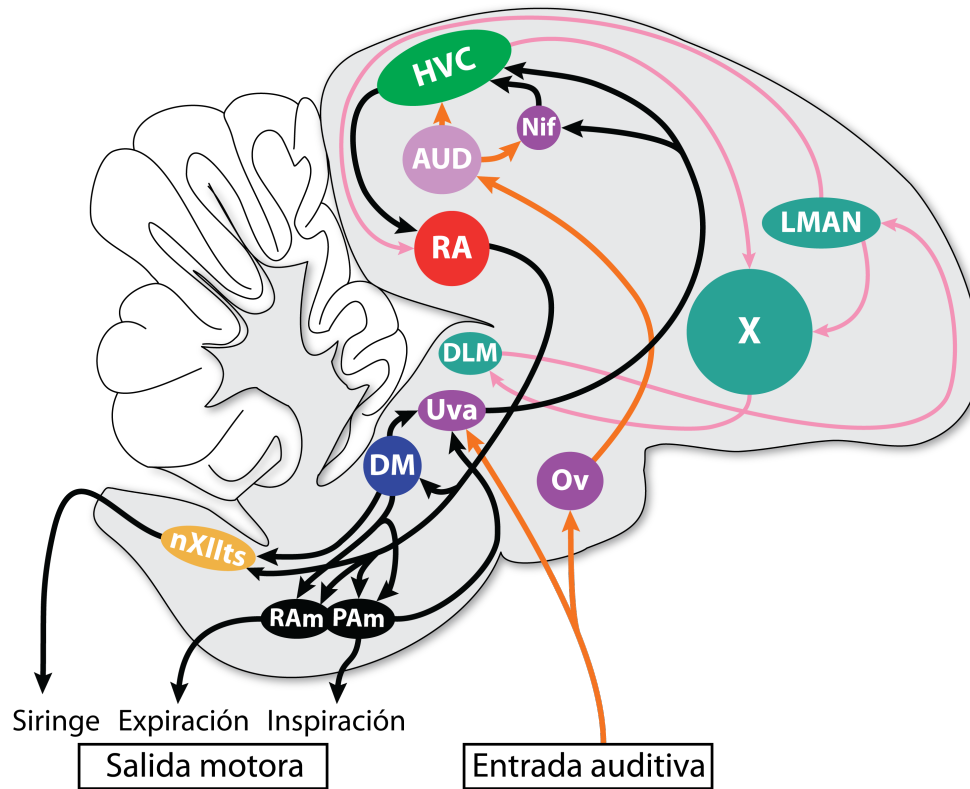


Figura 1.5: Esquema del sistema del canto y las vías sensoriales en el cerebro de un ave canora. El sistema neuronal del canto está compuesto por la vía motora del canto (SMP, del inglés *song motor pathway*, flechas negras) y la vía del prosencéfalo anterior (AFP, del inglés *anterior forebrain pathway*, flechas rosadas). El circuito motor del canto incluye proyecciones “río abajo” desde HVC así como una vía motora recurrente que conecta tanto DM como PAm indirectamente a HVC a través de Uva. HVC proyecta hacia RA, y la actividad de RA se proyecta a DM en el cerebro medio y al núcleo del tronco cerebral: nXIIIts (cuyas neuronas motoras inervan los músculos que rodean la siringe); RAm y PAm controlan la espiración /inspiración, respectivamente. El circuito del AFP presenta una vía indirecta de HVC a RA, que se asemeja a los circuitos cortico-basales presentes en los mamíferos (Brainard & Doupe, 2013). Esta vía es crucial para el aprendizaje del canto y el mantenimiento del mismo en adultos. Además, HVC recibe información auditiva de dos vías (flechas naranjas). En una vía, la información auditiva se transmite a través de Uva a HVC tanto directa como indirectamente a través de Nif. La otra vía transmite la entrada auditiva a través de Ov. Ov proyecta a un conjunto de núcleos altamente interconectados dedicados al procesamiento auditivo (Campo L, CM y NCM, representados como “AUD” en la figura). **Abreviaturas:** nXIIIts, porción tráqueo-siríngea del núcleo hipogloso; RA, núcleo robusto del arcopallio; DM, núcleo intercolicular dorso-medial; RAm, núcleo Retroambigualis; PAm, núcleo Parambigualis; Uva, núcleo Uvaeformis; Nif, núcleo interfazial del nidopallio; Ov, núcleo Ovoidalis; LMAN, núcleo lateral magnocelular del nidopallio anterior; DLM, núcleo lateral dorsal del tálamo medial; CM, mesopallio caudal; NCM, nidopallio medial caudal.

papel importante durante el aprendizaje vocal y en la discriminación de las vocalizaciones de adultos (Doupe & Solis, 1997; Margoliash, 1983). El núcleo neuronal HVC ha sido el foco de mucha investigación en el campo. De particular interés para el desarrollo de esta tesis resulta el descubrimiento de que las neuronas en HVC de diamantes mandarines presentan un patrón de activación en aves dormidas o anestesiadas que se corresponde con el patrón de activación presente durante el día mientras el ave canta (Dave & Margoliash, 2000).

La selectividad de las neuronas en HVC es el resultado de un procesamiento jerárquico de las neuronas de la vía auditiva, que presentan diferentes niveles de selectividad al canto propio en diferentes núcleos del sistema (Theunissen et al., 2004). Los tonos sintéticos o ruido blanco son estímulos pobres para comprender el procesamiento auditivo en los núcleos cerebrales superiores de las aves canoras (Margoliash, 1983; Theunissen et al., 2000). La preferencia por sonidos naturales y el canto conspecífico por sobre estímulos sintéticos forman parte de esa jerarquía de procesamiento (Grace et al., 2003). La preferencia por el canto de un macho adulto surge en el campo L, que es una de las entradas auditivas al núcleo HVC. Entonces, como el procesamiento auditivo a lo largo de la vía auditiva es selectivo a estímulos que van desde sonidos naturales hasta cantos de la misma especie, en HVC la selectividad se ajusta aún más al canto propio del ave. Sin embargo, dentro de HVC también existe variabilidad en la selectividad de la respuesta (Margoliash et al., 1994) y, para otras especies, variables como el fotoperíodo (relacionado con la estación del año) puede dar lugar a variaciones de selectividad en HVC (Del Negro et al., 2005).

Que los patrones de disparo de las neuronas selectivas al canto propio en HVC sean similares mientras el ave canta y mientras el ave escucha una grabación de su canto convierte a esto último en una estrategia experimental para estudiar la codificación neuronal en HVC. De esta manera, el estudio de la actividad de neuronas en el núcleo HVC ante presentaciones auditivas del canto propio provee evidencia indirecta de la actividad durante el canto (Dave & Margoliash, 2000).

1.6.B. La visión “de arriba hacia abajo”

El núcleo telencefálico HVC y el núcleo robusto del arcopallio (RA) (ver Figura 1.5) son necesarios para la producción normal del canto. Las lesiones bilaterales de cualquiera de estos núcleos causan una seria disrupción en las vocalizaciones producidas (Nottebohm et al., 1976). La estimulación eléctrica durante el canto se utilizó para investigar las diferentes funciones de estos núcleos: la estimulación de RA distorsionó las propiedades acústicas de la sílaba en curso, mientras que la estimulación de HVC alteró todo el programa del canto (Vu et al., 1994). A principios de este siglo, la tecnología permitió registrar neuronas individuales dentro de los núcleos corticales durante el canto. En el núcleo HVC hay dos poblaciones distintas de neuronas: las interneuronas y las neuronas proyectoras (para una descripción detallada, ver (Mooney, 2000)).

A partir de experimentos en los que se mostró que estimular HVC y RA modifican la estructura temporal del canto (Vu et al., 1994) y de la posibilidad de registrar neuronas únicas en los núcleos HVC y RA de aves cantando, surgió en el campo una visión en la que HVC es el responsable de iniciar y controlar cada instante del programa motor. En este modelo conceptual se propuso que las neuronas del núcleo HVC que proyectan hacia RA actúan como un forzante sobre el sistema. De esta manera, distintos conjuntos de estas neuronas dispararían ráfagas de aproximadamente 10 ms de duración a lo largo del canto y cada ráfaga activaría distintas neuronas en RA, generando así los patrones complejos de activación observados en ese núcleo. En esta visión “de arriba hacia abajo” (del inglés *top-down*), el núcleo HVC sería el único responsable de codificar todos los detalles del canto; el resto del sistema seguiría la actividad de este núcleo como si fuera un sistema lineal respondiendo a un forzante, hasta generar los comandos motores que activan la siringe durante la producción del canto (Fee et al., 2004; Hahnloser et al., 2002; Kozhevnikov & Fee, 2007).

La visión “de arriba hacia abajo” ganó soporte a partir de experimentos en los cuales se enfrió el HVC de diamantes mandarines y se observó que todo el programa motor que daba lugar al canto fue ralentizado (“estirado” temporalmente) (Long & Fee, 2008). La racionalidad detrás de esto fue que si las conexiones de HVC generan una estructura jerárquica río abajo, en la cual HVC es el único responsable de la estructura temporal del canto, entonces al enfriarlo el efecto observable en el comportamiento sería que todo el canto se produce más lentamente.

1.6.C. Una visión integrada

Desde su inicial establecimiento, diversas observaciones experimentales han cuestionado la visión “de arriba hacia abajo” presentada en la sección anterior. Por un lado, un trabajo de Amador y colaboradores (Amador et al., 2013) mostró que las neuronas de HVC disparan preferentemente en ciertas instancias significativas del canto y no de manera regular cada 10 ms. Valiéndose del conocimiento adquirido por los trabajos de modelado del funcionamiento de la siringe (discutidos en Sección 1.4), estas instancias significativas fueron identificadas como puntos extremos de los gestos motores (trazas de los parámetros relacionados con la presión en los sacos aéreos y la tensión en los músculos de la siringe). En ese trabajo, se encontró que para diamantes mandarines, las neuronas proyectoras HVC_{RA} presentaban actividad de disparo fásico en un entorno de estos extremos (en particular, dados por los comienzos y finales de sílabas, los momentos de discontinuidad en la traza de frecuencia fundamental del sonido, entre otros).

La idea de que el núcleo HVC podría estar codificando información de ciertas instancias motoras significativas en el canto plantea una alternativa a la visión jerárquica de que HVC es el responsable de iniciar la actividad motora y controlarla instante a instante durante el canto. Por un lado, en la cadena sináptica dada por las proyecciones río abajo de HVC hasta llegar a la

inervación de la siringe y la modulación del flujo de aire para producir canto debería existir algún tipo de retraso en la información “originada” en HVC y la ocurrencia de estas instancias en el canto. Por otro lado, Mindlin y colaboradores (Goldin et al., 2013) replicaron los experimentos de enfriamiento en HVC, pero esta vez realizándolos en canarios. En estos experimentos se mostró que si bien existe el fenómeno de estiramiento de la estructura temporal del canto visto por Fee y colaboradores, al extender el rango de enfriamiento existe también un fenómeno de rompimiento de las sílabas que componen el canto. Este fenómeno no puede ser explicado por la visión de “arriba a abajo”. Para explicarlo, es necesario que exista al menos una escala temporal adicional a la dictada por las ráfagas de disparos en HVC.

Más recientemente, un trabajo de Mooney y colaboradores (Hamaguchi et al., 2016) retomó los experimentos de enfriamiento en diamantes mandarines. En este trabajo, los autores utilizan una variedad de técnicas (enfriamiento del núcleo HVC y Uva, micro-estimulaciones focales, registros de actividad sináptica y simulaciones computacionales) para demostrar que el *tempo* del canto está determinado por una red neuronal distribuida, de la cual HVC sólo forma parte. Esto está en contraste directo con la visión establecida en el campo en la que las neuronas de HVC forman una cadena sináptica que dicta la estructura temporal del canto. Por último, también vale remarcar que el modelo “de arriba hacia abajo” no tiene en cuenta ni asigna ningún rol a las conexiones “de abajo hacia arriba” (del inglés, *bottom-up*) que conectan el tronco cerebral al telencéfalo (ver las proyecciones desde DM y Uva hacia HVC en Figura 1.5), así como tampoco propone mecanismos de sincronización entre los núcleos HVC de ambos hemisferios cerebrales. Existen evidencias que sugieren que la sincronización entre ambos hemisferios se puede alcanzar a través de proyecciones ascendentes desde Uva hacia el núcleo HVC contralateral (Ashmore et al., 2008).

1.7. Modelado del sistema del canto en canarios

El estudio de la dinámica del órgano vocal (Sección 1.4) y las marcas de dinámicas de baja dimensión en las variables fisiológicas relacionadas con el canto (tensión en los músculos que rodean la siringe y, más aún, en la presión en los sacos aéreos) hizo posible describir los patrones de presión medidos experimentalmente con una arquitectura dada por un oscilador neuronal (Alonso et al., 2009; Trevisan et al., 2006). Más aún, dado el éxito del modelo de producción vocal de baja dimensión en capturar las características de un canto natural y la observación de una posible codificación en las transiciones de los gestos motores (Amador et al., 2013), esto llevó al desarrollo de una hipótesis de trabajo. Esa hipótesis, brevemente discutida en Sección 1.4, terminó por conjugarse en la búsqueda de un modelo de la arquitectura de circuitos neuronales involucrados en la producción del canto que permitiera recuperar las variables fisiológicas observadas. En esencia, este enfoque desde la periferia hacia el SNC constituye resolver el problema inverso de

las posibles causas que generan un dado gesto motor.

Dicho modelo, en adición a reproducir los gestos motores involucrados en el canto, debería ser capaz de explicar la creciente evidencia experimental de que HVC no es el único responsable de codificar las características temporales del canto, (Goldin et al., 2013; Hamaguchi et al., 2016) y que el sistema del canto es una estructura bilateral.

De esta manera, investigadores del Laboratorio de Sistemas Dinámicos desarrollaron, en paralelo al trabajo doctoral contenido en esta tesis, un modelo de la arquitectura de un circuito neuronal que involucra la actividad de los núcleos involucrados en la producción de canto discutidos en Sección 1.6, (Alonso et al., 2015). El modelo fue construido de manera modular: la primera parte consistió en reproducir los patrones de presión observados en canarios a partir de un oscilador neuronal (poblaciones de neuronas excitadoras e inhibitorias acopladas entre sí), para luego incorporar esta estructura en una arquitectura neuronal y recuperar las entradas necesarias para reproducir los patrones de presión a partir de la conjugación de la actividad poblacional de cada núcleo. De esta manera, la salida del modelo puede ser contrastada con variables fisiológicas que pueden medirse durante la generación del comportamiento (Goller & Suthers, 1996a,b; Goller & Cooper, 2004; Suthers et al., 1999). Los modelos de esta índole son típicamente de naturaleza fenomenológica (Alonso et al., 2009; Hoppensteadt & Izhikevich, 2012). Sin embargo, recientemente se han desarrollado técnicas que permiten calcular medidas de la actividad global a partir de unidades excitables acopladas (Roulet & Mindlin, 2016). La dinámica derivada de los primeros principios para esas variables colectivas es similar a la que muestran las variables de los modelos de tasa fenomenológica.

1.7.A. El modelo “circular”

Como se mencionó en la sección anterior, los patrones motores utilizados para generar el canto se pueden reproducir con éxito mediante un sistema dinámico de baja dimensión (Alonso et al., 2015; Amador & Mindlin, 2014; Trevisan et al., 2006). En Figura 1.6a se muestra un patrón respiratorio representativo correspondiente a un canto completo de un canario. Las letras mayúsculas (A,B,C,D) indican gestos de presión cualitativamente distintos, involucrados en frases de canto que poseen distintas características acústicas (duración, frecuencia fundamental, etc.). Por ejemplo, los gestos de presión indicados como “D” en la figura corresponden sílabas como las de larga duración remarcadas en Figura 1.1. Los 4 gestos de presión mostrados en la figura corresponden a las 4 familias de sílabas posibles en el repertorio de un canario (Alliende et al., 2010).

A su vez, en Figura 1.6b se muestra un esquema del núcleo RAm, considerado como un área relacionada con la espiración durante el canto y en directo control de los patrones de presión generados a nivel de la periferia biomecánica. Este núcleo está modelado como un oscilador

neuronal, a partir de un modelo aditivo sencillo de poblaciones de neuronas excitadoras e inhibitorias interconectadas (Hoppensteadt & Izhikevich, 1996; Trevisan et al., 2006). A la derecha de la arquitectura se muestra el diagrama de bifurcaciones del sistema en función de los parámetros que modulan la actividad de cada población (“entradas” en la figura). Notar que los distintos gestos son reconstruidos a partir de distintas trayectorias en el espacio de parámetros. Estas trayectorias se usaron para sintetizar los gestos de presión que se muestran en el panel derecho de Figura 1.6a. Para los gestos marcados como C y D, se necesita una entrada estructurada (rutas azul y roja en el espacio de parámetros). Las líneas azules representan una entrada del tronco cerebral, mientras que las líneas rojas, la entrada del telencéfalo. Las variables de este sistema dinámico son las actividades promedio de la población de neuronas excitadoras x_1 e inhibitorias x_2 , dadas por:

$$\dot{x}_i = -x_i + S(\rho_i + \alpha_{1i}x_1 + \alpha_{2i}x_2) \quad (1.4)$$

, con $i = 1, 2$ y $S(x) = 1/(1 + e^{-x})$; $\rho_1(t)$ y $\rho_2(t)$ representan la variación temporal en la activación de cada una de las poblaciones y las constantes α_{1i} y α_{2i} describen la arquitectura de la conexión entre ellas. De esta manera, la salida del SNC dada por RAM es modelada a partir de los gestos de presión registrados experimentalmente.

Luego de identificar las soluciones para cada gesto (trayectorias en el diagrama de bifurcaciones en Figura 1.6), el siguiente paso del modelado fue incorporar este modelo de RAM a un circuito cuya arquitectura estuviera dada por las conexiones mencionadas en Figura 1.5. De esta manera, se obtiene un modelo cuyas variables son las actividades poblacionales de distintos núcleos involucrados en la producción del canto. La observación de disparos neuronales en sincronía con la transición de gestos motores no puede ser explicada con la visión “de arriba hacia abajo” para HVC, en la cual el programa motor comienza en HVC y se proyecta río abajo hasta la producción del canto. Sin embargo, la ocurrencia de esos eventos puede ser compatible bajo la suposición de que tanto HVC como el área encargada de coordinar los gestos motores necesarios para el canto reciben una *entrada común* desde otra región del cerebro.

El diagrama de conexiones para este modelo, que llamaré “modelo circular” puede encontrarse en Figura 1.7a. Un área plausible de ser la iniciadora del programa motor podría ser DM, pero en el desarrollo del modelo se lo denomina “área iniciadora” (IA, *initiating area*, marcado con azul). Este núcleo provee una ráfaga inicial de actividad de corta duración (unos pocos milisegundos) que proyecta directamente a un área relacionada con la espiración (ER, putativamente, RAM, marcado con negro) y también es proyectada hacia el telencéfalo vía un núcleo talámico, Uva, que actúa como un relé de la actividad en IA. En HVC, la actividad es modelada como un pulso cuadrado que dura unas pocas decenas de milisegundos (20–40 ms), retrasado respecto del pulso generado por IA. Esto genera una ráfaga de actividad en el núcleo que puede sumarse

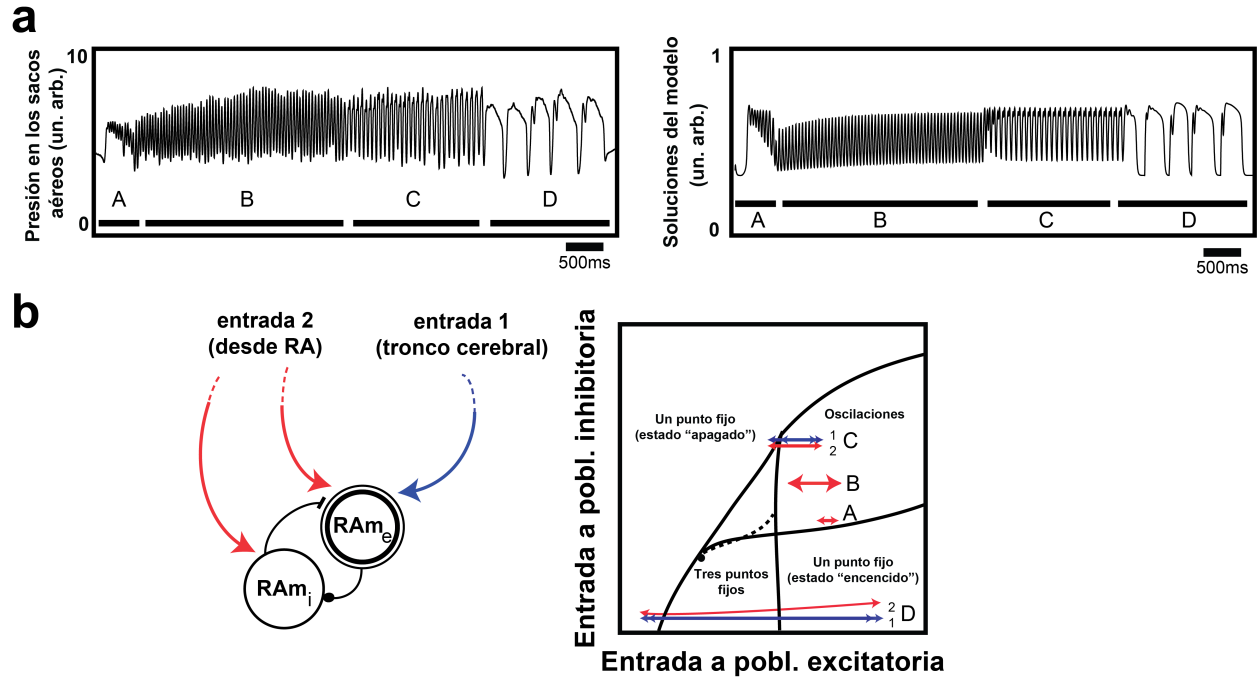


Figura 1.6: Modelado de patrones respiratorios del canto de un canario. (a) Presión de sacos aéreos medida experimentalmente (izquierda) y reconstrucción por el modelado de un núcleo relacionado con la actividad espiratoria (derecha). Las letras y barras negras (A,B,C,D) marcan gestos de presión involucrados en cada una de las cuatro familias de sílabas posibles para un canario (ver Sección 1.3, (Alliende et al., 2010; Trevisan et al., 2006): (A) soluciones pulsátiles, (B) P1, (C) P2 y (D) P0 (estos patrones serán discutidos en mayor detalle en Capítulo 4). (b) Diagrama de un modelo del núcleo neuronal espiratorio RAM como un oscilador neuronal (poblaciones de unidades inhibitorias y excitadoras acopladas entre sí). La actividad de cada población está impulsada por las entradas provenientes del tronco encefálico y RA (izquierda, para más detalle ver texto). Para ver los valores de los parámetros utilizados en la simulación, ver (Alonso et al., 2015). (Derecha) Diagrama de bifurcación en términos de las entradas a las poblaciones inhibitorias y excitadoras. Las bifurcaciones (líneas negras) separan las regiones del espacio de parámetros con comportamientos cualitativamente diferentes. Las flechas (codificadas por colores como en la figura de la izquierda) muestran las trayectorias en el espacio de parámetros correspondientes de las entradas a las poblaciones de RAM para generar las soluciones mostradas en (c). Figura adaptada de un artículo de revisión en el que participé (Amador et al., 2017).

a un nivel de actividad basal uniforme, posiblemente generada dentro del mismo núcleo. Las proyecciones de HVC a RA excitan la dinámica de este núcleo que, como el área relacionada con espiración, presenta una dinámica dada por un oscilador neuronal. Con el patrón de actividad neuronal enriquecido, la proyección llega finalmente al área relacionada con la espiración (ER, *expiratory-related area*), otorgando la dinámica necesaria a las poblaciones de ER para generar los patrones de presión necesarios. En Figura 1.7b se muestran las trazas de actividad para los distintos núcleos mostrados en el diagrama de conexiones en Figura 1.7a. En cada caso, las líneas punteadas grises marcan el comienzo de pulso de actividad en IA. Para el caso de HVC, las líneas punteadas verdes marcan la posibilidad de la presencia de una actividad periódica interna a HVC, conformando un refuerzo de la actividad con cada sílaba en las frases de tipo P1 o tipo pulsátil. La dinámica interna de RA, impulsada por las proyecciones de HVC genera patrones con una dinámica rica que, al integrarse río abajo termina por generar gestos de presión comparables a los medidos.

Este modelo es capaz de dar cuenta de múltiples observaciones experimentales. En primer lugar, como se mencionó anteriormente, los experimentos de enfriamiento de HVC dieron sustento a la hipótesis del reloj, debido a que al hacer la dinámica de HVC más lenta, el programa motor se estiraba (Long & Fee, 2008). Sin embargo, esa misma hipótesis no puede dar cuenta de cómo ocurre la sincronización bilateral en HVC (Schmidt, 2003), ni del rompimiento de sílabas en canarios en experimentos similares (Goldin et al., 2013) o de que el enfriamiento del núcleo Uva también afecta la dinámica del canto (Hamaguchi et al., 2016). El modelo presenta una arquitectura “mínima” en el sentido de que existen más núcleos que forman conexiones con los núcleos tenidos en cuenta; no obstante, la dinámica dada por el modelo circular permite reproducir los efectos del enfriamiento en HVC, mostrando gestos de mayor duración y el rompimiento de sílabas (Alonso et al., 2015). Adicionalmente, la inclusión de Uva hace que el rol de las proyecciones bilaterales pueda ser tenida en cuenta en el modelado (Alonso et al., 2016). A su vez, este modelo da cuenta de la existencia de un nivel de actividad “continua” en HVC, compatible con observaciones experimentales (Hahnloser et al., 2002; Lynch et al., 2016; Picardo et al., 2016), así como de la presencia de instancias inhomogéneas de excitación que son necesarias para dar forma a los gestos de presión involucrados en el canto de canarios río abajo. Estas instancias son conceptualmente similares a las transiciones de gestos observada en diamantes mandarines (Amador et al., 2013), y básicamente significan que HVC estaría conteniendo información motora y no solamente formando la cadena de tiempo del canto. Tras una extensión de la arquitectura mostrada en Figura 1.7 para incorporar las componentes bilaterales y realizar un modelado detallado de los pesos sinápticos necesarios para articular la actividad en ambos hemisferios, el modelo realiza una serie de predicciones específicas para ser puestas a prueba con registros neuronales. En particular, sobre instancias de disparo sincronizado a nivel poblacional en neuronas proyectoras de HVC (Alonso et al., 2016). Estas predicciones son:

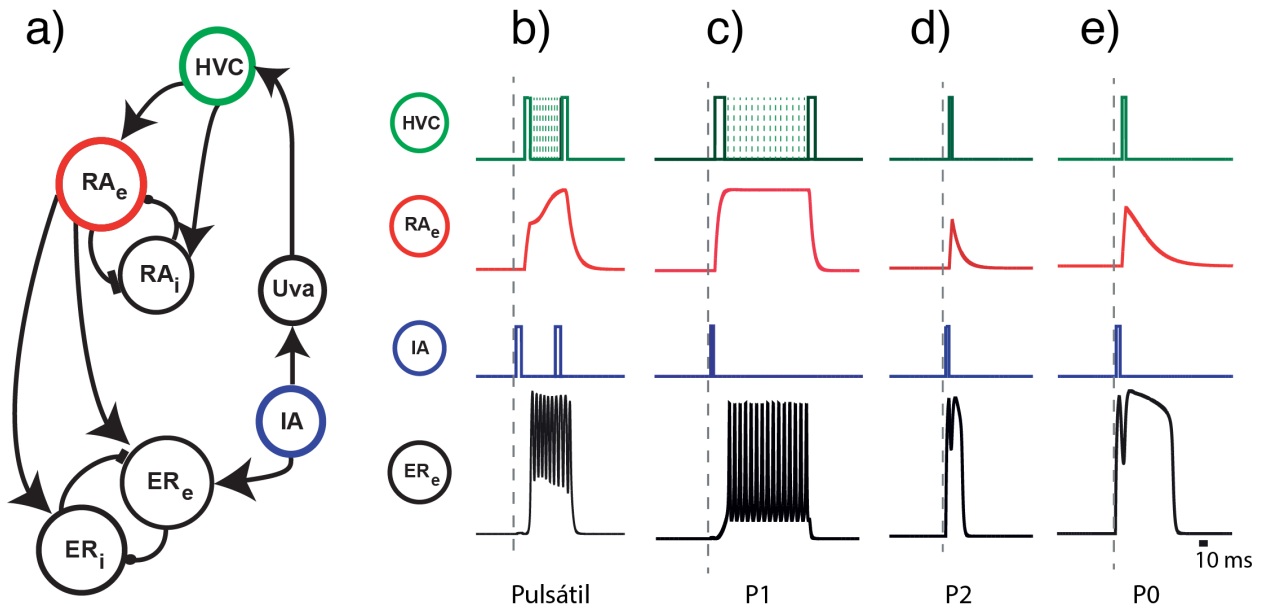


Figura 1.7: Modelo "circular" para el sistema neuronal del canto en canarios. (a) Arquitectura de un circuito mínimo involucrado en la producción del canto. IA, área iniciadora de la actividad (putativamente DM, ver Figura 1.5). La actividad de IA es modelada como un pulso cuadrado de corta duración (del orden de unos pocos milisegundos). Esta actividad es proyectada directamente a un área relacionada con la espiración (ER, putativamente RAm) y al regiones del telencéfalo a través de un relé vía Uva. La actividad es procesada en HVC y proyectada a RA, que también está modelado como un conjunto de poblaciones excitadoras e inhibitorias). Finalmente, la actividad enriquecida por la dinámica de los núcleos en el telencéfalo converge nuevamente en ER, generando los patrones de presión de las 4 familias de sílabas del repertorio de un canario (ver Figura 1.6). (b) Trazas de actividad en los distintos núcleos necesarias para generar los patrones de presión mostrados en la parte inferior. La línea punteada gris marca el comienzo del programa motor en IA. Las líneas punteadas verdes en HVC corresponden a actividad periódica que es compatible - pero no necesaria - para producir los gestos de presión en frases tipo pulsátil y P1. Figura adaptada de (Alonso et al., 2015).

- Ráfagas de actividad en la transición entre sílabas de tipo pulsátil y P1 ocurriendo de manera sincronizada y de forma bilateral.
- La existencia de ráfagas de actividad sincronizada bilateralmente, ocurriendo con un retraso de unas pocas decenas de milisegundos respecto del inicio de cada sílaba P0 y P2. **La predicción en sílabas del tipo P0 es de suma relevancia**, dado que son las sílabas de mayor duración en el repertorio de los canarios y, como tal, para las cuales se maximiza la diferencia entre la hipótesis del reloj y el modelo circular. Acorde a la primera, debería existir una actividad continua durante cada sílaba, mientras que el modelo predice que habrá sólo una instancia de excitación marcada. En la escala de estas sílabas, esto se traduce a "huecos" de instancias marcadas de actividad durante la mayor parte de la duración de la sílaba.

- La existencia de ráfagas breves de actividad al comienzo de un pulso espiratorio del tipo pulsátil.
- Para las sílabas del tipo pulsátil y P1, puede existir un refuerzo periódico de la actividad en HVC con cada sílaba de la frase, además del pulso inicial.
- La existencia de ráfagas de actividad en Uva previo al inicio de cada sílaba, al menos de tipo P0, P2 y al comienzo de frases pulsátiles.

Es importante notar, adicionalmente, que este modelo construye un puente entre la posible actividad en los núcleos del SNC y la salida relacionada con el comportamiento. Esto se logra al incluir una conexión de IA hacia el núcleo nXII, cuyas neuronas motoras inervan directamente la musculatura que rodea la siringe. Modelando la salida en cuanto a gestos de presión y tensión, es posible obtener canto sintetizado con el modelo de producción vocal mostrado en Sección 1.4. Para ver esto en detalle, consultar (Alonso et al., 2016).

1.8. Sobre esta Tesis

En esta tesis está contenido mi trabajo doctoral realizado en el Laboratorio de Sistemas Dinámicos (DF, FCEyN, UBA). Desde mi primer día trabajando en el laboratorio, esta aventura interdisciplinaria estuvo plasmada del conocimiento y la forma de pensar los problemas que - espero - haber captado en mi descripción durante esta introducción. En esta travesía, el liderazgo y la presencia de mi directora, la Dra. Ana Amador fueron cruciales en mi formación. No sólo esto, sino que las preguntas científicas a lo largo de esta tesis vinieron de la mano del desarrollo, puesta a punto e incorporación de tecnologías y técnicas que previamente no estaban disponibles en el laboratorio, lo cual - a pesar de las dificultades en poner a punto una técnica - fue uno de los motivos por los cuales supe que quería trabajar en el laboratorio bajo la dirección de Ana.

Esta tesis, como resultado, es un conjunto de tres historias - divididas en cuatro capítulos - cuyo hilo conector es la filosofía detrás de las preguntas, el objeto de estudio y la metodología de trabajo. En los siguientes dos capítulos (Capítulo 2 y Capítulo 3) detallaré dos series de experimentos realizadas en diamantes mandarines. El eje central de Capítulo 2 tiene su origen en el descubrimiento de que es posible generar respuesta auditiva en neuronas del núcleo HVC con el canto sintetizado a partir de una grabación (Amador et al., 2013). Mi aporte a los resultados de este capítulo fue, en primer lugar, la construcción de una estación para realizar cirugías y registros electrofisiológicos *in vivo* en animales anestesiados (la construcción de esta estación de trabajo y la puesta a punto a partir de las primeras cirugías fue mi trabajo de tesis de Licenciatura) y luego, la parte experimental del trabajo, que consistió en realizar las cirugías y registros

en neuronas del núcleo telencefálico HVC en animales anestesiados. Los resultados de esos experimentos, y que conforman el Capítulo 2 han sido publicados (Boari et al., 2015). A partir de los resultados hallados, en Capítulo 3 se estudió la respuesta de las neuronas de HVC ante una variación acústica del canto, puesto que la codificación neuronal a nivel de ese núcleo aún no son entendidas por completo. Estos resultados también fueron previamente publicados (Boari & Amador, 2018).

Los últimos dos capítulos (Capítulo 4 y Capítulo 5) forman parte de una misma historia y - me atrevo a decir - la más audaz de esta tesis. Actualmente existen dos modelos propuestos para la codificación neuronal en el sistema del canto, planteando dos filosofías científicas diferentes. En una, se considera que la generación del comportamiento está enteramente dictada por el cerebro, y que el cuerpo no hace más que seguir las instrucciones generadas por él (enfoque “de arriba hacia abajo”, o top-down). En otra, se propone que el comportamiento emerge de una relación sinérgica entre el cerebro y la periferia (enfoque “de abajo hacia arriba”, o bottom-up), y plantea que la codificación neuronal del comportamiento requiere una mirada integradora.

El trabajo de esta tesis y, en particular los experimentos que detallaré en Capítulo 4 y Capítulo 5 tienen como objeto aportar al debate entre estas dos filosofías en el canto de aves, en particular al estudiar la validez de las hipótesis propuestas por el modelo circular descrito en Sección 1.7. Esto requirió el cambio de especie de estudio, la incorporación de una nueva tecnología de registros y la descripción de una medida electrofisiológica que no ha sido explorada por completo con anterioridad en aves. Al momento de escribir estas palabras, los resultados contenidos en estos capítulos aún no han sido publicados.

Reconstrucción automática de gestos motores

2.1. Motivaciones

La producción de canto en aves requiere de la coordinación de la actividad de múltiples sistemas sensoriales y motores, como se discutió en Capítulo 1. Dada la gran cantidad de vías e influencias en los circuitos involucrados, resulta un gran desafío conceptualizar cómo es el procesamiento de la información en el sistema del canto. El estudio de los mecanismos físicos detrás de la producción del canto de aves incluyó, a lo largo de los años, la generación de cantos sintéticos con modelos dinámicos simples (Gardner et al., 2001; Laje et al., 2002) y la validación del modelo a partir de mediciones directas de las variables fisiológicas propuestas para controlar la siringe (Mindlin et al., 2003), estableciendo así la relevancia biológica del modelo dinámico. Adicionalmente, se estudió la correlación entre los parámetros dependientes del tiempo necesarios para sintetizar el canto y las mediciones experimentales de las variables motoras involucradas (Perl et al., 2011). Esta línea de investigación permite utilizar a un modelo dinámico de baja dimensión para la producción de canto como un marco en función del cual estudiar las instrucciones de salida del sistema neuronal del canto.

En un trabajo de Amador y colaboradores (Amador et al., 2013) se estudió otra forma de relevancia biológica del modelo de producción de baja dimensión, al mostrar que sonidos sintetizados por el modelo son capaces de generar respuesta en neuronas de HVC (un núcleo sensorimotor del cerebro de las aves canoras, ver Sección 1.6) que son altamente selectivas a presentaciones auditivas del canto propio.

Más allá de la validación de una descripción de baja dimensión para la biomecánica de la

producción del canto de aves, el pequeño número de parámetros dependientes del tiempo requeridos para generar la síntesis (SYN) motivó la introducción del concepto de “gestos” motores en la producción del canto. Estos gestos están conformados por una secuencia de trayectorias que ocurren cerca de bifurcaciones en un espacio formado por parámetros relacionados con la presión de los sacos aéreos y la tensión de los labios en la siringe.

Un resultado importante fue la coincidencia entre los tiempos de los extremos de trayectoria de los gestos (GTE, por su nombre en inglés *gesture trajectory extrema*) y los disparos en estas instancias de neuronas individuales en el núcleo HVC. Este fenómeno permitió conceptualizar la visión alternativa del código neuronal en HVC que dio lugar al modelado descripto en Sección 1.7. Para la generación de canto sintético, un resultado previo mostró que los gestos involucrados en la producción de canto pueden ser recuperados a partir del análisis de una grabación de sonido (Perl et al., 2011). Valiéndose de este resultado, los autores realizaron un proceso algorítmico - aunque manual - para reconstruir los gestos motores involucrados en el canto (Amador et al., 2013). Por este motivo, en ese trabajo se utilizó un conjunto de cantos reducido y de (relativamente) baja complejidad dentro de los repertorios de diamantes mandarines.

En pos de construir una herramienta que pudiera ser adoptada por la comunidad y de evaluar la efectividad del modelo de producción de canto al sintetizar cantos más complejos, la motivación del trabajo contenido en este capítulo fue demostrar la utilidad general de un procedimiento algorítmico y automático para reconstruir las trayectorias de los gestos motores.

En este capítulo introduciré este procedimiento y mostraré el método automático de reconstrucción de gestos y sintetización de canto realista para diamantes mandarines, así como los experimentos realizados para corroborar la relevancia del procedimiento completamente automatizado. En esta evaluación, se retomó la estrategia utilizada a partir de estudiar la respuesta de neuronas en HVC ante presentaciones auditivas de este canto sintético (Amador et al., 2013). Este proyecto fue una colaboración con otro estudiante de doctorado en ese momento en el laboratorio, Yonatan Sanz Perl y con Gabriel Mindlin, quienes son co-autores del trabajo publicado (Boari et al., 2015). Los experimentos contenidos en este capítulo se corresponden, adicionalmente, a los primeros registros electrofisiológicos de actividad neuronal llevados a cabo en el Laboratorio de Sistemas Dinámicos, como parte de mi tesis doctoral.

2.2. Métodos teóricos

2.2.A. Reconstrucción automática de gestos

La primer parte de este trabajo comienza con la automatización del procedimiento para reconstruir los gestos motores a partir de una grabación del canto. Estos gestos están dados por las trazas temporales de los parámetros α y β , relacionados con la presión en los sacos aéreos y

la tensión de los músculos de la siringe, respectivamente (ver Sección 1.4). En principio, tanto α como β pueden ser controlados de manera independiente y por lo tanto, deberían ser ajustados para poder obtener las distintas soluciones. Sin embargo, la variación de SCI a lo largo de las isofrecuencias es pequeña para el rango de valores α donde ocurren las bifurcaciones del tipo SNILC (ver Figura 1.2, (Amador & Mindlin, 2008)). Dado que gran parte de las vocalizaciones de diamantes mandarines ocurren en la cercanía de una bifurcación de este tipo (sonidos con alto contenido espectral), una simplificación asumida por la reconstrucción automática consistió en binarizar el parámetro relacionado con la presión, utilizando un valor de $\alpha_{on} = 0,15$ para representar los estados “encendidos” (es decir, soluciones correspondientes a fonación) y un valor de $\alpha_{off} = -0,15$ para las secciones asociadas a intervalos de silencio. De esta manera, el control de la frecuencia queda determinado por las variaciones de $\beta(t)$. El rango de valores explorado para β para soluciones con diferentes valores de frecuencia fundamental y contenido espectral fue $0,002 \leq \beta \leq 2,99$. Este rango de valores para α y β permitió sintetizar sonidos con frecuencias fundamentales entre 413 Hz y 6780 Hz, que corresponden al rango de frecuencias fundamentales encontradas en los cantos de los diamantes mandarines.

La reconstrucción de los gestos motores involucrados en el canto comienza con el análisis de un canto grabado. Para este proceso, se trabajó con archivos de sonido digitalizados a 44100 Hz. Se realizó un filtro Gabor de ventana deslizante en los datos de los cantos grabados, definiendo segmentos de 1024 muestras centradas en cada punto. Para cada segmento, se aplicó un filtro de Gabor ($\sigma = 220$ muestras). Este filtrado elimina discontinuidades en los bordes de las ventanas tomadas para el análisis espectral, dado por una transformada rápida de Fourier en cada segmento filtrado. En los segmentos correspondientes a fonación, se detectan máximos de manera muy clara por encima de un umbral en el espectro de potencia. Cada segmento que califica como fonación tuvo al menos una frecuencia para la cual la raíz cuadrada de su potencia resultó mayor que 12000 (unidades arbitrarias). Esto corresponde a aproximadamente el 5 % de la potencia en la frecuencia fundamental de una vocalización típica del diamante mandarín.

Si el segmento corresponde a fonación, se identificó el primer pico entre 400 Hz y 8000 Hz como la frecuencia fundamental. El procedimiento se repitió para cada muestra en un intervalo de fonación. Una vez que se obtuvo la frecuencia fundamental para cada segmento de sonido, el valor de β asociado con la frecuencia fundamental más cercana se recuperó de la base de datos mencionada en Sección 1.4. Esto permitió simplificar la tarea de reconstruir los parámetros dependientes del tiempo necesarios para realizar la síntesis. El par ($\alpha = 0,15$; β) calculado en cada intervalo corresponde a los parámetros que impulsan las ecuaciones que gobiernan el comportamiento de los labios de la siringe. Esto constituye una simplificación computacional con respecto a estudios previos (p. ej., el ejemplo mostrado en Figura 1.2), para los cuales se ajustó el par (α, β) a cada segmento para minimizar simultáneamente las diferencias entre el SCI y la frecuencia fundamental de los sonidos sintéticos y los sonidos grabados. Esta simplificación,

sin embargo, no representó una disminución de la dimensionalidad del problema, debido a que todavía se utiliza una medida relacionada con la presión para sintetizar cantos realistas, dada por la envolvente de sonido. Para sintetizar cantos realistas, la envolvente provee un sustituto de la presión en los sacos aéreos. La salida de la fuente de sonido es filtrada por una serie de tubos que conforman el tracto vocal. El filtro final, un resonador de Helmholtz con pérdidas (emulando la cavidad orofaríngea-esofágica), se calculó resolviendo el sistema lineal de ecuaciones diferenciales que representan su circuito equivalente (Perl et al., 2011). En estudios anteriores, los cantos sintetizados con un modelo de resonancia más simple de la OEC no lograron generar respuesta auditiva en las neuronas de HVC (ver Fig. Complementaria 1 en Amador et al. 2013). El elemento final requerido para la síntesis de cantos artificiales fue agregar un nivel de ruido en uno de los parámetros (Perl et al., 2011). Este ruido se agregó al parámetro que representa la tensión labial β , compatible con lo observado en registros de electromiografía (EMG) de la actividad de los músculos que rodean la siringe (observaciones personales de G. B. Mindlin). En las simulaciones mostradas en este capítulo, se agregó ruido gaussiano a β , con una amplitud de tres órdenes de magnitud menor que el rango total. La ausencia de ruido lleva a que los sonidos sintéticos provoquen sólo respuestas débiles en las aves que están dormidas o anestesiadas (ver Fig. 1 complementaria de (Amador et al., 2013)). Los códigos para implementar este procedimiento se pueden descargar desde <http://www.lsd.df.uba.ar>. Para los métodos completos para la sintetización de canto, detallando los parámetros utilizados para los filtros, ver (Boari et al., 2015).

2.3. Métodos experimentales

En Sección 2.2 se detalló análisis de las señales de sonido y la estrategia empleada en la reconstrucción automática de los gestos involucrados en la producción del canto. En esta segunda sección dedicada a métodos se detallan los procedimientos experimentales que llevaron a los primeros experimentos de la medición de actividad neuronal en animales anestesiados en el Laboratorio de Sistemas Dinámicos. El objetivo es validar la estrategia automatizada a partir de utilizar una medida biológica de alta sensibilidad: la respuesta selectiva al canto propio por parte de neuronas en HVC, un núcleo sensorimotor en el cerebro de las aves canoras. Previo a estos experimentos, esta estrategia ya había sido empleada en para evaluar la respuesta de canto sintético (Amador et al., 2013). La diferencia con respecto a los cantos sintéticos generados en ese estudio estuvo dada por el desarrollo del algoritmo de automatización del proceso de generación de canto sintético. Estudiar la respuesta ante el canto sintético no sólo es de interés para validar el proceso de automatización, sino que también permite estudiar la codificación de características sensibles que generan la respuesta selectiva para, de esta manera, comprender el código empleado en HVC en la producción del canto. Los experimentos realizados para este

fin fueron los primeros registros de medición de la actividad neuronal en el laboratorio. Para poder llevarlos a cabo, me valí de la experiencia adquirida durante mi tesis de licenciatura, en la cual diseñamos, construimos y pusimos a punto la infraestructura para realizar experimentos de selectividad en HVC en el Laboratorio de Sistemas Dinámicos (DF, FCEyN, UBA).

2.3.A. Sujetos experimentales

Se realizaron experimentos en diamantes mandarines machos adultos de acuerdo con un protocolo aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Buenos Aires (CICUAL - FCEN-UBA). Los animales fueron obtenidos de criadores locales y mantenidos en el laboratorio, donde tuvieron acceso a comida y agua *ad libitum*.

2.3.B. Estímulos

Para cada sujeto experimental, se llevaron a cabo sesiones de grabación del canto con un micrófono direccional en el interior de una cámara de atenuación acústica. Para cada ave, las grabaciones fueron estudiadas con el fin de poder determinar el motivo de canto y su longitud más representativa. Los estímulos auditivos utilizados durante los experimentos se elaboraron repitiendo un mismo motivo de canto tres veces consecutivas, respetando los tiempos entre motivos encontrados para cada animal. Este procedimiento permite eliminar el grado de variabilidad en la respuesta asociado a presentar motivos con leves variaciones entre sí. Los estímulos presentados incluyeron: 1) canto propio del ave (BOS), 2) BOS presentado temporalmente invertido (REV, en el que la estructura temporal de las sílabas individuales y el orden global de sílabas se invirtieron pero el espectro general fue el mismo que el BOS) 3) canto de un macho adulto conespecífico (CON); y 4) copia sintética generada por una reconstrucción automática de BOS (AUTO). Se presentaron 20 repeticiones de cada estímulo ordenados al azar, con un intervalo entre presentaciones de 10 s.

2.3.C. Cirugías

Para realizar los experimentos, fue necesario realizar una cirugía preparatoria. En esta cirugía, los animales fueron anestesiados con isoflurano (Baxter Healthcare) y ubicados en un dispositivo estereotáxico. Tras aplicar un ungüento de lidocaína al cuero cabelludo (2.5 %, Denver Farma, Argentina), éste se diseccionó a lo largo de la línea media para implantar un poste de acero inoxidable a la parte caudal del cráneo del ave. La unión se realizó con cemento dental y cianoacrilato. Esta cirugía fue realizada dos días previo a los días de registros de actividad en HVC, y la recuperación de la anestesia gaseosa ocurre a minutos del cese de su administración. El fin de este poste implantado en el cráneo del ave es el de fijar la cabeza en un marco estereotáxico construido ad hoc para realizar experimentos en los cuales se presentan estímulos auditivos y, de esta

manera, se evita la obstrucción del canal auditivo con barras en las orejas (arreglo típico de un dispositivo estereotáxico). En la fijación de este poste, el pico y la cabeza quedaron dispuestos en 45deg respecto de la línea horizontal, para poder utilizar las coordenadas de atlas estereotáxicos en la identificación de HVC los días de registro. En los días de los experimentos, los animales fueron anestesiados con uretano al 20 % (60 a 100 μ l en total; Sigma, St. Louis, MO, EEUU) administrado en el músculo pectoral en alícuotas de 20 a 30 μ l a intervalos de 30 minutos. El ave se colocó en una cámara de atenuación acústica y se fijó su cabeza a través del poste montado. Se realizaron pequeñas craneotomías sobre HVC siguiendo coordenadas estereotáxicas, y se abrió la duramadre con una aguja 30G. Los microelectrodos de registro se introdujeron en HVC con un micromanipulador hidráulico de un solo eje (Narishige MO-10).

2.3.D. Registros electrofisiológicos

Los registros se realizaron con microelectrodos de tungsteno de un solo canal (3–5 $M\Omega$, Microprobes). Durante los experimentos, las señales fueron monitoreadas en tiempo real utilizando un osciloscopio (TekTronix TDS 1012) y un monitor de audio (Grass Technologies AM10). Las neuronas HVC se identificaron por coordenadas estereotáxicas, tasas de disparo y la respuesta selectiva al canto propio del ave. Las señales fueron amplificadas y filtradas en la adquisición (amplificador AM Systems, filtros de entrada configurados como pasabanda de 300 Hz a 5000 Hz). Los datos fueron adquiridos con una tarjeta de adquisición de datos (National Instruments DAQ PCI-6251), y la toma de datos fue configurada con códigos desarrollados en MATLAB para este fin. El inicio de la adquisición de datos se sincronizó con el inicio de la presentación del estímulo (retraso <0.03 ms), logrado mediante el uso del bus RTSI en la placa DAQ (bus NI patentado). La frecuencia de muestreo fue ajustó de 20 kHz. En Figura 2.1 se muestra un diagrama de las conexiones de los dispositivos, así como un esquema del campo de trabajo tras la cirugía para acceder con el electrodo a HVC. El “Punto Y” marcado en la figura corresponde al marcador neuroanatómico utilizado como referencia para definir las coordenadas estereotáxicas de HVC. Tras introducir el electrodo, el marco estereotáxico en el que se encuentra el animal permanece en el interior de una sala de atenuación acústica en la cual se encuentra un parlante (utilizado para la presentación de los estímulos) y una cámara web que se utiliza para monitorear al animal mientras la sala de atenuación permanece cerrada.

2.3.E. Análisis y procesamiento de señales neuronales

Clasificación de espigas

La detección y clasificación de espigas en la señal neuronal - correspondientes a potenciales de acción medidos de manera extracelular - se realizó una vez finalizados los experimentos. El

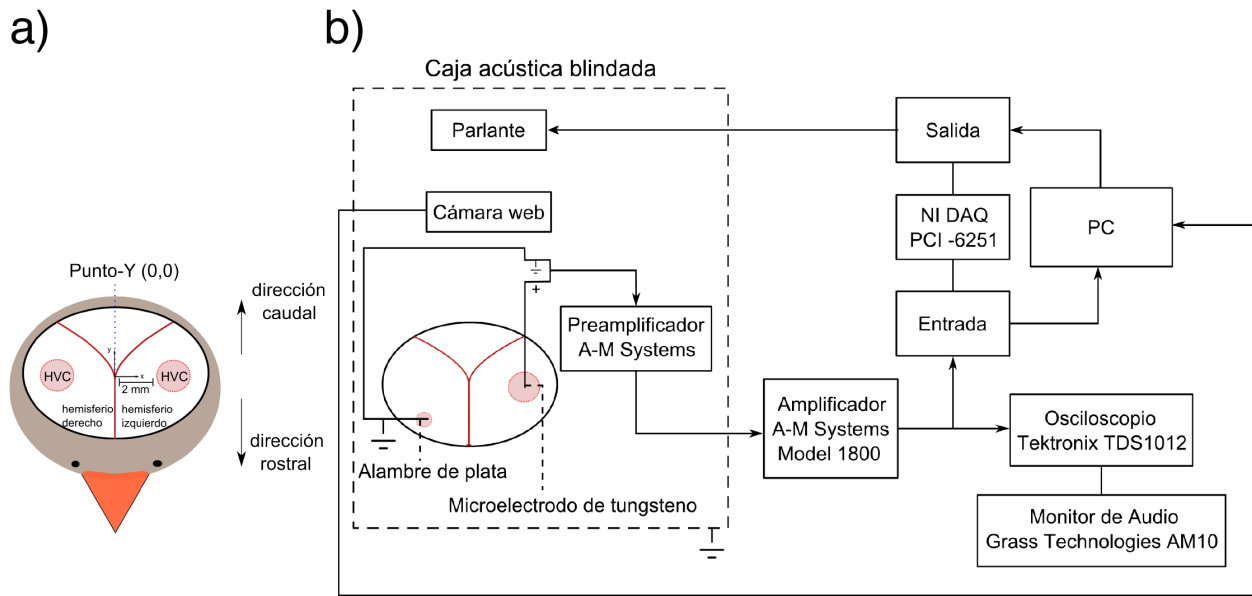


Figura 2.1: Esquema de conexiones durante los registros de actividad electrofisiológica en HVC. (a) Esquema de campo de trabajo durante las cirugías para acceder a medir actividad neuronal en HVC en animales anestesiados. El "Punto Y" marca el punto de referencia utilizado para marcar las coordenadas estereotáxicas de HVC. (b) Conexiones de los dispositivos utilizados durante el experimento. El animal anestesiado se sitúa en el marco estereotáxico utilizado para realizar las cirugías, en el interior de la sala de atenuación acústica. El monitoreo de las señales se realiza en línea a partir de un osciloscopio y un monitor de audio. Las señales fueron pre-amplificadas y amplificadas por un amplificador analógico (AM Systems), con un filtro de entrada entre 300 Hz y 5000 Hz para aislar las espigas neuronales correspondientes a potenciales de acción en la señal. La adquisición fue configurada con la PC y con programas desarrollados para controlar una placa National Instruments.

software utilizado para este fin fue *wave_clus* (Quiroga et al., 2004), una implementación de agrupamiento superparamagnético sobre la descomposición en componentes de ondícula para las formas de onda detectadas. Este programa es semi-supervisado, en el sentido de que presenta una clasificación inicial de manera automática en los distintos grupos de espigas detectados (putativamente, un grupo corresponde a una neurona) que luego debe ser evaluada por un usuario humano. El desempeño del programa fue evaluado a partir de la inspección de las formas de espiga detectadas, su amplitud, distribuciones de intervalos interespiga (ISI, del inglés *interspike interval*) y la separación de los grupos en la proyección de distintos subespacios de coeficientes de ondícula. Los intervalos interespiga son una medida comúnmente utilizada para caracterizar estadísticamente un tren de espigas. En algoritmos de clasificación suele utilizarse, adicionalmente, como una medida posible de la calidad de la separación. Debido al período refractario neuronal, no deberían existir intervalos entre espigas $< 1\text{ ms}$. En caso de existir un gran número de eventos que violen el período refractario, se estaría en presencia de una actividad multiunidad y no de la actividad de neuronas individuales correctamente aisladas.

Típicamente, se aislaron de una a tres neuronas por sitio de registro. Los sitios donde los

registros se degradaron antes de que se presentara el repertorio completo de estímulos fueron descartados del análisis. La salida del proceso de clasificación consiste en una lista de los tiempos de cada evento detectado y la etiqueta de a qué grupo corresponde cada espiga. A partir de la etiqueta del grupo, se obtiene la actividad de las distintas neuronas involucradas y los tiempos en que disparó un potencial de acción.

Cuantificación de la actividad

Tras el proceso de clasificación de espigas se lograron aislar trazas de actividad de neuronas individuales en el registro. Para cuantificar la respuesta a los estímulos presentados, se usó la información conjunta de todos los ensayos correspondientes a un estímulo dado para calcular los histogramas de respuesta PSTH (del inglés *post-stimulus time histograms*). Para computar estos histogramas, se promedia la actividad de los 20 ensayos en ventanas consecutivas de 10 ms durante toda la presentación. La altura de cada columna se normalizó a valores que representan una estimación de la tasa de disparo de la neurona en cada intervalo de la respuesta (espigas /s). Esta normalización requiere dividir el valor del conteo de espigas por la cantidad de ensayos y el ancho de la columna. La caracterización de la respuesta se realizó en términos de las tasas media de disparo y su varianza durante las presentaciones de los estímulos. Un valor medio por sobre la línea de base implica que la tasa de disparo aumentó en respuesta al estímulo, mientras que la varianza se utiliza como un indicador de la presencia de un patrón marcado de excitación en respuesta al estímulo. En todos los casos, las medidas fueron corregidas por los valores correspondientes a la activación espontánea de la neurona, para lo cual se tomó un intervalo de duración igual a la duración del estímulo. Finalmente, estas medidas del nivel de respuesta a los estímulos se normalizaron respecto de la respuesta al canto propio (BOS), de la siguiente manera:

$$RRS_{\frac{X}{BOS}} = \frac{M_X - M_S}{M_{BOS} - M_S} \quad (2.1)$$

$$RRV_{\frac{X}{BOS}} = \frac{\sigma_X - \sigma_S}{\sigma_{BOS} - \sigma_S} \quad (2.2)$$

, donde RRS es la magnitud de respuesta relativa, RRV es la variabilidad de respuesta relativa, X representa AUTO, REV o CON, S representa la actividad espontánea, M indica el nivel de actividad media y σ el promedio de los desvíos estándar a la media durante todo el estímulo. Estas medidas de respuesta relativa han sido utilizadas previamente en el estudio de la respuesta de neuronas individuales en HVC (Margoliash et al., 1994). Se consideró una neurona como selectiva a BOS si presentó una respuesta estadísticamente significativa a BOS en comparación con la actividad espontánea (comparando las tasas medias de disparo, $p < 0,05$, prueba t pareada)

a la vez que presentaba valores de $RRS_{CON,REV/BOS}$ o $RRV_{CON,REV/BOS} < 0,5$, indicando que la respuesta a BOS es de mayor magnitud que a CON y REV.

Adicionalmente a estas medidas de la respuesta, se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson entre los perfiles de actividad para evaluar la similitud del curso temporal entre las respuestas neuronales. La correlación se calculó entre los perfiles de respuesta al canto sintetizado de manera automática (AUTO), el canto de un macho adulto con específico (CON) y el canto propio invertido temporalmente (REV) contra el patrón de respuesta al canto propio (BOS). En este análisis se agrupó la respuesta entre las distintas presentaciones de los motivos que componen el canto en una respuesta promedio para cada estímulo y, para obtener una mejor resolución temporal se realizó un histograma de ventana deslizante (ventanas de 10 ms, frecuencia de muestreo equivalente a la usada en la digitalización de los sonidos), lo que permitió alinear con precisión las respuestas neuronales de los diferentes motivos. Los histogramas de actividad promediada entre motivos fueron suavizadas con un filtro de Savitzky-Golay. Las señales resultantes fueron utilizadas para el análisis de la correlación entre las respuestas. Para los casos de estímulos con motivos de duración distinta (correlación BOS-CON), se rellenó el segmento de la señal más corta con un segmento de la longitud restante correspondiente a una sección de actividad espontánea.

2.4. Resultados

2.4.A. Cantos sintetizados automáticamente

El procedimiento automático presentado en Sección 2.2 transformó un canto grabado en una serie de instrucciones, que luego se utilizaron para sintetizar sonidos realistas a partir del sistema dinámico dado por (Ecuación 1.3). En Figura 2.2 se muestra un ejemplo. Una inspección visual detallada da cuenta de las similitudes entre el canto grabado para un diamante mandarín (a) con el canto sintetizado AUTO (b). En ambos casos se muestra tanto la traza de sonido como el sonograma. El poder del modelo dinámico se refleja en cómo captura el contenido espectral de sonidos con distintas frecuencias fundamentales a partir de un reducido número de parámetros.

Una inspección detallada de los sonogramas muestra que, para algunas sílabas, las frecuencias fundamentales estimadas de los sonidos sintetizados tienden a ser más bajas que las frecuencias fundamentales en los cantos naturales. Por ejemplo, esto puede observarse en la figura a partir de la inspección de la tercera sílaba del canto (Figura 2.2a)) con las sílaba correspondientes en AUTO, así como también en la comparación de las últimas sílabas entre ambos cantos. En estos ejemplos, ambas sílabas en el canto natural presentan una estructura armónica clara, y muestran frecuencias fundamentales menores en el canto sintetizado automáticamente. Otra limitación del procedimiento automático es que tampoco captura completamente las caracterís-

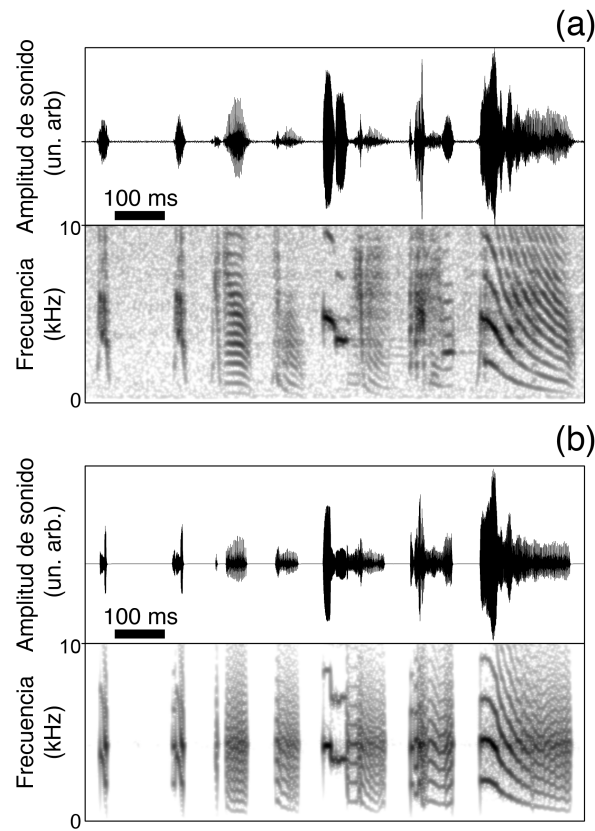


Figura 2.2: Grabación y síntesis de canto de aves. (a) Canto grabado de un diamante mandarín macho adulto (traza de sonido, panel superior; sonograma, panel inferior) y (b) canto sintetizado automáticamente. Las instrucciones motoras reconstruidas automáticamente fueron capaces de producir una copia sintética que captura tanto la frecuencia fundamental como el contenido espectral de los segmentos de fonación.

tics de los sonidos aperiódicos más complejos (ver, por ejemplo, el comienzo de la anteúltima sílaba en Figura 2.2). Sin embargo, a pesar de esto el tiempo de las transiciones entre los distintos intervalos de vocalización se reproduce fielmente.

La reconstrucción automática de los parámetros dependientes del tiempo se realizó para los cantos de cinco diamantes mandarines machos adultos. Esto dio como resultado la exploración de una amplia gama de sílabas estereotipadas dentro del repertorio de los diamantes mandarines. El rango de frecuencias fundamentales exploradas con estos cantos (de ≈ 400 Hz a 6.7 kHz) se representa en el modelo a partir de las diferencias en las trayectorias de los parámetros que las generan. El procedimiento automatizado de síntesis de canto a partir de la reconstrucción de las instrucciones utilizando un canto grabado resulta robusto en el rango de vocalizaciones exploradas. Esto significa que el modelo fue capaz de reproducir tanto la frecuencia fundamental como el SCI de cada segmento de sonido. Adicionalmente, se desarrolló una herramienta para la detección automática de las transiciones de gestos o GTE discutidas en Sección 1.4. Dado

que está más allá del foco de estos resultados, este método puede consultarse en el trabajo publicado (Boari et al., 2015).

2.4.B. Experimentos electrofisiológicos

Dada la selectividad a BOS de las neuronas de HVC por sobre cantos conespecíficos (Margoliash, 1986; Margoliash & Konishi, 1985) y la sensibilidad de estas neuronas a cambios leves en los parámetros acústicos del canto propio (Margoliash, 1983; Theunissen & Doupe, 1998), un estándar fuerte para probar el modelo de producción vocal es si los cantos sintéticos pueden producir respuesta en las neuronas HVC o no. Anteriormente, cantos sintetizados con supervisión experta (SYN) fueron capaces de evocar esta actividad selectiva en neuronas de HVC (Amador et al., 2013). En estos experimentos, sin embargo, se evaluó si era posible obtener resultados compatibles con la versión totalmente automatizada del canto sintético (AUTO).

A las aves anestesiadas se les presentó BOS, CON, REV y AUTO como estímulos auditivos. Un ejemplo de registro para una neurona aislada con el procesamiento y análisis de clasificación de espigas se muestra en Figura 2.3. Las respuestas a BOS y AUTO son mucho más fuertes que las respuestas a REV y CON. Además, existe un patrón temporal claro de excitación que es consistente para todos los ensayos en BOS y AUTO. Adicionalmente, los patrones de actividad en respuesta a ambos estímulos son comparables entre sí. Este resultado es de particular interés teniendo en cuenta las simplificaciones del modelo y la selectividad a BOS de las neuronas de HVC. En total, se logró aislar la actividad de veinte neuronas de HVC selectivas a BOS para un total de cinco aves, con neuronas que fueron medidas en uno a cinco sitios de registro por ave. Para las 20 neuronas, el valor medio para $RRS_{CON/BOS}$ fue de $0,20 \pm 0,22$. Esto es comparable al promedio de la respuesta media CON/BOS de $(0,16 \pm 0,34)$ obtenida para una muestra más grande de unidades individuales de HVC en un estudio previo en diamantes mandarines anestesiados (Margoliash et al., 1994). Por lo tanto, los dos conjuntos de datos reflejan distribuciones similares.

Se obtuvieron resultados similares a los mostrados en Figura 2.3 para las 20 neuronas analizadas. Éstas mostraron excitación tónica en respuesta a BOS y probablemente fueron interneuronas de HVC (Hahnloser et al., 2002). Para cuantificar la respuesta, se calcularon los PSTH y se consideró tanto la respuesta media al estímulo como su varianza (ver Subsección 2.3.E). La primera cantidad refleja si la respuesta general es mayor durante la presentación del estímulo, reflejado por aumentos en la tasa de disparo. En los registros, la tasa de disparo media durante la presentación a BOS llegó a valores de 70 espigas/s, mientras que el máximo valor medio durante segmentos de disparo espontáneo estuvo en el rango de 0.5–26 espigas/s. Con las medidas de actividad, se calcularon RRS y RRV (ver Subsección 2.3.E).

La varianza refleja si existe un patrón formado por la excitación en la presentación del es-

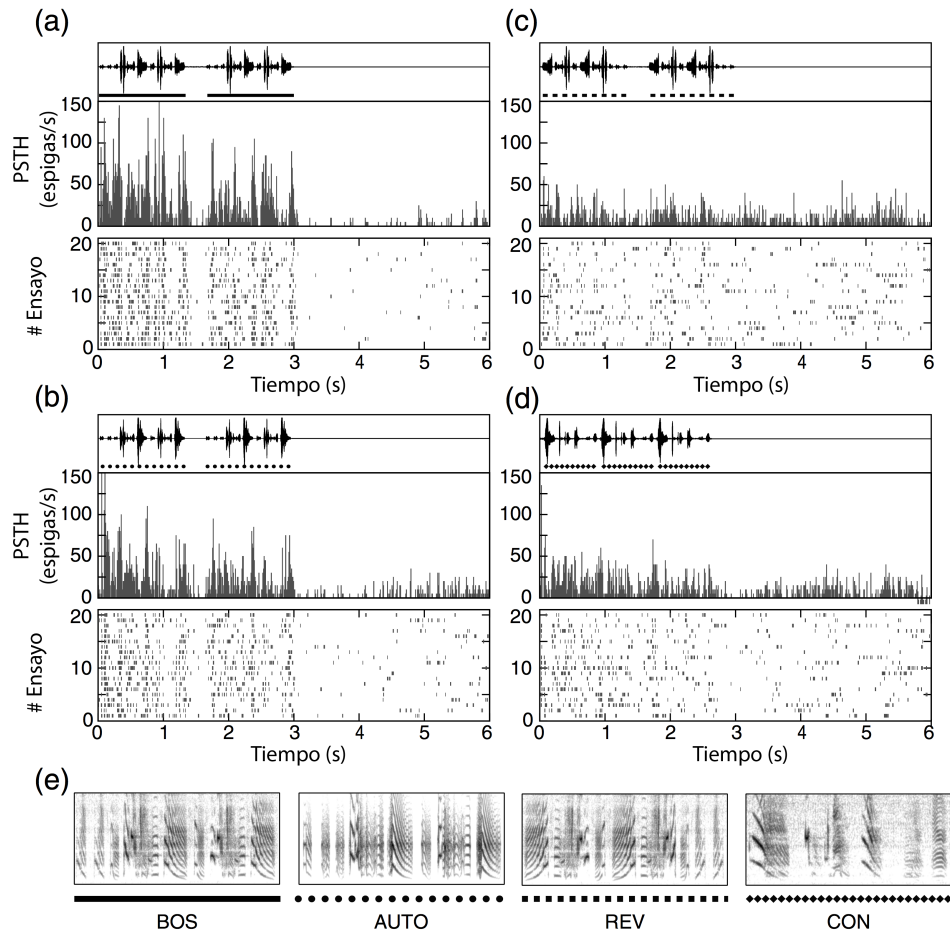


Figura 2.3: Experimento de selectividad neuronal en HVC. Respuesta de una neurona única de HVC a presentaciones auditivas de diferentes estímulos. El protocolo consistió en 20 presentaciones auditivas organizadas al azar de cada estímulo. La actividad neuronal se procesó a través de un algoritmo de clasificación de espigas (wave_clus). (a – d): gráficos de los eventos de disparo para los 20 ensayos (parte inferior), histogramas de respuesta (PSTH; panel del medio) y la señal de sonido de cada estímulo presentado (panel superior). (e) Sonogramas correspondientes a un motivo de canto para cada uno de los estímulos presentados. Los patrones de símbolos en la parte inferior de cada motivo son los mismos que los presentes en (a-d). La actividad obtenida como respuesta al canto propio del ave (BOS; a) presenta un patrón bien definido de actividad excitadora e inhibitoria; mientras que en (b) se muestra un patrón de actividad similar provocado por el canto sintetizado automáticamente (AUTO). c y d muestran que la neurona presenta una actividad débil en respuesta a las presentaciones del canto en reversa (REV) y a presentaciones del canto de un macho adulto de la misma especie (CON).

tímulo, mientras que el RRV mide la magnitud de ese patrón en comparación con el BOS. En Figura 2.4 se muestran los resultados agrupados de todos los experimentos ($n = 5$ aves, $N = 20$ neuronas individuales con respuesta selectiva de HVC). Los símbolos muestran el valor alcanzado en cada protocolo para las neuronas analizadas, y superpuesto a esto se muestran el valor medio y su desvío estándar (como una barra de error). Dado que estas son mediciones relativas a BOS, un valor de 1 significa el mismo nivel de respuesta que BOS y un valor de 0, que no hay actividad significativa en respuesta a ese estímulo en particular por sobre la línea de base.

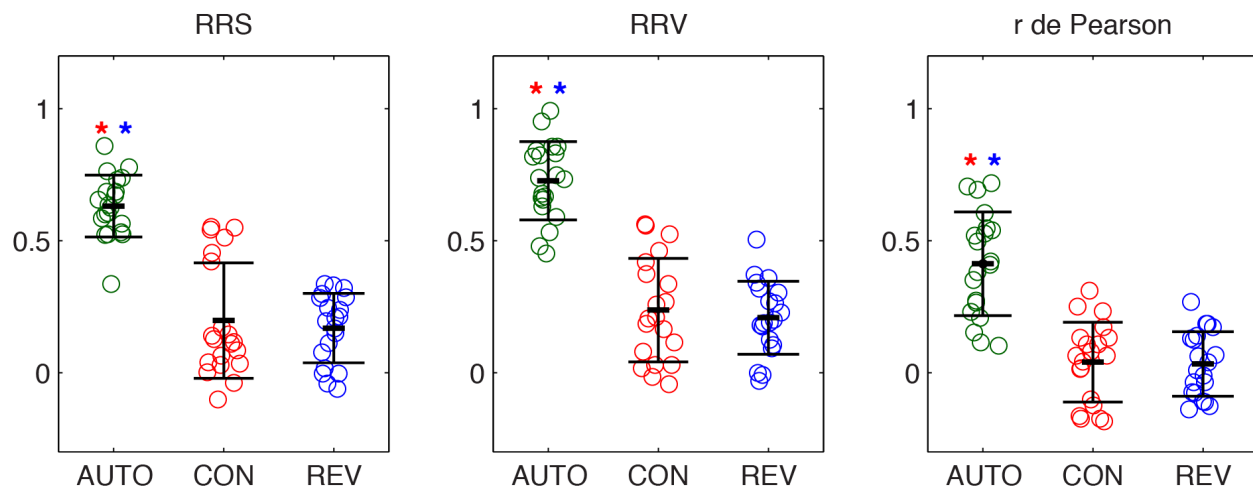


Figura 2.4: Resultados agrupados para la magnitud de respuesta y su variabilidad. Resultados para el conjunto de experimentos realizados ($n = 5$ aves, $N = 20$ neuronas individuales de HVC). Las líneas sólidas representan el valor medio y las barras de error representan $\pm$ SD de cada conjunto de datos. RRS: magnitud de respuesta relativa ($RRS_{\frac{x}{BOS}}$; ver Ecuación 2.1). La respuesta a AUTO fue mayor a la respuesta a CON y REV, dado por valores medios de $RRS_{\frac{AUTO}{BOS}} = (0,63 \pm 0,12)$, que es significativamente mayor que la media de $RRS_{\frac{CON}{BOS}} = (0,20 \pm 0,22)$ y $RRS_{\frac{REV}{BOS}} = (0,17 \pm 0,13)$. RRV: variabilidad de respuesta relativa ($RRV_{\frac{x}{BOS}}$; ver Ecuación 2.2). El valor promedio $RRV_{\frac{AUTO}{BOS}} = 0,73 \pm 0,15$ resultó ser significativamente mayor que la media de $RRV_{\frac{CON}{BOS}} = (0,24 \pm 0,20)$ y que la de $RRV_{\frac{REV}{BOS}} = (0,21 \pm 0,14)$. Las mediciones se corrigieron en todos los casos por la tasa de disparo espontánea de cada unidad. Coeficiente de correlación (r de Pearson): coeficientes de correlación por pares, lo que dio lugar a una media rBOS frente a AUTO = $0,41 \pm 0,20$, que es significativamente mayor que la media rBOS frente a CON = $0,04 \pm 0,15$ y media rBOS frente a REV = $0,03 \pm 0,12$. * indica prueba t pareada ($p < 0,001$).

En términos de la magnitud y la variabilidad de la respuesta, los cantos sintetizados con parámetros reconstruidos automáticamente provocaron un nivel de actividad significativamente mayor que el canto en reversa y que el canto de un macho adulto conespecífico (prueba t pareada, $p < 0,01$). Cabe destacar que el valor medio de $RRS_{\frac{AUTO}{BOS}}$ es $0,63 \pm 0,12$, significativamente mayor que el valor promedio de $RRS_{\frac{CON}{BOS}}$ y $RRS_{\frac{REV}{BOS}}$, que son $0,20 \pm 0,22$ y $0,17 \pm 0,13$, respectivamente. Para RRV se obtuvieron resultados similares: el valor promedio de $RRV_{\frac{AUTO}{BOS}}$ es de $0,73 \pm 0,15$, mientras que el valor promedio de $RRV_{\frac{CON}{BOS}}$ es de $0,24 \pm 0,20$

y el valor promedio de $RRV_{REV/BOS}$ es de $0,21 \pm 0,14$. Las características del patrón de excitación en la respuesta al canto propio también se observan en las respuestas a AUTO Figura 2.3. Esto queda, en parte, reflejado por los valores hallados para $RRV_{AUTO/BOS}$, que indican un alto nivel de variabilidad en la respuesta. En otras palabras, AUTO no sólo fue capaz de producir un aumento en la actividad de disparo de las neuronas HVC, sino que también lo hizo con un patrón marcado de actividad. Para cuantificar la similitud de la evolución temporal de las respuestas, se calcularon los coeficientes de correlación lineal por pares (coeficiente r de Pearson) entre las respuestas neuronales a BOS contra las respuestas a AUTO, CON y REV. Los coeficientes de correlación resultantes fueron: AUTO vs. BOS $0,41 \pm 0,20$, REV vs. BOS $0,03 \pm 0,12$, y CON vs. BOS $0,04 \pm 0,15$. Las distribuciones de datos de las cuales emergen estos valores medios son mostradas en Figura 2.4, en el panel derecho. Las barras de error mostradas en la figura indican $\pm SD$.

Estos resultados muestran que hay un patrón temporal de respuesta compartido por los estímulos AUTO y BOS presentados, con la correlación AUTO vs. BOS significativamente mayor que las correlaciones REV vs. BOS y CON vs. BOS (prueba t de dos muestras, $p < 0,001$). Sin embargo, la correlación está aún lejos de ser 1 (respuestas idénticas entre AUTO y BOS). Queda como pregunta abierta si la correlación entre AUTO y BOS sería mayor en aves dormidas en vez de anestesiadas. En resumen, estos resultados muestran que AUTO es capaz de obtener respuestas significativas en unidades individuales de HVC al aumentar la tasa de disparo de las neuronas analizadas (análisis de los valores RRS), que lo hace con la presencia de un cierto patrón de excitación (análisis de los valores RRV), y que estos patrones de respuesta, aunque no son idénticos, comparten algunas de las características del curso temporal con patrones provocados por BOS (análisis de correlación de Pearson).

2.5. Discusiones

La respuesta de neuronas selectivas de HVC ante presentaciones del canto sintético, tanto en su versión SYN (Amador et al., 2013) como AUTO (Boari et al., 2015) constituyen una validación del modelado de baja dimensión para producción de vocalizaciones en aves. El funcionamiento de la biomecánica no lineal puede ser reducido a un sistema de ecuaciones con un número reducido de parámetros de control. Estos parámetros, además, están relacionados con variables fisiológicas que el ave puede controlar durante el canto. Este avance dio lugar a la interpretación de las instrucciones motoras en término de “gestos” relativamente sencillos que son capaces de impulsar la generación de canto sintético realista. Por este motivo, los parámetros dependientes del tiempo del modelo pueden considerarse como un sistema de coordenadas plausibles para interpretar la codificación neuronal involucrada en la producción del canto en aves. Típicamente, el análisis de las vocalizaciones se realiza en términos de características acústicas como la fre-

cuencia fundamental, la amplitud y alguna medida de la entropía de la señal (Sober et al., 2008; Tchernichovski et al., 2000). Los mecanismos físicos involucrados (y en particular, las bifurcaciones involucradas en el inicio de las oscilaciones labiales) vinculan varias de estas características acústicas, como frecuencia fundamental y contenido espectral. En diamantes mandarines, esto da como resultado instrucciones simples que se transducen en sonidos que tienen relaciones precisas entre frecuencia fundamental y contenido espectral. De manera similar, la forma del patrón de presión del saco aéreo determina la naturaleza del ataque del sonido y, por lo tanto, su timbre (una característica acústica multidimensional y difícil de describir cuantitativamente).

Los sonidos sintéticos generados con el procedimiento automático de reconstrucción de gestos fueron capaces de provocar respuestas en neuronas HVC selectivas al canto propio. Esto es notable, dada la dramática caída de la respuesta informada en trabajos anteriores al variar los parámetros del modelo de producción (Amador et al., 2013). Tanto en términos de actividad media como de varianza, las neuronas respondieron significativamente a los sonidos generados a partir de la integración de las ecuaciones físicas impulsadas por los gestos reconstruidos. Las respuestas a los cantos obtenidos por el proceso automático (AUTO) tienen un coeficiente de correlación significativamente mayor al canto propio que el canto en reversa o el canto de un macho adulto de la misma especie. Esto significa que las respuestas al canto original y al sintético comparten algunas características en su evolución temporal. Nunca está claro, *a priori*, si el paradigma de la física de reducir drásticamente la complejidad de un problema dará lugar a una descripción pertinente de él. Cuando se trata de sistemas biológicos, este problema se vuelve particularmente relevante, ya que los sistemas generalmente expresan una enorme cantidad de grados de libertad. En este trabajo, sin embargo, se mostró que un modelo de baja dimensión puede dar lugar a cantos que son biológicamente relevantes, en el sentido de que pueden provocar respuestas de neuronas altamente selectivas al canto propio en un núcleo neuronal del cerebro de las aves. De esta manera, un modelo simplificado puede proveer un marco en el cual pensar un problema, como una herramienta de generación de predicciones que se conviertan en hipótesis a probar con los experimentos. De manera más general, la metodología de análisis de la biomecánica del sistema periférico en términos de sus propiedades físicas y la generación de modelos dinámicos no lineales para reproducir el comportamiento también se puede extender a otros sistemas, allanando el camino desde el sistema nervioso central hasta el control de los dispositivos periféricos a cargo de ejecutar las acciones implicadas en el comportamiento.

Codificación de la envolvente de sonido

3.1. Motivaciones

La identidad de un sonido complejo generalmente está determinada por múltiples características. El timbre es una propiedad acústica multidimensional, que permite distinguir diferentes sonidos de igual tono, intensidad y duración. El tiempo de ataque, una dimensión acústica del timbre, se define como el tiempo transcurrido entre el inicio del sonido hasta la amplitud máxima de la envolvente. Adicionalmente, el tiempo de ataque es una característica importante en la asignación de una identidad percibida a una fuente de sonido. Una estrategia ampliamente utilizada para estudiar sistemáticamente las dimensiones que componen el timbre es relacionar las diferencias acústicas entre los sonidos con los cambios percibidos por sujetos experimentales. Estudios anteriores han abordado esto realizando tareas de percepción utilizando estímulos auditivos naturales (por ejemplo, discriminación de instrumentos musicales) o realizando experimentos con sonidos sintetizados para explorar el espacio del timbre (Caclin et al., 2005; Iverson & Krumhansl, 1993; McAdams et al., 1995). Curiosamente, se ha demostrado que los animales pueden percibir y discriminar las características acústicas que se cree que subyacen a la percepción del timbre de una manera similar a la de los humanos (para una artículo de revisión, ver (Town & Bizley, 2013)).

Por otro lado, la respuesta neuronal selectiva del núcleo HVC presenta una oportunidad para estudiar la representación neuronal del timbre en las aves canoras y su relación con la identidad del sonido. Además, como se mencionó en Capítulo 1, en HVC se observan patrones neuronales similares durante el canto y la audición de una reproducción del canto propio, lo que sugiere que en este núcleo hay un código neuronal compartido para las entradas auditivas y las salidas motoras (Prather et al., 2008). Los sonidos naturales en el canto del diamante mandarín tienen envolventes distinguibles: cada sílaba tiene su forma específica, y muchas de ellas son muy asi-

métricas. En el capítulo anterior se mostraron los resultados de presentar a animales anestesiados reproducciones de canto sintetizado con un modelo de producción vocal. Aunque las neuronas presentaron respuesta a los estímulos sintéticos, la respuesta siempre fue menor que al canto original, indicando que algunas de las características del canto no fueron completamente capturadas por el estímulo sintético. Para profundizar el conocimiento de las características del canto que están siendo codificadas en el núcleo HVC, en este capítulo introduzco experimentos en diamantes mandarines. En estos experimentos se puso a prueba la hipótesis que la estructura temporal de la envolvente del sonido es una característica acústica relevante en la codificación del canto propio del ave. Para esto, se estudiaron las respuestas auditivas de neuronas de HVC ante presentaciones de un canto con envolvente modificada (MOD) y se compararon estas respuestas con la generada por presentaciones del canto propio del ave. De esta manera, se utilizó el paradigma de selectividad introducido en Capítulo 2.

3.2. Métodos

3.2.A. Análisis de sonido y modificaciones

Modificación de la envolvente de sonido

Para generar el canto modificado (MOD), se calculó la envolvente de un canto previamente grabado. La envolvente fue computada a partir de la detección de picos positivos en la señal de sonido y realizando una interpolación cúbica entre los puntos encontrados (frecuencia de muestreo: 20 kHz, intervalo mínimo entre dos picos: 1 ms). Los inicios y los finales de sílabas se detectaron aplicando un umbral de amplitud relativa en la envolvente (2 % del valor máximo). Entre cada inicio y final de sílaba, se realizó una inversión temporal de la envolvente, y el canto modificado se produjo multiplicando la señal de sonido original por el cociente entre las envolventes modificada y original. De esta manera, se obtuvo una señal de sonido que conserva la estructura temporal del canto propio al mismo tiempo que presenta una envolvente modificada, como se muestra en Figura 3.1.

Las sílabas que presentan discontinuidades en las trazas de frecuencia fundamental se subdividieron en notas (ver Figura 1.1) y se aplicó el mismo procedimiento que el anterior a cada segmento (ver Figura 3.1, sílaba D). Esto evitó la división por valores cercanos a cero en la vecindad de estas discontinuidades agudas y permitió una transición suave entre los sonidos original y modificado. En Figura 3.1 se resume todo el proceso. En (a), el panel superior presenta la señal de sonido del canto del ave con su envolvente superpuesta (línea roja, desplazada verticalmente para la figura) y el panel inferior muestra su sonograma. En (b), en cambio, se muestra la señal de sonido modificada y su envolvente (línea azul en el panel inferior de Figura 3.1b). Una inspección detallada de las envolventes, la señal de sonido y los sonogramas revelan los

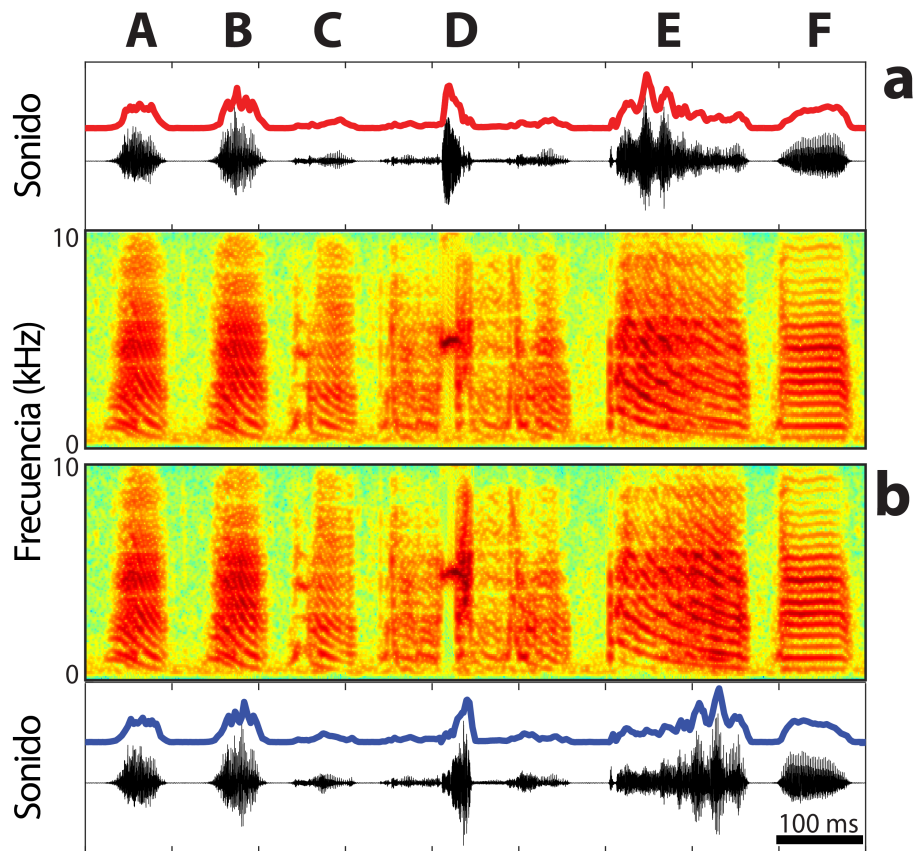


Figura 3.1: Ejemplo de canto propio del ave (BOS) y del canto con envolvente modificada (MOD). (a) Señal de un ejemplo de BOS, su envolvente obtenida por interpolación cúbica de picos en la señal (panel superior; línea roja desplazada verticalmente) y el sonograma del canto (panel inferior). La inspección de la envolvente revela que algunas sílabas presentan una envolvente simétrica (sílabas A, B y C), mientras que otras son altamente asimétricas (sílabas D, que es una sílaba compleja compuesta por 3 segmentos distintos y sílabas E y F). (b) Sonograma del canto modificado (MOD, panel superior), señal de sonido y envolvente (panel inferior). La envolvente para cada sílaba se invirtió sin afectar la estructura temporal global, las modulaciones de amplitud de la sílaba, el centroide espectral ni la irregularidad espectral encontrada en el canto original.

cambios introducidos en el estímulo: los tiempos de ataque y liberación de cada sílaba han sido efectivamente intercambiados, sin modificar la estructura temporal global del espectro.

Características del timbre de los cantos

Dada cualquier señal de sonido, una modificación arbitraria de la misma podría inducir cambios en la estructura temporal o en sus propiedades espectrales. Para inspeccionar las diferencias espectrales entre los cantos propios y modificados por envolvente, se midieron el centroide e irregularidad espectrales, ya que estas son medidas estándar en la caracterización del timbre (Krimphoff et al., 1994). El análisis espectral se realizó mediante la transformada de Fourier de corta duración en segmentos de 10 ms (ventana gaussiana de 10 ms de duración, $\sigma = 1ms$ y superposición del 90 % de datos entre segmentos). De esta manera, cada segmento de análisis de estas características espectrales estuvo separado por 1 ms dentro de cada sílaba. El centroide espectral (SC) y la irregularidad espectral (IRR) se calcularon para cada segmento como:

$$SC = \sum_{n=1}^N \frac{f(n)x(n)}{\sum_{n=1}^N x(n)} \quad (3.1)$$

$$IRR = \log_{10} \left(\sum_{n=2}^{N-1} \left| 20\log_{10}(x(n)) - \left(\frac{20\log_{10}(x(n-1)) + 20\log_{10}(x(n)) + 20\log_{10}(x(n+1))}{3} \right) \right| \right) \quad (3.2)$$

, donde $f(n)$ representa la frecuencia central de la columna de frecuencia n y $x(n)$ su magnitud para los $N = 100$ intervalos de frecuencia en el rango 0–10000 Hz. Para cada par de cantos original y modificado (BOS y MOD, respectivamente), se calcularon las diferencias relativas medias entre SC e IRR para cada sílaba. Adicionalmente, también se estudió la evolución temporal de las diferencias relativas entre estas magnitudes dentro de cada sílaba del canto. Con este objetivo, se calculó un promedio ventaneado para los cuantificadores espectrales usando ventanas no superpuestas de 5 ms. Estas trazas de tiempo fueron utilizadas para evaluar la diferencia relativa en SC e IRR entre el canto original y modificado, para segmentos intrasilábicos.

3.2.B. Experimentos de electrofisiología

Los experimentos realizados en este capítulo tienen una similitud metodológica con los experimentos descritos en Sección 2.3. La estrategia para evaluar la presencia de diferencias en la codificación del canto natural y el canto modificado fue estudiar diferencias en la activación de las neuronas del núcleo HVC ante presentaciones auditivas de los distintos estímulos. Los experimentos fueron realizados en diamantes mandarines machos adultos, que fueron alojados en jaulas individuales en su estadía en el laboratorio. En las jaulas, los animales tuvieron acceso a comida y agua *ad libitum* y su ciclo de luz/oscuridad se fijó en 14h/10 h, respectivamente. La

diferencia principal con los experimentos descritos en el capítulo anterior tienen que ver con los estímulos presentados al animal durante el experimento. El detalle de las cirugías y el sistema de adquisición y monitoreo de las señales es el mismo que se describió en Sección 2.3.

Estímulos presentados

Para cada individuo, las sesiones de grabación del canto tuvieron lugar antes de que se realizara cualquier cirugía. Las sesiones de grabación consistieron en colocar un diamante mandarín macho adulto en su jaula dentro de una cámara de atenuación de sonido y grabar el sonido usando un micrófono direccional. Para cada ave, el motivo estereotipado y la longitud del canto más común se evaluaron mediante la inspección de las grabaciones usando Praat (Boersma & Van Heuven, 2001). Para reducir la variabilidad en las representaciones de motivos durante el experimento, la traza de sonido del BOS presentado se creó copiando el motivo de canto seleccionado tantas veces como se encontró originalmente en el canto más común. Esto normalmente conducía a tener un BOS que comprendía notas introductoras y tres copias del mismo motivo. Pero, en algunos casos, sólo se necesitaron dos copias del motivo para cubrir la duración más probable del canto. Para cada ave, el conjunto de estímulos para el experimento fue: (1) canto propio del ave (BOS); (2) canto modificado en envolvente (MOD); (3) canto de un macho adulto conespecífico (CON) y (4) canto propio reproducido en reversa (REV). MOD es el estímulo objetivo para el que se estudian las respuestas relativas a BOS, mientras que los estímulos (3) y (4) son controles comúnmente utilizados para evaluar la selectividad de la respuesta auditiva de las neuronas de HVC. REV se usa ya que preserva la estructura espectral mientras invierte la estructura temporal de todo el canto. Esto no debe confundirse con los cambios inducidos en MOD, en los que se invirtió la envolvente de cada sílaba dejando intacta la evolución temporal de la estructura espectral. Por último, dado que REV no es un sonido natural, CON completa el grupo de control presentando un canto natural de la misma especie. CON se seleccionó a partir de un conjunto de BOS previamente registrado de diamantes mandarines macho adultos de modo que su duración fuera aproximadamente la misma que la longitud del canto del sujeto.

Procesamiento y análisis de las señales neuronales

Las medidas de actividad neuronal y el procesamiento de las señales fue también similar a lo descrito con anterioridad. Luego de los experimentos, las señales registradas fueron analizadas con un algoritmo de clasificación de espigas para separar las neuronas individuales que presentan actividad selectiva en respuesta al canto propio, y utilizar la actividad de estas neuronas para evaluar la diferencia en la percepción auditiva debido al canto modificado en envolvente. Como en los experimentos de Capítulo 2, el software utilizado fue wave_clus (Quiroga et al., 2004), y para las trazas de actividad correspondientes a neuronas individuales se cuantificó la respuesta

en términos de los histogramas de actividad promediada en ensayos (histogramas temporales post-estímulo, PSTH). En este análisis, se utilizaron ventanas de 10 ms y se normalizó la cantidad de cuentas detectadas por este ancho y la cantidad de ensayos, obteniendo un estimador de la tasa de disparo de cada neurona. Cada sitio de registro produjo registros de actividad típicamente de 1 a 3 neuronas diferentes. Las grabaciones en las que la señal degradara durante el protocolo de medición no se incluyeron en el análisis. Sobre los PSTH, se calculó la fuerza relativa de respuesta (RRS, Ecuación 2.1) y su variabilidad (RRV, Ecuación 2.2), como se describió en Subsección 2.3.E. Recordar que estas medidas cuantifican la tasa promedio de disparo y su varianza en respuesta al estímulo. Ésta última medida indica, adicionalmente, la presencia de un patrón de excitación en respuesta al estímulo, mientras que la primera indica sólo un aumento/decremento de la actividad promedio respecto de la actividad basal de la neurona.

Para estudiar las respuestas a nivel de motivos individuales de canto, se calcularon los perfiles de actividad del motivo (MAP, del inglés *Motif Activity Profile*) a partir de histogramas de ventanas deslizantes (ventana de 10 ms, frecuencia de muestreo: 20 kHz) para la respuesta a cada estímulo y alineando la respuesta a repeticiones del motivo. La señal del MAP fue suavizada adicionalmente con un filtro Savitzky-Golay de segundo orden. Como las notas introductorias se presentaron sólo una vez por presentación de estímulo, no se consideraron en este análisis. Esta respuesta promediada en motivos permitió estudiar diferencias sutiles en las respuestas a los motivos de BOS y MOD, y complementa la cuantificación de la respuesta a escala global que proporcionan las medidas RRS y RRV. Sobre los MAP obtenidos, se estudió la presencia de picos prominentes en respuesta al estímulo. La amplitud de cada pico presente en el MAP se definió como la diferencia entre el valor de amplitud del pico y el valor tomado por el perfil en los mínimos adyacentes. Con esto, se estudió la distribución de amplitudes de todos los picos en todas las respuestas. Para considerar un pico de activación robusto, se impuso como umbral a cada instancia que ésta superara en amplitud al valor medio de las amplitudes de todos los picos en al menos 2 desviaciones estándar. Luego, se definió la respuesta relativa entre el canto modificado (MOD) y el canto propio (BOS) como el cociente entre las amplitudes de los picos prominentes en ambas señales, constituyendo una medida denominada amplitud relativa media ($MRA_{MOD/BOS}$, del inglés *Mean Relative Amplitude*).

En general, la respuesta puede dividirse en disparos fásicos a una instancia marcada del motivo (en cuyo caso, $MRA_{MOD/BOS}$ está representado por un único cociente de amplitudes de los picos de activación) o en disparos tónicos con aumento de tasa de disparo durante distintas instancias. En estos casos, el MAP presentó más de un pico prominente y el valor $MRA_{MOD/BOS}$ reportado es el valor promedio entre todos los cocientes de amplitud entre la respuesta al canto modificado y al canto propio. Esto se hizo para dar pesos iguales a los resultados de todas las neuronas, independientemente de si cada neurona individual presentó uno o varios picos significativos en la respuesta. Para los datos agrupados, presentamos el promedio y la varianza

de la distribución de $MRA_{MOD/BOS}$. Dado que el MAP de las neuronas HVC selectivas para CON y REV no presentan picos prominentes, sólo se estudió la diferencia en la respuesta utilizando la medida dada por el MRA para el caso del canto modificado y el canto propio del ave. Sin embargo, con este análisis también pueden reproducirse las medidas de RRS y RRV, y se encontró que los dos pares de distribución eran indistinguibles (pruebas t de dos muestras, $p > 0.01$; prueba para $RRS_{MOD/BOS}$, $p = 0,38$ y prueba para $RRV_{MOD/BOS}$, $p = 0,54$).

3.3. Resultados

Para poner a prueba la hipótesis de que la estructura temporal de la envolvente de sonido es una característica relevante en la codificación neuronal del canto propio, se desarrolló un método para generar cantos modificados. En particular, se realizó una modificación a la evolución temporal de la envolvente, pero se mantuvo la estructura temporal del contenido espectral. En Figura 3.1 se mostró un ejemplo del canto modificado (MOD), en el que se extrajo la envolvente de sonido del canto original para cada sílaba y se la invirtió temporalmente (ver el detalle en Sección 3.2). Los cantos modificados fueron realizados previo a los registros electrofisiológicos, y en cada caso se evaluaron las diferencias entre las características espectrales dadas por el centroide espectral (SC, Ecuación 3.1) y la irregularidad espectral (Ecuación 3.2). Para cada par de cantos (original y modificado), se calcularon las diferencias relativas medias entre estas magnitudes para cada sílaba. Los análisis se realizaron en un total de 22 sílabas provenientes de los cantos de 5 pájaros. Ambos cantos resultaron indistinguibles en término de estas cuantificaciones. En cuanto a SC, las diferencias entre las sílabas originales y modificadas no presentaron una desviación significativa de una distribución normal de media cero (prueba t pareada, $p = 0,34$), con la media de la distribución de diferencias en SC dada por $SC_{MOD/BOS} = (-0,6 \pm 2,9) \times 10^{-3}$, donde $\pm$ indica desvío estándar. Lo mismo resultó para IRR (prueba t pareada, $p = 0,85$), con una distribución de diferencias media $IRR_{MOD/BOS} = (-0,1 \pm 3,6) \times 10^{-3}$. Las diferencias tomadas como valor absoluto presentaron medias de distribución de $SC_{MOD/BOS} = (1,9 \pm 2,3) \times 10^{-3}$ e $IRR_{MOD/BOS} = (2,3 \pm 2,7) \times 10^{-3}$. Como los cambios en la amplitud del sonido pueden cambiar las propiedades espectrales cuando la ventana de análisis es más pequeña que una sílaba, también se estudió la evolución temporal de los cuantificadores espectrales dentro de cada sílaba. Agrupando los datos de las 5 aves utilizadas en los experimentos, se tuvo un total de 530 instancias temporales en las cuales se analizaron las diferencias relativas en SC e IRR. Se encontró que sólo un pequeño número de instancias temporales presentaron diferencias mayores al 3% (2% de los puntos para SC, 2.8% para IRR) y que solo 0.2% y 0.4% de los puntos de evolución temporal presentaron diferencias mayores al 5% para SC e IRR, respectivamente. Finalmente, la diferencia absoluta máxima encontrada para cualquier instancia dada fue 5.4% para SC y 5.2% para IRR. Las distribuciones de diferencias relativas de las trazas de evolución temporal para

SC e IRR en el interior de las sílabas tienen un gran número de valores agrupados cerca de cero, arrojando diferencias de medias de $(-0,5 \pm 7,4) \times 10^{-3}$ (donde $\pm$ representa SD) para SC y $(-0,1 \pm 1,2) \times 10^{-2}$ para IRR. Estadísticamente, las distribuciones de diferencia relativa son indistinguibles de una distribución normal de media cero (prueba t pareada, $p = 0,17$ para SC y $p = 0,61$ para IRR). Para más detalles sobre las cuantificaciones espectrales, consultar el material suplementario de (Boari & Amador, 2018).

En conjunto, estos resultados muestran que la modificación realizada sobre el canto fue exitosa, en el sentido de que modificó la evolución temporal de la envolvente del canto, pero no introdujo cambios significativos en las características espectrales de los cantos. Según lo revelado por el análisis espectral detallado, pequeñas variaciones del canto original pueden ocurrir en algunas pocas instancias temporales dentro de cada sílaba. Sin embargo, estos cambios están en su mayoría dentro del 3 % con respecto al valor original. En la escala de una sílaba, estos cambios son muy pequeños, como se reportó arriba. Durante los experimentos de medición de actividad neuronal en el núcleo HVC, se presentó a las aves un conjunto de estímulos auditivos: el canto propio (BOS), el canto modificado (MOD), el canto de un macho adulto conespecífico (CON) y el canto propio reproducido en reversa (REV). Se lograron aislar 21 neuronas selectivas de HVC en cinco aves, surgiendo de 2 a 5 sitios de registro por ave. En Figura 3.2 se muestra un ejemplo de la actividad de una neurona selectiva al canto propio, y cómo el canto modificado fue capaz de generar respuestas comparables, aunque presentando sutiles diferencias.

La selectividad se determinó a partir de que la actividad en respuesta al estímulo fuera significativamente mayor que la actividad espontánea (prueba t pareada, $p < 0,01$) y que presentara valores ($RRS_{CON,REV/BOS}$ y $RRV_{CON,REV/BOS} < 0,5$). Como en este trabajo el foco fue evaluar si las modificaciones acústicas en el canto propio (BOS) conducían a cambios en la respuesta neuronal de HVC, las neuronas que no fueran selectivas ($RRS_{CON,REV/BOS}$ y $RRV_{CON,REV/BOS} \geq 0,5$) se omitieron del siguiente análisis. Para las 21 neuronas selectivas, la respuesta media promedio CON/BOS fue $(0,17 \pm 0,11)$, que es comparable a las respuestas medias promedio CON/BOS reportadas en estudios previos $(0,16 \pm 0,34)$, (Margoliash et al., 1994), $(0,20 \pm 0,22)$ (Boari et al., 2015), lo que sugiere una distribución subyacente compartida. En la respuesta de neuronas selectivas de HVC, como la mostrada en Figura 3.2, hay un patrón temporal preciso de activación en la respuesta al canto propio (Figura 3.2a), pero no al canto de un macho adulto de la misma especie (Figura 3.2c) ni al canto reproducido en reversa (Figura 3.2d). La señal de sonido de los cantos se muestran en los paneles superiores de cada subfigura, y sus respectivos sonogramas se muestran en (e). Curiosamente, la respuesta al canto modificado (MOD) conservan el perfil de actividad de la respuesta al canto propio (BOS). Sin embargo, la amplitud máxima de la respuesta para MOD tiende a ser menor que para BOS. Esto sugiere que las neuronas selectivas a BOS en HVC pueden ser susceptibles a cambios sutiles de la envolvente del canto. Para cuantificar esta observación, se calculó la fuerza de respuesta relativa (RRS, del inglés *Relative Response Strength*)

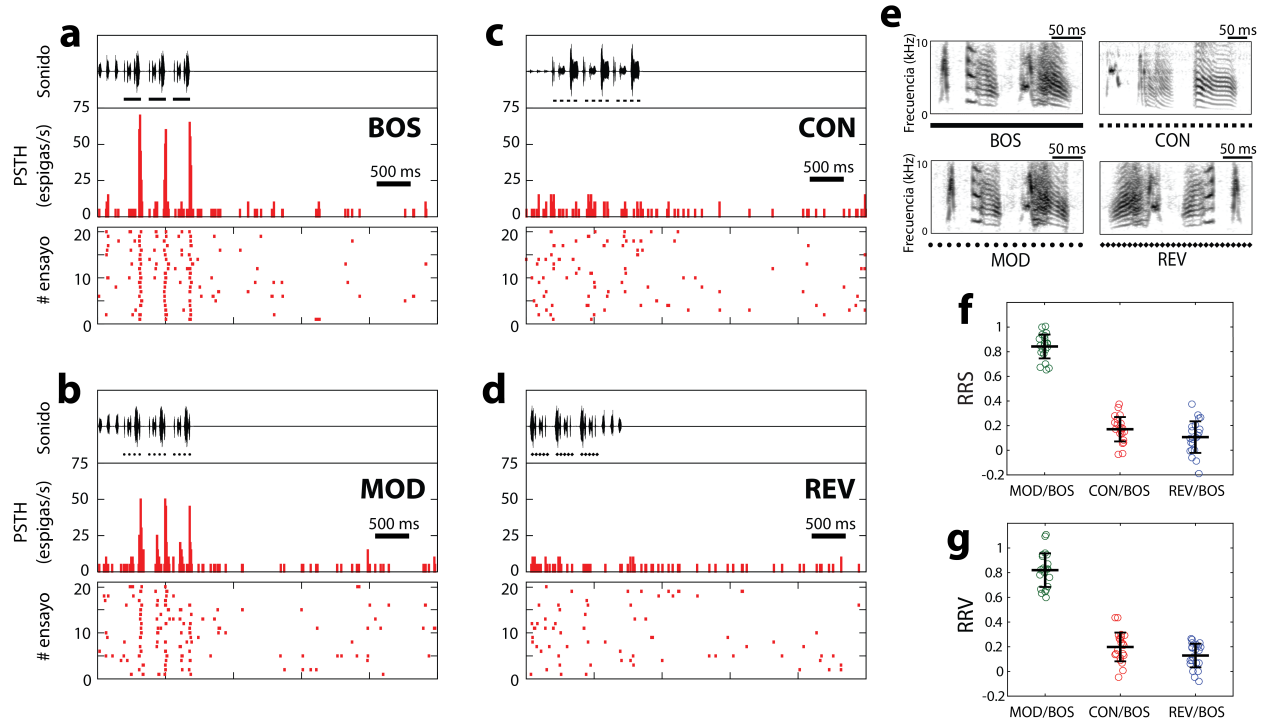


Figura 3.2: Respuestas selectivas de HVC para estudiar las bases neuronales del procesamiento de la envolvente del canto. (a-d) Eventos de disparo y sus histogramas promediados (PSTH, ver texto) para una neurona de HVC registrada en un protocolo de un ave. Se llevaron a cabo 20 ensayos y los estímulos se presentaron al azar. Los disparos (panel inferior) muestran que hay un patrón claro de activación en respuesta al canto propio (BOS, a) y al canto modificado (MOD, b), pero no así al canto de un macho de la misma especie (CON, c) o al canto propio reproducido en reversa (REV, d). La respuesta neuronal es más fuerte para el canto propio. El patrón visto en (a) se mantiene en (b), aunque con una amplitud más baja. Los paneles superiores de cada subfigura muestran las señales de sonido y las barras codificadas por patrones indican cada motivo del canto. (e.) Sonogramas para los motivos de cada uno de los estímulos presentados en el experimento. Notar la similitud en la evolución del espectro entre BOS y MOD. Las medidas de actividad global relacionadas con actividad media como RRS (f.) y variabilidad de respuesta, RRV (g.) muestran que para 21 neuronas selectivas de HVC, las respuestas a MOD son significativamente menores que las respuestas a BOS (pruebas t pareadas; $RRS_{MOD/BOS} = 0,84 \pm 0,10$, $p = 1,1 \pm 10^{-6}$, $RRV_{MOD/BOS} = 0,82 \pm 0,14$, $p = 1,3 \pm 10^{-5}$, pero significativamente mayores que las de CON y REV (pruebas t pareadas, $p < 0,01$ $RRS_{CON/BOS} = 0,17 \pm 0,11$, $RRS_{REV/BOS} = 0,11 \pm 0,14$, $RRV_{CON/BOS} = 0,20 \pm 0,12$, $RRV_{REV/BOS} = 0,13 \pm 0,10$. Estos resultados muestran que la estructura de la envolvente de sonido es una característica cuantificable y que está siendo percibida en la discriminación del canto propio en neuronas de HVC altamente selectivas.

y la variabilidad de respuesta relativa (RRV, del inglés *Relative Response Variability*), tal como se definieron en Sección 2.3. RRS y RRV son medidas globales de la respuesta, ya que consideran el nivel medio y la variabilidad de la respuesta al estímulo, respectivamente. En el primer caso, se evalúa la presencia de significancia en la actividad respecto de la actividad espontánea, mientras que la segunda medida se utiliza como cuantificador de la presencia de un patrón marcado de excitación.

En Figura 3.2 (f,g) se muestran los datos agrupados para todos los experimentos ($n = 5$ aves, $N = 21$ neuronas individuales selectivas de HVC). En estas subfiguras se muestra el valor individual de los cuantificadores utilizados para cada neurona, el valor medio de la distribución (línea horizontal sólida) y las barras de error que indican ± 1 desvío estándar. Los valores medios obtenidos fueron $RRS_{MOD/BOS} = 0,84 \pm 0,10$, $RRS_{CON/BOS} = (0,17 \pm 0,11)$ y $RRS_{REV/BOS} = (0,11 \pm 0,14)$. Para RRV se encontraron resultados similares: el valor medio de $RRV_{MOD/BOS} = (0,82 \pm 0,14)$, mientras que el valor medio de $RRV_{CON/BOS} = (0,20 \pm 0,12)$ y $RRV_{REV/BOS} = (0,13 \pm 0,10)$. Estos datos agrupados muestran que, aunque hay selectividad para el canto modificado (MOD) sobre el canto de un conespecífico (CON) y el canto en reversa (REV), la respuesta a MOD es significativamente menor que la respuesta al canto propio (BOS). Esto se representa en que los valores medios de las distribución para $RRS_{MOD/BOS}$ y $RRV_{MOD/BOS}$ son inferiores a 1 (pruebas t , $p = 1,1 \times 10^{-6}$ y $p = 1,3 \times 10^{-5}$, respectivamente).

Como se indicó anteriormente, aunque los valores significativamente menores a 1 muestran que la respuesta a MOD disminuye, esta cuantificación puede no ser la más adecuada para explicar en detalle el cambio en la respuesta. Como puede verse en Figura 3.2a, las neuronas de HVC muestran patrones marcados de excitación. Durante los períodos de baja tasa de actividad, las variaciones de tasa de disparo son difíciles de cuantificar. Debido a que RRS y RRV consideran el intervalo completo de la presentación del estímulo, que incluye partes significativas donde la actividad está inhibida, esta medida no resulta apropiada para medir los cambios sutiles en la respuesta. Por lo tanto, la medida complementaria utilizada consistió en estudiar una respuesta promediada para cada motivo de canto.

La observación de los datos reveló que uno de los efectos más salientes es que el patrón general de excitación en respuesta a MOD es similar al de BOS pero que, sin embargo, la actividad relacionada con MOD alcanza un nivel más bajo de activación. En otras palabras, los picos presentes en los histogramas de actividad en respuesta a MOD ocurren al mismo tiempo que en el caso de BOS, pero con una amplitud menor (ver Figura 3.2a,b). Para cuantificar esta observación, se obtuvo el perfil de actividad del motivo como se describió previamente (MAP, ver Subsección 3.2.B). Las respuestas neuronales tienen diferentes características dependiendo de si son provocadas por una neurona tónica (Figura 3.3 a,b) o por una neurona fásica (Figura 3.3 c,d). Al comparar la amplitud de los picos prominentes del perfil de actividad, se consideraron los cambios en el patrón de respuesta neuronal que ocurren en ciertas instancias durante el motivo

en lugar de promediar la actividad en toda la presentación del estímulo.

Siguiendo esta idea, se definió la amplitud relativa media MOD/BOS ($MRA_{MOD/BOS}$, ver Subsección 3.2.B) para cuantificar las diferencias de amplitud entre los picos de activación. La media de los valores obtenidos para $MRA_{MOD/BOS}$ resultó ser $(0,73 \pm 0,16)$ y se encontró que era significativamente menor que 1 (prueba t, $p = 2,5 \times 10^{-7}$). En Figura 3.3 se muestra el cálculo para cada respuesta neuronal, el valor medio y las barras de error dadas por ($\pm$ la desviación estándar de la muestra). Diferentes neuronas en HVC pueden presentar diferentes perfiles de actividad en respuesta a los mismos estímulos acústicos (por ejemplo, a BOS), con una variación sustancial en el número de picos por neurona y en sus amplitudes. Esto podría ser el origen de la alta variación encontrada en los valores de MRA, pero no se encontró una relación clara entre los valores de $MRA_{MOD/BOS}$ y los estímulos acústicos o el tipo de respuesta neuronal. Los valores bajos para MRA (es decir, $MRA_{MOD/BOS} < 0,55$) están distribuidos a lo largo de los individuos, y por lo tanto, no se encontró ninguna correlación entre esta característica y las propiedades acústicas estudiadas.

Dado que los picos prominentes se calcularon a partir de una respuesta promediada entre los ensayos, la menor amplitud de los picos más prominentes muestra una disminución en las tasas de activación para MOD con respecto a BOS, como ya se pudo ver a escala global mediante RRS y RRV. Estos resultados muestran que los cambios en las características temporales de la envolvente de sonido del canto propio pueden provocar un efecto medible en la respuesta auditiva de las neuronas HVC como una diferencia en las tasas de disparo alcanzadas. Al invertir la envolvente de sonido de cada sílaba, se mantuvieron sin cambios significativos tanto las propiedades globales del espectro así como el valor máximo de la envolvente. De esta forma, se mostró que la evolución temporal de la envolvente es una característica relevante codificada en el sistema neuronal del canto, específicamente cuando se cambian los tiempos de ataque y liberación.

3.4. Discusiones

Los resultados que surgieron en este trabajo muestran que la estructura temporal de la envolvente es una característica relevante para la discriminación de estímulos por parte de las neuronas en HVC. Debido a que la envolvente de sonido de muchas sílabas tiene una forma asimétrica para el canto de diamantes mandarines, revertir la envolvente permutó los tiempos de ataque y liberación. Para estas sílabas, las neuronas podrían estar percibiendo una diferencia en el tiempo de ataque, así como una falta de coincidencia con la envolvente esperada. Vale la pena mencionar que la discriminación sonora es una tarea compleja mediada, en principio, por múltiples señales. Un estudio reciente de comportamiento en estorninos europeos (*Sturnus vulgaris*) mostró que las aves dependen de la forma espectral de los sonidos en lugar de la frecuencia fundamental para discriminar estímulos auditivos (Bregman et al., 2016). Por otro lado, otros

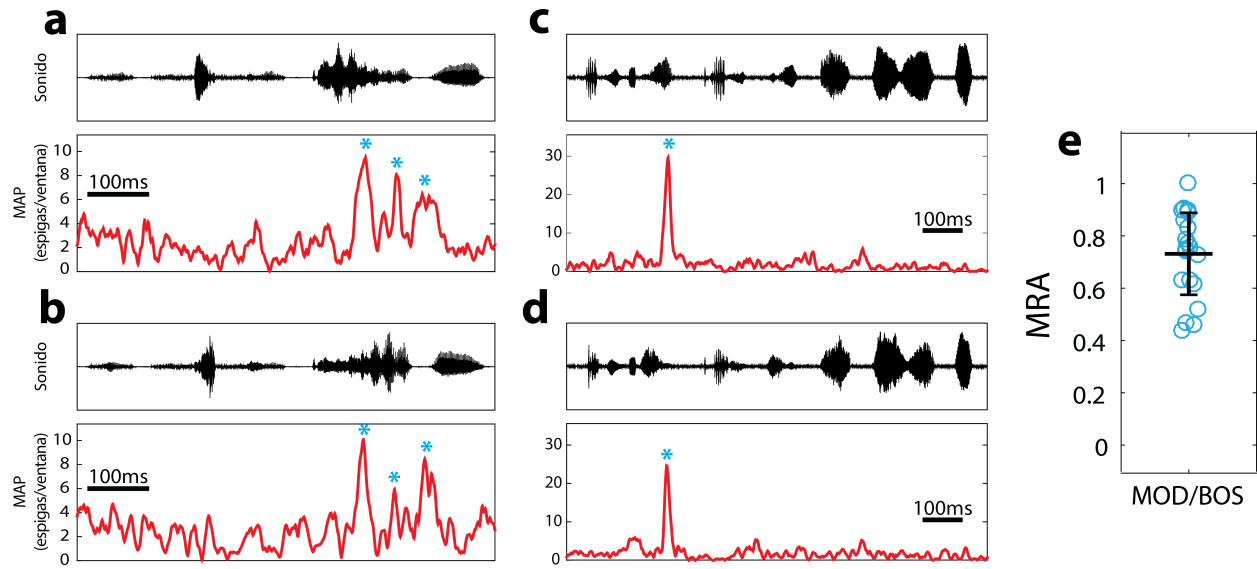


Figura 3.3: Perfil de actividad neuronal promediado por motivo (MAP). Como una medida localizada, complementaria a la proporcionada por RRS y RRV, el perfil de actividad neuronal se calculó promediando la actividad neuronal en respuesta a cada estímulo con ventanas deslizantes de 10 ms. El primer ejemplo (a,b) muestra el perfil de actividad para en respuesta al canto propio (BOS, (a)) y al canto modificado en envolvente (MOD, (b)) para una neurona tónica de HVC. Los asteriscos (*) indican picos prominentes, seleccionados de la cola de la distribución de amplitudes de todos los picos detectados (mayor que 2σ de la media de la distribución). Las amplitudes relativas (MRA) se calcularon como el cociente entre los picos en el MAP en respuesta a MOD y sus respectivos picos en el MAP en respuesta a BOS. Para las neuronas tónicas, MRA se calculó haciendo un promedio de todos los picos prominentes encontrados en el perfil de actividad. Las neuronas fásicas generalmente presentan un pico de actividad único y más agudo que los que se encuentran en las respuestas de neuronas tónicas. El efecto descrito anteriormente también está presente aquí, con actividad que alcanza una amplitud mayor a BOS (c) que a MOD (d). La distribución de los valores medios de amplitud relativa permite un mayor contraste en la cuantificación del efecto de los cambios en tiempo de ataque en el reconocimiento auditivo del canto propio (e), arrojando un valor de amplitud relativa media $MRA_{MOD/BOS} = (0,73 \pm 0,16)$, que es significativamente menor que 1 (prueba t, $p = 2,5 \times 10^{-7}$). Estos resultados muestran que los cambios en la envolvente del sonido generan cambios en la respuesta auditiva de las unidades de HVC.

experimentos psicofísicos mostraron que las aves no son particularmente más sensibles que otros vertebrados a las características temporales lentas de un sonido, conocidas como características de la envolvente (Dooling et al., 2000). Sin embargo, Dooling y colaboradores han demostrado que los diamantes mandarines parecen ser extremadamente sensibles a la estructura fina temporal del sonido tanto en estímulos sintéticos como en vocalizaciones naturales (Dooling & Prior, 2017; Dooling et al., 2002). Los experimentos presentados en este capítulo probaron un régimen intermedio en el que la envolvente se modificó invirtiendo la evolución temporal. Esto generó una modificación del tiempo de ataque para algunas sílabas, pero en otras los cambios fueron modulaciones sutiles de las envolventes.

Trabajos previos han demostrado que, para los diamantes mandarines, existe una correlación

positiva entre la presión de los sacos aéreos y la frecuencia fundamental de los sonidos generados (Riede & Goller, 2010; Ritschard & Brumm, 2011). Adicionalmente, al introducir cambios en la presión de los sacos durante el canto se producen modificaciones de frecuencia fundamental que siguen al perfil de presión (Amador et al., 2013), lo cual puede ser explicado a partir del modelo biomecánico de baja dimensión para el órgano vocal mostrado en Sección 1.4. El análisis dinámico detallado del sistema que describe la fuente de sonido mostró que existen restricciones para el desempeño acústico, que pueden surgir de la exploración en el espacio de parámetros relacionado con las variables fisiológicas controladas por el ave durante la fonación (Perl et al., 2011).

Además, se han utilizado herramientas experimentales y teóricas para probar la hipótesis de que las aves que producen sonidos tonales como el canario doméstico (*Serinus canaria*) modulan la frecuencia tanto por la tensión de los labios en la siringe como por la presión en los sacos aéreos (Alonso et al., 2014). Para los pinzones bengalíes (*Lonchura striata domestica*), la actividad electromiográfica (EMG) de músculos individuales presentan correlaciones con múltiples propiedades acústicas de las sílabas, (Srivastava et al., 2015). De esta forma, revertir la envolvente para el canto modificado generó algunas sílabas que podrían estar contradiciendo el sustrato biomecánico del canto. Como las modulaciones de presión de los sacos aéreos están relacionadas con modulaciones de amplitud de sonido y los patrones de presión durante el canto son altamente estereotipados (Franz & Goller, 2002), podría ocurrir que la modificación de la envolvente en el canto modificado esté produciendo señales mixtas para las neuronas de HVC en términos del perfil de amplitud esperado, incluso si la evolución temporal espectral fue sólo ligeramente modificada. Esto podría ser particularmente relevante para HVC ya que este núcleo neuronal integra entradas auditivas y motoras. Además, las neuronas en el sistema del canto muestran una correspondencia auditivo-vocal precisa, que se asemeja a las neuronas espejo (Dave & Margoliash, 2000; Prather et al., 2008). Por lo tanto, una mayor comprensión de los mecanismos de producción vocal también podría arrojar luz sobre qué características del canto son relevantes para las respuestas auditivas al canto propio en HVC. La alta selectividad en HVC es el resultado de un procesamiento jerárquico de las neuronas de la vía auditiva, que presentan diferentes niveles de selectividad a BOS en diferentes núcleos del sistema (Theunissen et al., 2004).

Codificación del canto en HVC: mediciones de potencial de campo (LFP)

4.1. Motivaciones

El objetivo principal del trabajo en esta tesis consiste en avanzar el conocimiento sobre la codificación neuronal de un comportamiento vocal aprendido como es el canto. En concurrencia con el desarrollo del trabajo contenido en la presente tesis, se hicieron evidentes las limitaciones del estudio enfocado en diamantes mandarines. En particular, estos individuos poseen un canto de corta duración (típicamente hasta 1.5 segundos de largo de motivo). Debido a las características de las sílabas que componen el canto de la especie, éstas pueden tener un gran número de transiciones de gestos motores (trazas temporales de variables que controlan la mecánica periférica) durante el canto. Todo esto implica que las transiciones entre gestos (o GTE, discutidos en Sección 1.4) pueden encontrarse muy cerca entre sí. Esto hace que la hipótesis del reloj y el modelo de gestos motores sean indistinguibles a partir de registros neuronales en los cuales las ráfagas de actividad ocurren con una escala de tiempo similar a la distancia entre transiciones. La dificultad de interpretar la actividad de las neuronas registradas en términos de instancias significativas de la señal acústica se agrava aún más debido a que los gestos motores y, por lo tanto, los cantos entre distintos individuos de la especie pueden variar sustancialmente. Esto complica, a su vez, el agrupamiento de los datos provenientes de distintos individuos.

Por otro lado, existen especies de aves canoras para las cuales las vocalizaciones pueden ser más fácilmente clasificadas. Tal es el caso del canario doméstico (*Serinus canaria*), lo cual representa una oportunidad valiosa: en esta especie, los gestos de presión involucrados en las distintas vocalizaciones están conservados entre los individuos de la especie. Por esto, el canto

de cualquier canario adulto puede ser clasificado en 4 familias de tipos silábicos (Alliende et al., 2010).

Para aprovechar la posibilidad de agrupar datos provenientes de distintos sujetos experimentales, se decidió mantener el foco originalmente planteado pero migrando el estudio a otra especie de aves canoras: los canarios domésticos, para los cuales, en adición a las bondades antedichas, se tiene el marco provisto por el modelo circular discutido en Sección 1.7. Éste es un modelo del sistema neuronal del canto, capaz de reproducir como salida las entradas necesarias para el modelo de producción vocal y, de esta manera, también es capaz de producir canto sintético realista. De gran importancia resultan las predicciones específicas sobre la actividad poblacional de los núcleos durante la producción vocal, en particular para el núcleo telencefálico HVC (Alonso et al., 2016). Fue central para el desarrollo de este capítulo y el siguiente estudiar un observable en los registros que permitiera evaluar las predicciones generadas por el modelo.

A pesar del cambio de especie, la pregunta a responder se mantiene, debido a que el modelo circular captura el concepto de las transiciones de gestos motores o GTE, originalmente planteados para el canto de diamantes mandarines. Esto es porque independientemente del conjunto definido como GTEs relevantes en la codificación del canto, la actividad en HVC según el modelo circular presenta ráfagas de un gran nivel de actividad en instancias significativas de la producción motora.

En este capítulo y el siguiente, se discutirán los desarrollos, la tecnología incorporada al laboratorio y la puesta a punto de la técnica para poder llevar a cabo un nuevo tipo de registro, así como los resultados obtenidos. Los registros aquí presentados corresponderán, como en los capítulos previos, a registros extracelulares en animales anestesiados. Si bien esto provee evidencia indirecta de la actividad neuronal durante el canto, la estrategia de animal anestesiado permitió explorar la distribución espacial de la actividad en HVC y sentar las bases para una línea de experimentos posterior, que corresponde al trabajo de tesis doctoral de una compañera en el laboratorio (Cecilia T. Herbert).

4.2. Métodos

4.2.A. El canto de los canarios

A diferencia del canto de los diamantes mandarines, los canarios presentan cantos que son más largos y más variables. El motivo de canto de un diamante mandarín está compuesto por una secuencia de sílabas; cada sílaba producida una única vez. Los cantos de un canario, en cambio, presentan una secuencia de “frases”, donde cada frase está compuesta por la repetición de una misma sílaba múltiples veces. Estas frases pueden presentarse una única vez o ser repetidas durante el canto. En la estructura interna de cada frase, la repetición de sílabas se realiza de ma-

nera rítmica, con tasas silábicas definidas que pueden o bien ser estables o presentar variaciones durante un segmento de vocalización sostenida. La tasa silábica se define como $f_{syll} = 1/\tau_{syll}$, con τ_{syll} el intervalo temporal entre el comienzo de una sílaba y la siguiente. Las tasas silábicas varían entre aproximadamente 2 Hz para las sílabas más largas y llegan hasta alrededor de los 40 Hz para las sílabas de más corta duración (ver como ejemplo Figura 1.1).

Entre las distintas frases de canto ocurre una “transición”, que pueden estar marcadas por cambios abruptos en las características acústicas de las vocalizaciones (duración, frecuencia fundamental, contenido espectral, etc.). Adicionalmente, éstas también pueden ocurrir de manera gradual cuando tiene lugar la variación paulatina de alguna de estas características. Típicamente, esto ocurre en segmentos prolongados de fonación a una tasa silábica de 20 Hz o superior. En estos casos se habla de transición debido a que las propiedades acústicas de las primeras sílabas del segmento difieren de las encontradas para las sílabas del final, donde típicamente tiene lugar una transición “abrupta” hacia otra frase de canto. Cómo definir estas transiciones será discutido en Subsección 4.2.B.

Los canarios no tienen un canto único estereotipado como se tenía para el caso de diamantes mandarines. Para determinar el “canto propio” (BOS) de cada sujeto, es necesario analizar múltiples grabaciones y estudiar la presencia de secuencias que el sujeto repita de manera robusta. De esta manera se logra extraer el canto más probable dentro del repertorio natural del ave.

En la caracterización del canto de cada ave, las sílabas se tomaron como la unidad mínima de representación del canto, incluso cuando éstas estuvieran compuestas por más de una “nota” (traza ininterrumpida en el sonograma). Distintos sujetos pueden presentar distinto tamaño de repertorio (cantidad de sílabas distintivas que canta), pero independientemente de esto, sus vocalizaciones pueden ser clasificadas en distintos “tipos” de sílabas.

En trabajos previos se mostró que para el caso de los canarios, los patrones de presión en los sacos aéreos involucrados en la producción de canto podían ser obtenidos como las soluciones subarmónicas de un sistema no lineal simple (Alonso et al., 2009; Trevisan et al., 2006). Dado ese hallazgo, en un trabajo posterior se llevó a cabo una descomposición SVD (del inglés, *singular value decomposition*) de la matriz de correlación de las trazas de presión medidas para un conjunto de distintos tipos de sílabas (Alliende et al., 2010). En ese trabajo se concluyó que descomponer los posibles patrones de presión en una base de cuatro modos es suficiente para clasificar los tipos de gestos de presión medidos.

Esto significa que, de esta manera, las sílabas del canto de un canario pueden clasificarse a partir de 4 “tipos” de sílabas (ver paneles 1–4 en Figura 4.1). El primer ejemplo (panel 1) corresponde a una frase de sílabas denominadas “pulsátiles” (“P1b”). Estos gestos corresponden a impulsos de presión espiratoria sostenida, donde cada pico en el gesto corresponde a un pulso de sonido. Las sílabas denominadas “P1” (panel 2) presentan un gesto conformado por oscilaciones cuya forma es cercana a una senoide. Las sílabas “P0” (panel 3) son gestos espiratorios largos,

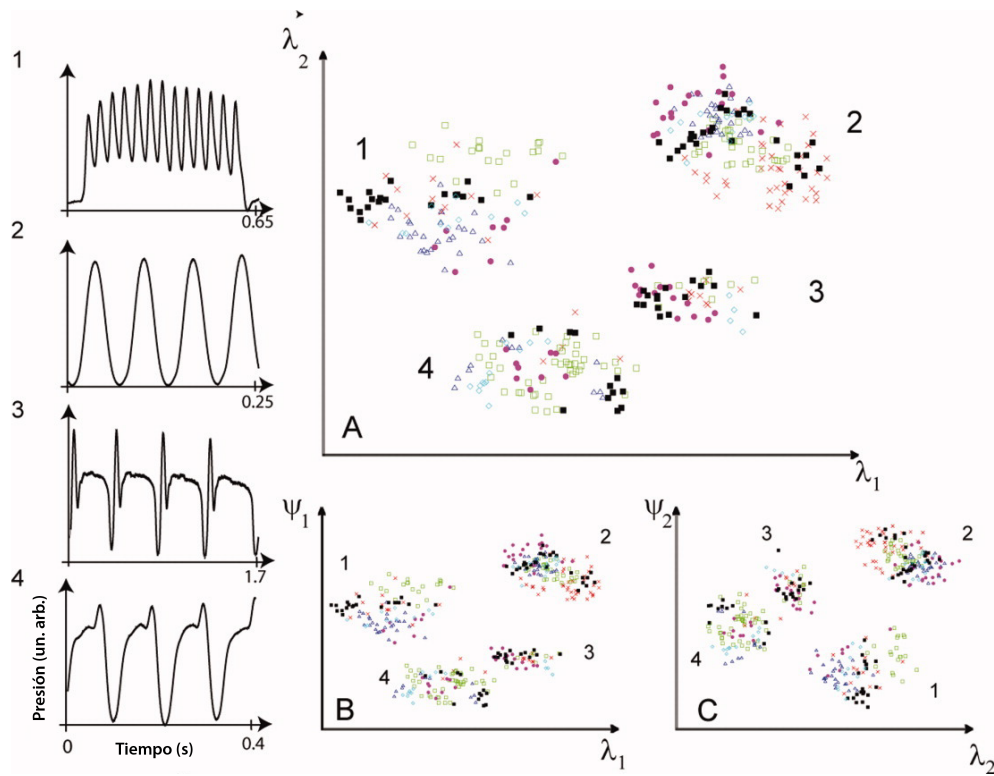


Figura 4.1: Clasificación de los gestos de presión medidos durante la producción del canto para canarios domésticos. En los paneles de la izquierda se encuentran ejemplos de gestos de presión para los distintos tipos de sílabas encontrados en el canto de un canario: (1) pulsátil “P1b”, (2) “P1”, (3) “P0” y (4) “P2”. A. Agrupamiento de gestos de presión provenientes de distintos sujetos (denotados por distintos tipos de puntos) en las direcciones λ_1 y λ_2 , correspondientes a los primeros dos autovectores de la descomposición SVD de la matriz de correlación de las trazas de presión. B y C. Proyecciones en uno de los autovalores en una dimensión y una combinación lineal de los restantes en la otra. En conjunto, (A-C) muestran el resultado final: a pesar de la diversidad acústica presente en los sonidos de estas sílabas, todos los casos estudiados se agrupan en estas 4 categorías. Figura adaptada de (Alliende et al., 2010), usada aquí para clarificar la clasificación mencionada.

conformados generalmente por un pico breve seguido de un segundo gesto sostenido que genera sonidos tonales (sílabas conformadas por dos “notas”). Por último, las sílabas categorizadas “P2” (panel 4) son gestos de duración intermedia entre P1 y P0, que suelen presentar una modulación leve y variaciones respecto de la instancia en la cual se encuentra el pico de presión. Éste puede encontrarse al inicio o al final, resultando en lo que típicamente se llama un “barrido hacia abajo” o “barrido hacia arriba” en frecuencia fundamental, respectivamente. Los nombres asignados a estos gestos de presión tienen una correspondencia con la relación que existe entre el período del forzante y el período del forzado en las soluciones sub-armónicas de un sistema no lineal simple (para más detalle, ver (Alliende et al., 2010)). De esta manera, “P1” indica un patrón de tipo “período 1”, lo que quiere decir que la frecuencia del forzado es idéntica a la frecuencia del forzante, mientras que “P2” indica una solución subarmónica donde la frecuencia del forzado es

la mitad que la del forzante.

Adicionalmente, y de extrema relevancia para la clasificación del canto en los experimentos realizados como parte de esta tesis, se encontró que cada uno de estos 4 tipos de sílabas distintas conforman frases de canto con tasas silábicas características (Alliende et al., 2010). **Las sílabas “P1b” presentan una tasa silábica > 27 Hz, mientras que para las “P1” esta tasa está en el rango de 13 – 25 Hz. Para “P2”, esta frecuencia decae a un rango entre 8 – 12 Hz y, por último, para las sílabas más lentas dentro de esta clasificación, las “P0”, la tasa silábica está entre los 2 Hz y los 5Hz.**

Este resultado es altamente relevante debido a que permitió la clasificación de los tipos silábicos presentes en los cantos teniendo en cuenta los rangos de tasa silábica dentro de cada frase y no a partir de un estudio de los gestos de presión involucrados. De esta manera, se minimizaron las intervenciones previas sobre los animales candidatos a cirugía para medir actividad en el núcleo neuronal telencefálico HVC.

4.2.B. Determinación del canto propio

Sujetos experimentales

Como en los experimentos previos en diamantes mandarines mostrados en Capítulo 2 y Capítulo 3, se realizaron sesiones de grabación del canto para cada sujeto previo a realizar cualquier intervención quirúrgica. Los canarios usados en estos experimentos fueron adquiridos en una asociación de criadores local. Todos los canarios adquiridos y empleados en los experimentos tenían al menos un año de edad (los más jóvenes habían nacido durante la temporada del año anterior), y presentaban cantos característicos de un macho adulto de la especie. A su entrada al laboratorio, los animales son sometidos a un proceso de control sanitario y monitoreo por un período de 10 días. Luego de ese período, los animales son alojados en jaulas comunes donde tienen acceso a comida y agua *ad libitum*, manteniendo un período de luz/oscuridad de 14h/10h respectivamente.

En su estadía en el laboratorio, los animales fueron periódicamente removidos de la jaula común y alojados en jaulas individuales que se ubicaron en otra sala del laboratorio, en el interior de una cámara de atenuación acústica. Estas cámaras permiten obtener grabaciones de canto de alta calidad y están equipadas para mantener el mismo fotoperíodo en que se tiene a los demás animales y cuentan con micrófonos direccionales (Takstar SGC 568) para realizar los registros de canto. Los cantos grabados fueron cantos espontáneos que ocurrieron mientras el animal era alojado en la cámara de atenuación.

La señal del micrófono fue amplificada utilizando un amplificador de audio (HSR) y digitalizada a 16 bits/muestra y a una frecuencia de muestreo de 20 kHz. Para cada ave, se ajustó la ganancia de amplificación de forma que la señal registrada no fuera distorsionada por satura-

ción. La adquisición fue configurada utilizando el software Avisoft recorder (Avisoft Bioacustics), que permite seleccionar un nivel de umbral sobre la señal amplificada del micrófono para activar la adquisición. Este umbral fue ajustado para cada animal a modo de minimizar disparos de adquisición por ruidos de movimiento en la jaula. Adicionalmente, se utilizó un buffer de muestras correspondiente a 10 segundos previo al disparo de la adquisición para obtener cantos completos sin perder el registro de las primeras sílabas vocalizadas, que pueden ocurrir con menor amplitud que el resto. Por último, también se configuró la duración mínima en 3 segundos, también para minimizar los disparos de adquisición, pero en este caso para evitar registrar archivos que sólo consistieran en llamadas (vocalizaciones diferentes a las sílabas de canto y de menor duración).

Usualmente, el primer día de manipulación y movimiento a esta cámara los animales produjeron un número reducido de cantos o ninguna vocalización en todo el día. Por este motivo, los animales permanecieron alojados en las cámaras de atenuación acústica durante al menos dos días, dependiendo de la cantidad de grabaciones registradas. Como en el caso de las jaulas comunes, los animales tuvieron acceso a comida y agua *ad libitum* en este proceso.

Análisis de los cantos grabados

Los canarios domésticos presentan instancias de canto espontáneo durante el día. Estos cantos espontáneos presentan variabilidad en la duración total del canto, las sílabas cantadas y el orden en que se realizan algunas de las transiciones entre las frases de distintas sílabas. Por esto, para determinar el canto propio del ave (BOS) fue necesario un estudio detallado de los sonidos grabados. En este proceso, el objetivo fue determinar el canto más probable, debido a que éste fue el estímulo auditivo presentado durante los experimentos y, una vez determinado, queda fijo durante la experimentación con cada ave.

La inspección de los cantos grabados se realizó manualmente utilizando un programa de análisis y procesamiento de señales de sonido, Praat (Boersma & Van Heuven, 2001). Entre las bondades del programa para esta tarea se encuentra el poder cargar múltiples archivos a la vez para su análisis, una visualización de la señal grabada y el sonograma de la señal, así como la posibilidad de visualizar un corte espectral para un determinado intervalo de tiempo. Debido a que la identificación de sílabas y el etiquetado de frases se realizó de manera manual, la señal fue analizada tanto en término de variables temporales (duración de sílaba, intervalo intersilábico, envolvente del sonido, etc.) como espectrales (frecuencia fundamental de las sílabas, ancho de banda, contenido armónico, modulación de frecuencia, etc.).

El proceso de selección del canto propio de un ave comienza con una inspección a gran escala de los cantos registrados, dando prioridad a los cantos más recientes que se hayan registrado para el animal. Durante la temporada de apareamiento los canarios pueden incorporar nuevas

sílabas a su repertorio. Por esto, se tuvo el cuidado de utilizar las grabaciones más recientes para determinar el canto de cada animal. Se buscó que los animales que fueran sujetos a experimentación tuvieran un repertorio estable o que presentara mínimas variaciones a lo largo de las sesiones monitoreo del canto.

Luego de la inspección cualitativa, se realiza un anotado manual de cada sílaba única encontrada y se le asigna una identidad, tomando nota del archivo de sonido que se usó para “definir” cada sílaba. Para definir cada unidad se analizan las propiedades de segmentos de canto utilizando Praat y, en particular, observando la evolución temporal del espectro representada con el sonograma. A la vez que se comienza a definir el repertorio de un animal, se registran las secuencias de frases encontradas en cada canto. En Figura 4.2 puede verse un ejemplo de un canto grabado de un animal, su segmentación en las distintas frases (identificadas con letras, paneles superiores) y una sílaba perteneciente a cada una de las frases (identificadas con las mismas letras, paneles inferiores). En este caso, el canto total tiene una duración de aproximadamente 7 segundos y la secuencia cantada es “(ABC)DEFG”. (ABC) se ha agrupado como una sola frase, pero se muestran 3 segmentos del interior de la frase para mostrar leves variaciones en las sílabas. En el registro de la secuencia no se tiene en cuenta la cantidad de veces que un animal produce cada sílaba dentro de cada frase, sino la secuencia de frases cantada. En esta figura se ha utilizado un canto corto y un repertorio acotado, a modo de ilustración del proceso de identificación de las distintas sílabas de cada canto.

En el panel superior de la figura se ilustran los ejemplos de distintos tipos de transiciones entre frases. Notar que existen transiciones “abruptas” (por ej., $E \rightarrow F$, $F \rightarrow G$) y otras que ocurren de manera gradual (por ej., $C \rightarrow D$, $D \rightarrow E$). En el panel inferior se muestra el repertorio, donde por claridad en la visualización se ha extraído una sílaba de cada frase y se ha mantenido la escala relativa entre las sílabas. Los primeros tres paneles, marcados como (A,B,C) corresponden a la evolución de las sílabas dentro de una frase del tipo P1b o pulsátil. Se muestran aquí como eventos separados para mostrar la posibilidad de variación acústica dentro de una misma frase. Las sílabas D y E son del tipo P1, pero con tasas silábicas que difieren en más del 20 %. La sílaba F corresponde a una vocalización del tipo P0 y está formada típicamente por una nota corta (el pico de alto contenido espectral cerca del inicio de la sílaba) y una nota larga (el segmento de espiración sostenida a una frecuencia fundamental constante, representando un sonido tonal). En el caso de la figura, la sílaba P0 mostrada tiene 2 “notas” antes de la parte tonal, una variación de la sílaba P0 prototípica. Por último, la sílaba G, de duración intermedia entre F y E, es una sílaba del tipo P2, realizando un “barrido descendente” en frecuencia fundamental. Este canto, entonces sirve como ejemplo para mostrar los 4 tipos de vocalizaciones encontradas en los canarios. Notar que cuando se mencionan los tipos P0, P2, P1 y P1b, esto no quiere decir que por cada tipo exista una sola sílaba posible: en efecto, las sílabas del tipo D y E corresponden a diferentes ejemplos de sílabas P1.

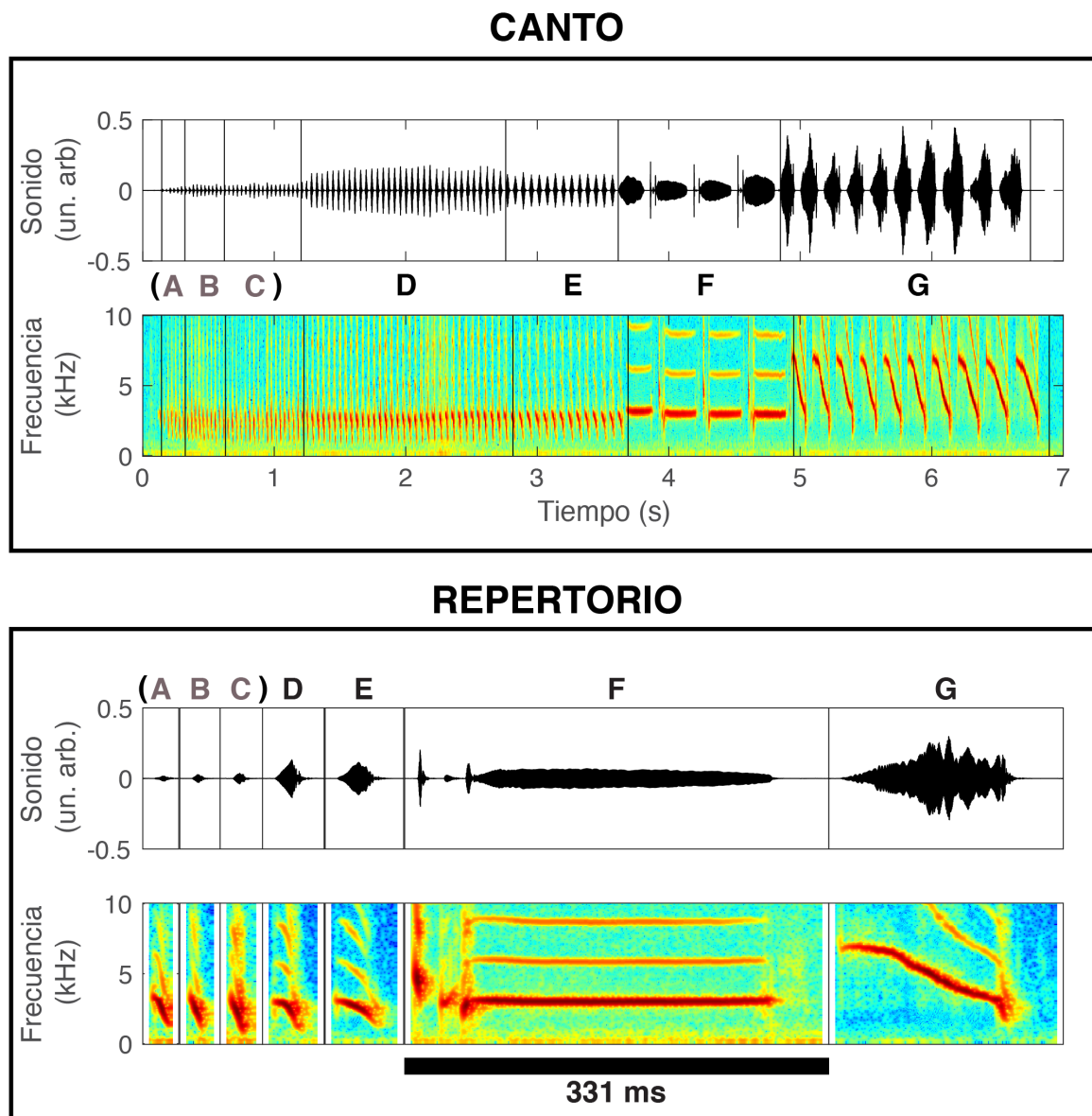


Figura 4.2: Ejemplo de canto, identificación de frases y repertorio de un canario. (Panel superior) Canto grabado y su sonograma. Las líneas verticales marcan las transiciones de frases, donde puede verse que existen transiciones “abruptas” (por ej., $F \rightarrow G$) y otras “graduales” (por ej., $D \rightarrow E$). La secuencia marcada como (ABC)DEFG indica la identidad de la sílaba en cada frase. (Panel inferior) Ampliaciones de sílabas únicas dentro de cada frase mostrada en el panel superior. Los paneles mantienen las escalas relativas de las duraciones de las sílabas. A, B, C: sílabas pulsátil o P1b (sílabas correspondientes a una misma frase); D, E: sílabas P1; F: sílaba P0; G: sílaba P2. La selección del canto más probable de un animal requiere de la determinación de su repertorio y de la secuencia cantada más probable. Para esto, se estudiaron del orden de 100 cantos por ave.

Para cada animal, se estudiaron múltiples grabaciones de canto y, de estar disponibles, grabaciones de múltiples días para definir su repertorio y su canto más probable. En promedio, se analizaron y anotaron manualmente 114 ± 27 cantos por sujeto experimental. Para analizar la secuencia más probable, se buscaron patrones de secuencias robustos y con una alta probabilidad de ocurrencia. Para esto, se estimó la probabilidad de ocurrencia de cada frase como $p_{fr} = (\#fr+) / (\#cantos)$, con p_{fr} la probabilidad de ocurrencia de la frase, $(\#fr+)$ la cantidad de secuencias en las que está presente la frase y $(\#cantos)$ la cantidad de cantos analizados. Se hizo lo mismo para las transiciones p_{tr} , que determinan la secuencia observada. Por último, se buscaron dentro de las secuencias completas de cada canto, aquellas sub-secuencias formadas por más de dos frases que estuvieran presente en un gran número de cantos analizados (p_{sub}).

Con la información de las secuencias y las probabilidades de encontrar cada tipo de frase y cada transición en los cantos grabados, se logró determinar satisfactoriamente un “canto propio” para cada sujeto como estímulo a utilizar en el experimento. Estos métodos de clasificación de canto de canarios han sido utilizados en estudios previos (Del Negro et al., 2005). En el caso de que existieran secuencias de distinta duración y similar probabilidad y/o que exploraran otro subconjunto del repertorio, se determinaron hasta 3 cantos para cada animal. En lo que sigue, en caso de necesitarlo me referiré a ellos como “BOS1”, “BOS2”, “BOS3”, etc. En esta nomenclatura, “1” es aquel que fue considerado como el más probable a partir del análisis antedicho, “2” una alternativa de similar (pero inferior) nivel de probabilidad, etc. Típicamente, se obtuvieron 2 “cantos propios” para cada ave, empleando la secuencia más característica como estímulo principal y un segundo canto “alternativo” que abarcaba alguna característica que el primero no capturaba (alguna/s transición/es distintas, otro subconjunto del repertorio, etc.). Como paso adicional en el estudio de cada canto, una vez seleccionados los estímulos y realizado un experimento con éxito, se determinaron precisamente las instancias temporales en las que ocurren las transiciones de sílabas, así como los tiempos de inicio de cada sílaba en el canto. Con esta información, también fue posible determinar de manera robusta la tasa silábica promedio en cada frase de canto.

Las transiciones fueron determinadas a partir de una inspección manual de los cantos involucrados en los experimentos. Para definir una transición, se observaron en conjunto la frecuencia fundamental de las sílabas en el canto, su contenido espectral y la evolución temporal del espectro; la duración de las sílabas y las características de la envolvente de sonido. En transiciones abruptas (p. ej., $E \rightarrow F$ en Figura 4.2), la determinación es sencilla. En otras transiciones (p. ej., $C \rightarrow D$), definir la instancia precisa en la cual ocurrió la transición de una sílaba a otra no es tan sencillo. En estos casos, evaluar cambios en la tasa silábica asiste en la tarea enormemente. Para poder evaluar la tasa silábica, es necesario determinar los inicios de sílabas en el canto. Esta no es una tarea simple, debido a que existe un amplio rango de amplitudes en las vocalizacio-

nes de canarios, lo cual no ocurre con los cantos de diamantes mandarines. Por este motivo, la determinación de los comienzos de sílabas para canarios se benefició de un procesamiento en etapas.

En primer lugar, se computó la envolvente como el valor absoluto de la transformada de Hilbert del canto y se normalizó a su valor máximo. Esa envolvente fue suavizada en ventanas de 50 ms y se buscaron picos para determinar la cantidad de sílabas presentes y el tiempo aproximado de cada una. La segunda etapa consistió en construir una función de detección a partir del logaritmo de la envolvente original, suavizada en ventanas de 10 ms. Esta función de detección fue normalizada para tomar valores entre 0 y 1. A partir de un umbral sobre la función de detección (determinado en 0.33), se detectaron los potenciales inicios como los cruces de ese umbral. Para eliminar artefactos, se buscó el evento que cruzara el umbral sobre la función de detección previo a la ocurrencia del evento detectado sobre la envolvente suavizada en el primer paso. Este conjunto resultó robusto frente a artefactos (identificando hasta el 98 % de los inicios de sílabas correctamente en los cantos analizados).

La salida de este análisis fue supervisada y el 2 % de los errores en la detección fueron corregidos manualmente, típicamente ocurriendo para sílabas de baja amplitud donde el umbral es más sensible en la detección. Con los tiempos de inicio, se computó una señal de evolución temporal de la tasa silábica. Entre dos sílabas consecutivas, la tasa silábica está dada por $f_{i,i+1} = \frac{1}{t_{i+1} - t_i}$, con t_i el tiempo de inicio de la sílaba i -ésima. Para eliminar fluctuaciones en la tasa silábica, se realizó una interpolación lineal en puntos intermedios entre las sílabas y un suavizado en una escala de 100 ms.

Con la información provista por esta traza, se definieron todas las transiciones, ya que éstas quedan representadas por variaciones en la tasa silábica. Por último, una transición se definió temporalmente como el comienzo de la primer sílaba luego de que se apreciara un cambio cualitativo en las características silábicas. Para el ejemplo mostrado en Figura 4.2, se muestra este análisis en Figura 4.3. En (a) puede observarse la traza de tasa silábica suavizada (línea sólida) con su barra de error (sombreado naranja). Cada segmento marcado con una letra corresponde a una frase, como en Figura 4.2, con (ABC) tres sílabas de una misma frase. Esto se debe a que el segmento dado por (ABC) corresponde a un segmento de vocalizaciones a una tasa silábica siempre mayor a los 27 Hz, por lo cual es altamente probable que correspondan a un mismo gesto espiratorio del tipo P1b o pulsátil.

La tasa silábica sigue en descenso a medida que el animal canta, pero no presenta variaciones cualitativas durante el segmento D, hasta llegar a E, otra frase del tipo P1 en la cual la tasa silábica se mantiene estable, y cuya transición respecto del segmento D puede observarse como un punto de inflexión en la señal. Luego, la tasa silábica disminuye abruptamente al producirse F, la frase de sílabas del tipo P0, para subir levemente hacia el final, con G, una frase del tipo P2.

En (b) y (c) se muestran la señal de canto grabada y su sonograma, respectivamente.

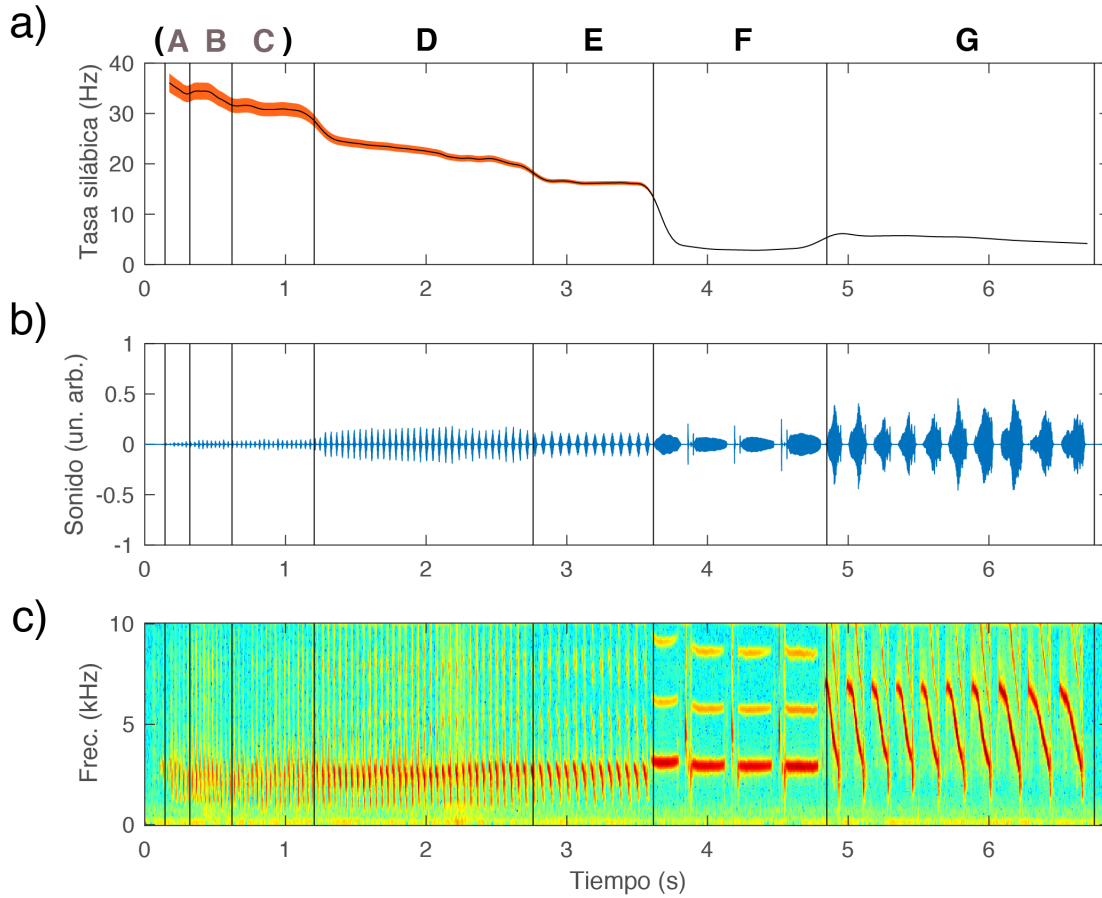


Figura 4.3: Determinación de las instancias de transiciones en el canto de un canario. (a) Tasa silábica en función del tiempo, determinada a partir de los inicios silábicos detectados en el canto (señal mostrada en (b)). Con línea sólida se marca la tasa silábica, determinada entre dos sílabas como $f_{i,i+1} = \frac{1}{t_{i+1} - t_i}$. El área sombreada corresponde al error absoluto en cada punto. Las transiciones de frases dejan una huella en la traza de tasa silábica, como puede verse en la transición D $\rightarrow$ E). Esto resultó de ayuda para determinar la instancia temporal en la que ocurren las transiciones “graduales” (ver texto). El segmento (ABC) fue tomado como una única frase, debido a que corresponde a un segmento continuo de vocalizaciones a una tasa silábica superior a los 27 Hz, por lo cual es altamente probable que corresponda a un único gesto espiratorio del tipo pulsátil o P1b. En (b) y (c) se muestran el canto analizado y su sonograma (mismo ejemplo mostrado en Figura 4.2).

4.2.C. Experimentos de electrofisiología

El objetivo principal de los experimentos propuestos fue estudiar la codificación neuronal del canto en las neuronas del núcleo telencefálico HVC, empleando para esto el paradigma de animal anestesiado ya introducido en Capítulo 2 y Capítulo 3. En estos experimentos se estudia

la respuesta de neuronas en el núcleo ante presentaciones de estímulos auditivos. La respuesta auditiva en HVC provee información sobre cómo son codificados estos estímulos en el núcleo y, a su vez, esto constituye evidencia indirecta sobre la actividad neuronal involucrada en la producción del canto (Dave & Margoliash, 2000; Prather et al., 2008; Yu & Margoliash, 1996).

En este marco de trabajo se tienen las predicciones sobre la actividad poblacional del núcleo HVC a partir del modelo presentado en El modelo “circular” (Subsección 1.7.A). El observable que permitiría evaluar la validez de las predicciones sería la actividad poblacional del núcleo, en particular de la subpoblación de neuronas proyectoras a RA. En los registros llevados a cabo durante los estudios mostrados en Capítulo 2 y Capítulo 3, la muestra obtenida de neuronas por cada individuo es pequeña respecto del total de neuronas en HVC (del orden de decenas de miles de neuronas). Para aumentar el muestreo de actividad en cada experimento y poder registrar un gran número de neuronas, se incorporó al laboratorio la tecnología de sondas de sílice (en inglés: *silicon probes*). Estas son sondas comerciales (p. ej., Neuronexus) que están conformadas por arreglos multielectrodo. Los sitios de medición son de Iridio y tienen un área aproximada de $177 \mu\text{m}^2$, con impedancias nominales a 1 kHz de entre $1 \text{ M}\Omega$ y $2 \text{ M}\Omega$.

Los arreglos pueden fabricarse en distintos tipos de geometrías. Por ejemplo, para un arreglo lineal, la sonda Neuronexus modelo A1x32 tiene 32 sitios de medición centrados en una guía. Estos sitios están separados $25 \mu\text{m}$ entre sí, cubriendo una longitud total de $775 \mu\text{m}$. La sonda tiene un perfil que va angostándose hacia la punta. Su ancho en la punta es de unos $27 \mu\text{m}$, y de $145 \mu\text{m}$ en la parte superior. Otra de las sondas utilizadas, también de 32 canales fue la sonda Neuronexus modelo A1x32-Poly2. Esta alternativa presenta también una única guía, pero dos columnas de sitios de medición en un arreglo no lineal en el interior de esa guía. En este caso, las columnas de sitios están separadas $50 \mu\text{m}$ entre sí. Los sitios dentro de cada columna también están separados por $50 \mu\text{m}$. Las dos columnas, sin embargo, están verticalmente desplazadas unos $25 \mu\text{m}$ entre sí, de manera que los sitios de las dos columnas no están horizontalmente alineados. Debido a la presencia de dos columnas de sitios de registro, esta configuración presenta una punta de $43.3 \mu\text{m}$ de ancho, mientras que el ancho máximo de la sonda en su extremo superior es de $113 \mu\text{m}$. Una referencia de ambas geometrías de sonda puede consultarse en Sección 7.2.

Los experimentos realizados se restringieron a estas dos configuraciones, en particular debido a que la puesta a punto de la técnica con este nuevo tipo de registros se realizó en el desarrollo de los experimentos. La configuración lineal A1x32 fue la más ampliamente utilizada, y salvo se indique lo contrario, los registros mostrados fueron realizados con este tipo de arreglo. Dada la longitud de estas sondas ($> 700 \mu\text{m}$), una penetración en la cual ésta se introduce por completo en el tejido permite cubrir al núcleo HVC en profundidad. Conceptualmente entonces, el diseño del experimento con cualquiera de las dos configuraciones permite el registro de la actividad en múltiples sitios dentro de HVC, realizando una única penetración en cada sitio. De esta manera, se buscó poder realizar una muestra de la actividad en HVC de mayor número de neuronas

a partir de estudiar no sólo la actividad en profundidad (en una misma penetración), sino su distribución espacial (realizando múltiples penetraciones en HVC para cada animal).

Para poder realizar los registros en simultáneo de los múltiples canales en las sondas se adquirió también un nuevo tipo de sistema de adquisición, sobre el cual se dan más detalles en *Registros electrofisiológicos* (Sección 4.2.C).

Estímulos presentados

Para cada ave, el conjunto de estímulos para el experimento fue: (1) canto propio más probable (BOS) como discutido en Subsección 4.2.B; (2) canto de un macho adulto conespecífico (CON) de aproximadamente la misma duración que BOS y (3) canto propio reproducido en reversa (REV). Como se discutió previamente, en caso de haber seleccionado más de un canto propio para un ave (ej., “BOS1”, “BOS2”, etc.), el conjunto de estímulos a presentar se multiplica. En este caso, se tenían 3 estímulos por cada “BOS” seleccionado (ej: “BOS1, CON1, REV1”, “BOS2, CON2, REV2”, etc.). Para cada conjunto, los tres estímulos utilizados presentan el paradigma experimental para estudiar la selectividad en la actividad de neuronas en HVC, como se mostró en Capítulo 2 y Capítulo 3. Para canarios, la duración promedio del canto es significativamente mayor que para los diamantes mandarines. Para las grabaciones analizadas, se tiene una duración promedio de los cantos de: $(11,5 \pm 5,1)$ s, con valores máximos que pueden exceder ese intervalo (33.7 s). Por este motivo, la duración de cada protocolo experimental medido representa una duración apreciable del tiempo de experimento (un protocolo completo de 20 repeticiones de cada estímulo puede durar del orden de 25/30 minutos).

Cirugías

Las cirugías realizadas a los animales son idénticas a las antes descritas para el caso de diamantes mandarines en Capítulo 2 y Capítulo 3. Una vez que la grabación de los cantos ha finalizado y se tiene un gran número de archivos para poder realizar la selección del canto discutida en Subsección 4.2.B, los animales son intervenidos en una cirugía preparatoria. En ésta, se interviene a los animales bajo anestesia gaseosa para implantar un pequeño poste de acero inoxidable en el cráneo utilizando cemento dental y cianoacrilato. En esta primer cirugía preparatoria también se despeja la zona donde se realizarán las craneotomías necesarias para el registro de actividad neuronal el día del experimento.

El día de los registros, los animales tuvieron acceso y comida *ad libitum* hasta el mediodía. En ese momento fueron privados de comida y agua por el término de una hora. Se realizó un pesaje de control antes de administrar la primer dosis de anestesia inyectable (uretano, dosis total: $5 \mu\text{l/g}$ distribuida en 3 alícuotas separadas por 30 minutos cada una). El animal anestesiado fue sostenido y ubicado en el marco estereotáxico. Su cabeza fue fijada por medio del

poste previamente implantado. Se identificó el sitio para realizar la craneotomía sobre HVC a partir de coordenadas estereotáxicas, marcando con un electrodo de prueba. Luego de realizar las craneotomías necesarias para el cable de tierra/referencia y para la inserción de la sonda en HVC, se realizó la penetración en el tejido descendiendo la sonda utilizando un micromanipulador hidráulico (Narishige MO-10) (para ver más detalles sobre estos procedimientos, consultar Capítulo 2 y Capítulo 3). Los experimentos duraron hasta un máximo de 16 horas. Durante todo el proceso, los animales fueron monitoreados por cambios en su estado anestésico y, en caso de ser necesario, se administraron refuerzos de la anestesia inyectable en alícuotas de 20 – 30 μ l.

Registros electrofisiológicos

La incorporación de sondas multi-electrodo requirió de cambios en la electrónica utilizada para la amplificación y la digitalización de las señales medidas. Los experimentos realizados previamente (detallados en Capítulo 2 y Capítulo 3) consistieron en la medición de actividad neuronal con electrodos de un sólo canal.

La posibilidad de registrar un gran número de canales de actividad neuronal en simultáneo ha visto avances tecnológicos notables en la última década. En particular, compañías como Intan Technologies, LLC (Los Angeles, CA, USA) han desarrollado soluciones con microchips especializados para la adquisición de biopotenciales. Los chips Intan integran soluciones de amplificación de bajo ruido ($\approx 2,4 \mu V_{rms}$), filtros programables (0,1 Hz – 7500 Hz) y un conversor A/D de 16 bits con capacidades de multiplexado. Los chips amplificadores Intan se conectan directamente a las sondas de registro, recibiendo una entrada analógica y transmitiendo a la salida la señal digitalizada. De esta manera, como la pequeña señal analógica de los electrodos (orden de magnitud: 100 μ V) es transformada a un flujo de datos digitales, este sistema de adquisición reemplaza los circuitos e instrumentación analógica “clásica”.

Los chips amplificadores utilizados fueron Intan modelo RHD2132 (amplificador de 32 canales), al que se conectó la sonda multi-electrodo a la entrada. La salida del amplificador es conectada mediante un cable conector RHD2000 SPI a una placa de evaluación Intan (Intan RHD2000 Evaluation Board), que se conecta mediante un cable USB a la PC, donde se almacenan las señales digitalizadas. La placa de evaluación Intan RHD2000 también tiene entradas analógicas, puertos de tierra y un conversor digital/analógico (DAC) para el monitoreo de señales neuronales utilizando un parlante/monitor de audio. El esquema de estas conexiones durante un registro puede verse en Figura 4.4.

La adquisición fue configurada utilizando una computadora y el programa provisto por Intan (RHD2000 Evaluation System Software). Con el mismo programa, es posible realizar un monitoreo en tiempo real de la señal durante el experimento. En Figura 4.5 se muestra una captura de pantalla durante uno de los experimentos. Cada ventana corresponde a 1 segundo de actividad

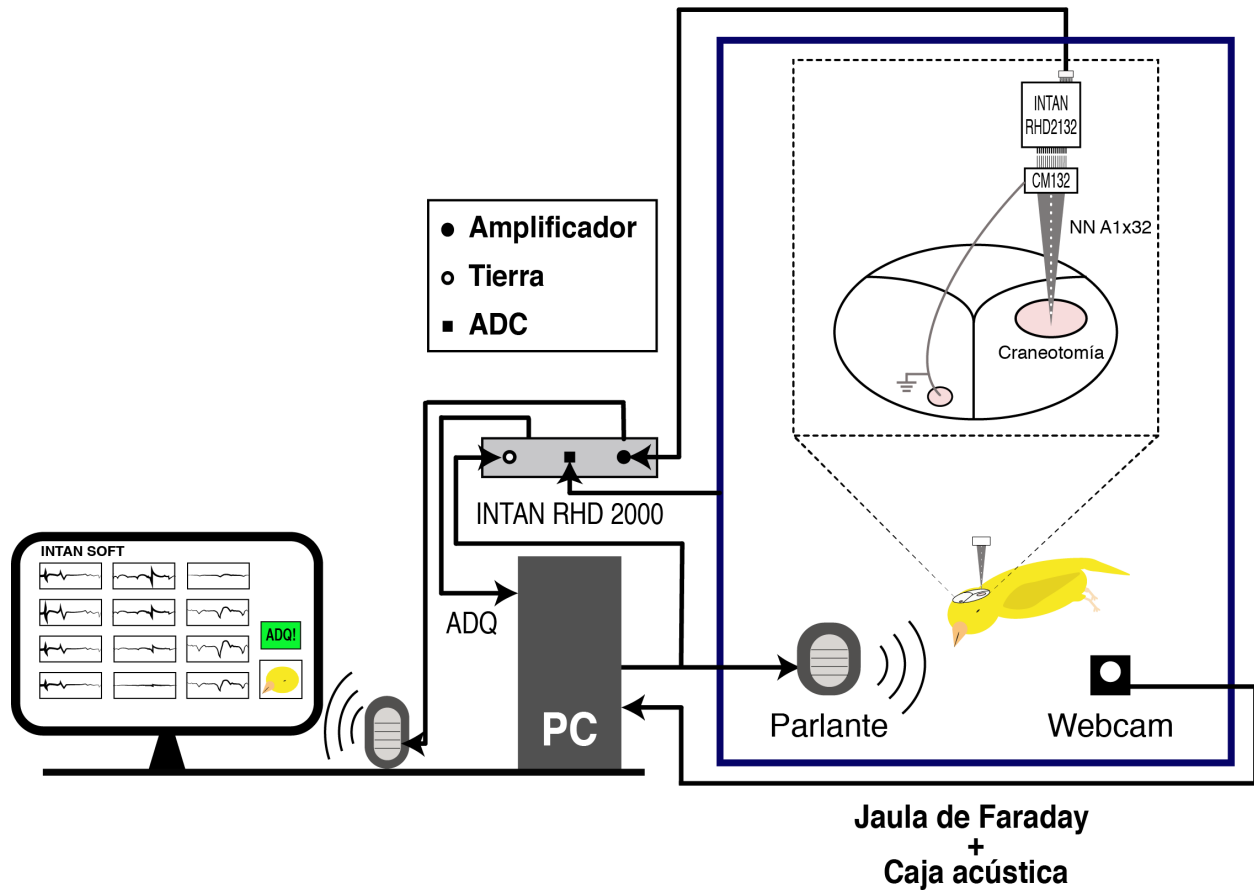


Figura 4.4: Esquema de conexiones durante un experimento. El ave anestesiada está en el interior de una caja acústica blindada eléctricamente con una jaula de Faraday. La craneotomía (en detalle) permite ingresar la sonda a HVC. Una segunda craneotomía más pequeña, realizada en el hemisferio contralateral se utiliza como sitio de referencia para el electrodo. La conexión de la sonda es conectada a la jaula de Faraday, y ésta a la conexión de tierra de la placa de adquisición Intan RHD2000. También en el interior de la caja acústica se encuentra un parlante, que se utiliza para presentar estímulos durante el experimento y una cámara web, que se utiliza para monitorear al ave. La conexión PC → ADC de la placa Intan se detalla en Figura 4.6. Desde la PC, se controla la adquisición (ADQ) y se monitorean tanto la señal de los canales de la sonda como el estado del animal a través de la imagen de la cámara web. El parlante externo se utiliza como monitor de audio, alimentado por la señal del conversor digital/analógico de la placa Intan.

registrada en un canal con el amplificador RHD2132 que, a su vez, se corresponde a un sitio de medición en la sonda Neuronexus A1x32. La escala vertical para el monitoreo es configurable y en este caso es de $\pm 200 \mu V$ para todos los canales. En este ejemplo, pueden verse canales que no presentan señal apreciable (por ej., canal A-000) y otros donde se observan espigas correspondientes a los potenciales de acción de neuronas de HVC (por ej., el canal A-024, resaltado). La presencia de espigas de distinta amplitud en un mismo canal indica que se está registrando la actividad de múltiples neuronas. Por otro lado, la ausencia de señal neuronal en un canal se debe a que los sitios de medición no están en la cercanía de neuronas de HVC.

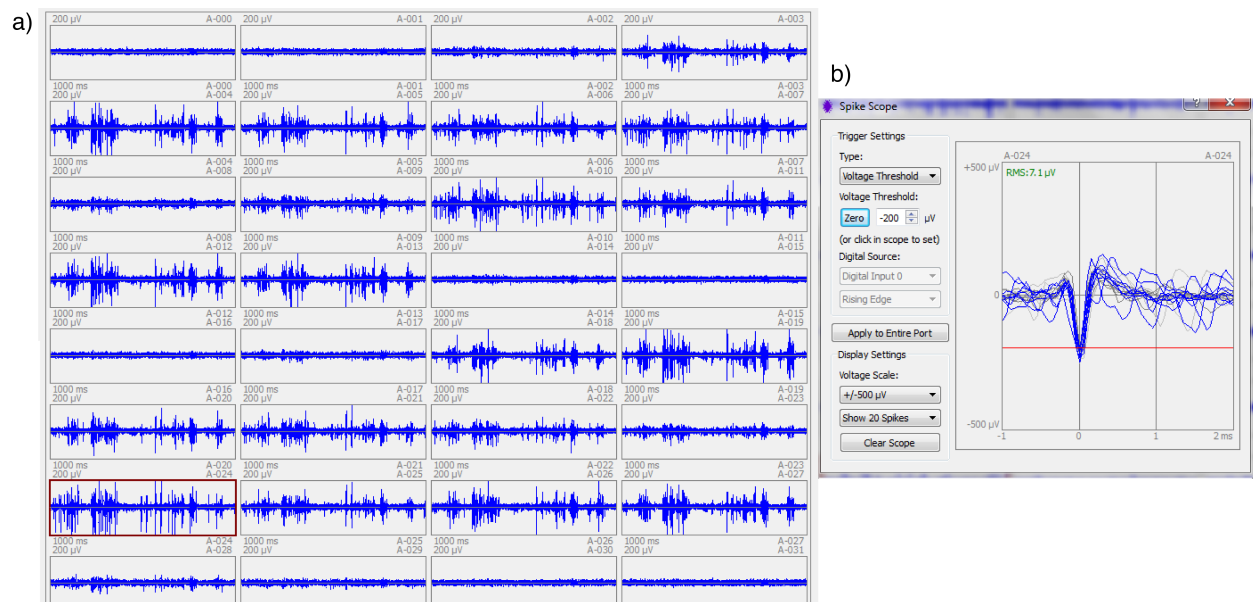


Figura 4.5: Ejemplo de registro en proceso (captura de pantalla). (a) Cada panel representa un canal distinto de la sonda de sílice NeuroNexus A1x32. La leyenda encima y debajo de cada panel identifica al canal en la adquisición y muestra la escala configurada (en este caso: $200 \mu V$). Adicionalmente, puede apreciarse que existen canales en el registro en los cuales no hay actividad presente (p. ej., A-000), lo cual se debe a la ausencia de actividad neuronal en la cercanía del sitio de medición de la sonda. Notar, adicionalmente, que en la visualización del programa los canales no están ordenados por el sitio de la sonda y por esto se ven intercalados canales sin señal y canales con señal apreciable. (b) Ampliación del canal seleccionado con reborde rojo en (a). Esta utilidad del programa, llamada “visor de spikes” (del inglés, spike scope), permite configurar manualmente un nivel de disparador para aislar y visualizar los disparos provenientes de una única neurona durante el experimento. Esta implementación por software reemplaza el monitoreo tradicional que utilizaba un osciloscopio.

Con este mismo programa pueden establecerse los parámetros para la adquisición con la placa (frecuencia de muestreo, características del filtro de entrada, formato de los archivos, etc.). La frecuencia de muestreo fue establecida en 20 kHz y las propiedades del filtro de entrada se configuraron para obtener un filtro pasabanda entre 0,1 Hz y 5000 Hz. Para el monitoreo de las señales durante el experimento, se utilizó un filtro digital por software entre 300 Hz y 5000 Hz. De esta manera, durante el experimento se monitoreó la actividad dada por los potenciales de

acción de las neuronas presentes en cada canal, obteniendo una visualización como la que se muestra en Figura 4.5. La actividad neuronal también fue monitoreada durante los experimentos utilizando un monitor de audio (parlante) conectado a la salida del conversor digital-analógico (DAC) con el que cuenta la placa Intan. De esta manera, al seleccionar un dado canal en el software, la salida DAC puede escucharse en tiempo real para cualquier canal dado.

El proceso experimental fue el siguiente. Una vez que se identificaron las coordenadas de HVC y se realizó la craneotomía en el animal anestesiado, se removió la duramadre y se posicionó la punta de la sonda Neuronexus en las coordenadas elegidas para la penetración en HVC. Se cerró la jaula de Faraday que recubre el dispositivo estereotáxico y, a su vez, se cerró la cámara de aislamiento acústico donde se encuentra el dispositivo. El animal fue monitoreado durante el experimento utilizando una cámara web en el interior de la cámara.

La sonda fue introducida en HVC utilizando un micromanipulador hidráulico controlado desde el exterior de la cámara de atenuación sonora (caja acústica) donde se encontraba el animal. La actividad del canal más profundo de la sonda fue monitoreada en tiempo real con el software mientras se escuchaba la señal utilizando la salida DAC. Comúnmente, luego de recorrer $200\ \mu\text{m} - 400\ \mu\text{m}$ en profundidad se obtuvo actividad neuronal y con el descenso de la sonda sobre el tejido, se apreció actividad en otros canales. De esta manera, se descendió hasta que la señal originalmente encontrada en la punta de la sonda comenzara a disminuir en amplitud o dejara de ser apreciable por sobre el ruido. En ese punto se consideró que la punta de la sonda estaba cerca de los límites de HVC y se comenzó con la presentación de estímulos. Si al llegar a una profundidad de unos $1000\ \mu\text{m}$ no se encontraba señal neuronal apreciable, se subía la sonda utilizando el micromanipulador hidráulico y se realizaba una penetración en otro sitio de HVC.

En caso de tener señal neuronal, se probó si la presentación de los cantos seleccionados para ese ave generaba respuesta en las neuronas del núcleo HVC. Para esto, el interior de la cámara donde se encuentra el ave cuenta con un parlante conectado a la PC de registro. Los estímulos fueron presentados con una intensidad de aprox. 70 dB. En caso que ninguno de los estímulos seleccionados lograra generar una respuesta apreciable (modulación de tasa de disparo de las neuronas presentes en los canales con actividad), como en el caso de no registrar señal neuronal, se removió la sonda y se realizó una penetración en otro sitio dentro de HVC. En caso de que para una penetración dada la respuesta fuese marginalmente significativa, se evaluó cualitativamente la respuesta a partir de 10 presentaciones del canto propio del animal antes de realizar un protocolo completo de medición.

Finalmente, en el caso en que la actividad sí presentara respuesta a los estímulos presentados, se procedió a medir un protocolo completo. Este protocolo consistió en 20 presentaciones de cada estímulo dentro de un conjunto de los definidos en *Estímulos presentados* (Sección 4.2.C). Las presentaciones fueron aleatorizadas utilizando un código desarrollado en Matlab. La secuencia en que se presentaron los estímulos es guardada en un archivo de texto que lleva la identidad

del protocolo presentado. El intervalo entre los comienzos de presentaciones de estímulos fue fijado sumando 8 segundos a la duración del canto propio del ave, manteniendo un intervalo constante durante todo el protocolo. Los 8 segundos de silencio se utilizaron para permitir una relajación a niveles de actividad basal antes de presentar estímulos sucesivos.

Utilizando la placa de sonido de la PC como salida, un canal de un cable de audio se conectó al parlante que se encuentra en el interior de la cámara de atenuación acústica. El canal restante del cable fue utilizado para enviar una señal sinusoidal de 2000 Hz, 2250 Hz o 2500 Hz durante cada estímulo presentado (canto propio o BOS, canto de un macho adulto conespecífico o CON y canto propio presentado en reversa o REV, respectivamente). Esta señal es registrada en simultáneo con la actividad neuronal en la PC mediante el conversor A/D de la placa RHD2000 Evaluation Board. De esta manera, la señal del canal analógico tiene a su vez la información del orden en que se presentó cada estímulo y los tiempos de comienzo de la presentación de cada estímulo. Esta información fue utilizada posteriormente para realizar la segmentación de la señal registrada en cada uno de los ensayos correspondientes. Un segmento de los registros sin procesar mostrando este proceso se ilustra en Figura 4.6. Para identificar los tiempos de comienzo de presentación, se pre-acondicionó la señal del canal analógico filtrándola con un filtro pasabandas entre 1500 y 3500 Hz (filtro de fase nula tipo Butterworth de orden 4). Una vez acondicionada la señal se realizó una búsqueda algorítmica de los primeros picos de cada segmento sinusoidal. Utilizando esas instancias temporales como comienzo de presentación de los estímulos se introduce un corrimiento sistemático de 0.10–0.15 ms para cada segmento (no acumulativo entre segmentos) que es luego corregido. La información de estos tiempos se combina con la secuencia en que se presentaron los estímulos para recuperar para cada uno de ellos los 20 segmentos de respuesta neuronal asociados a las presentaciones al azar.

Procesamiento y análisis de las señales

Como se discutió al principio de este capítulo, se buscó recuperar de los datos un observable que permitiera contrastar las predicciones del modelo circular. Por este motivo, el análisis se realizó en tres etapas complementarias. Por un lado, se analizó el potencial de campo local en el núcleo telencefálico HVC a partir de la observación de un fenómeno que no ha sido descrito previamente en canarios. Como el potencial de campo local integra información espacial de las corrientes sinápticas lentas de un gran número de neuronas, es un observable de interés en el estudio de la actividad a gran escala de HVC. El potencial de campo local o LFP no ha sido descrito en detalle en aves. Estudios recientes han explorado esta medida para el caso de diamantes mandarines (Beckers & Gahr, 2010; Lewandowski & Schmidt, 2011; Markowitz et al., 2015), pero - a conciencia del autor - el LFP no ha sido descrito en HVC para canarios con anterioridad. Si bien esta descripción resulta novedosa en sí misma, una segunda etapa buscó relacionar el LFP

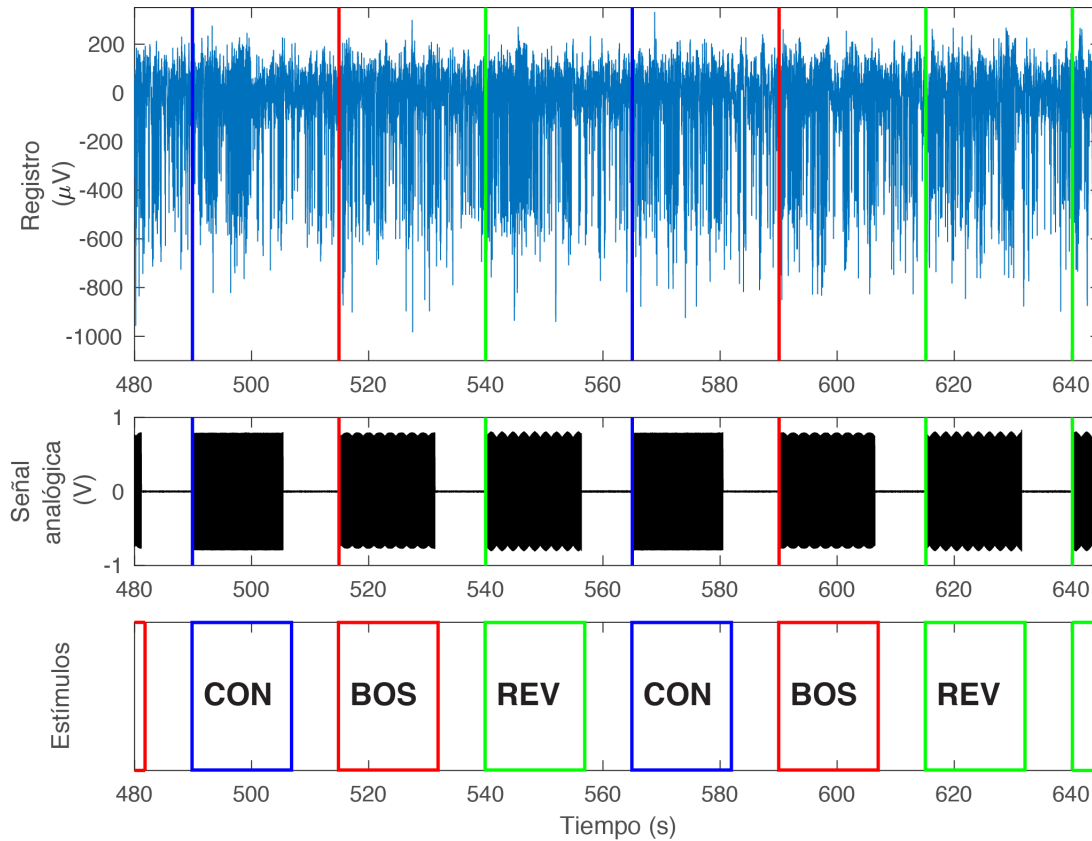


Figura 4.6: Ejemplo de reconstrucción de los tiempos en que se presentó cada estímulo para un protocolo grabado (datos de un canal de registro). De abajo hacia arriba: las cajas de distintos colores muestran el estímulo presentado en cada sección del registro, identificados a partir de la secuencia en que se presentaron los estímulos para ese protocolo, y utilizando la señal del canal analógico para identificar los tiempos de inicio de cada presentación. La señal del canal analógico muestra los segmentos de señal sinusoidal utilizados para registrar la presentación de los estímulos. Las líneas verticales indican el inicio de una presentación. En el panel superior se muestra el segmento de registro sin procesar. **Acrónimos:** BOS, canto propio del ave (del inglés, Bird's Own Song); CON, canto de un macho adulto conespecífico; REV, canto propio del ave reproducido en reversa.

a la actividad conjunta de múltiples neuronas. La tercer etapa buscó profundizar este análisis a partir de separar la actividad de neuronas individuales en cada registro, utilizando para esto algoritmos de clasificación de espigas (del inglés, *spike sorting*).

Estas tres etapas serán desarrolladas a lo largo de este capítulo y el siguiente. En lo que queda de este capítulo, desarrollaré los resultados obtenidos a partir del análisis del potencial de campo local o LFP en los registros obtenidos en el núcleo HVC.

Filtrado Para estudiar el potencial de campo en los registros, las señales de actividad neuronal fueron pre-procesadas con un filtro pasabajos digital. Para evitar añadir un retraso en el proceso de filtrado, se aplicó un filtro de fase nula tipo Butterworth de 4to orden, con una frecuencia de corte en 100 Hz. Este filtro es estándar en neurociencias por ser teóricamente el filtro máximamente lineal en la banda permitida (Butterworth, 1930; Van Drongelen, 2018; Wallisch et al., 2014). Para un filtro pasabajos, esto quiere decir que el contenido espectral de la señal hasta la frecuencia de corte quedará prácticamente intacto luego del filtrado. La frecuencia de corte para el filtro se definió a partir de observaciones del contenido espectral del LFP “de banda ancha” de los registros, cuyas bandas de mayor potencia estuvieron siempre por debajo de los 100 Hz. En la figura Figura 4.7 se muestra un segmento de registro proveniente de un canal de la sonda Neuronexus y adquiridos con la placa Intan durante uno de los experimentos. La señal mostrada en la parte superior de la figura corresponde al segmento de datos grabados sin procesar. En esta señal existen componentes de bajas frecuencias (oscilaciones lentas en la señal) y también componentes de muy alta frecuencia (espigas, correspondientes a un potencial de acción medido de manera extracelular). Las dos señales mostradas a continuación son obtenidas luego de aplicar filtros digitales a la señal original. Por un lado se tiene la señal filtrada con el filtro pasa-bajos tipo Butterworth discutido previamente. En esta señal filtrada se capturan las componentes de la señal original que corresponden a fluctuaciones lentas. Por otro lado, en la señal filtrada con un filtro pasa-altos se capturan los potenciales de acción registrados de manera extracelular, sin las fluctuaciones lentas (el procesamiento de la señal mediante un pasa-altos y el análisis de la actividad de neuronas en el núcleo HVC será profundizado en Capítulo 5).

Como se describió en *Registros electrofisiológicos* (Sección 4.2.C), se registró actividad neuronal en respuesta a estímulos auditivos. En total, cada protocolo de medición consiste en registrar 20 ensayos de la respuesta ante cada estímulo presentado. El interés fue estudiar el emergente en la respuesta de esos 20 ensayos. Por este motivo, para cada protocolo analizado se obtuvo y se analizaron las propiedades de la respuesta presente en el potencial de campo promediado en ensayos (LFP_{avg}). De esta manera, los fenómenos analizados en las secciones siguientes corresponden a los emergentes más robustos de la respuesta.

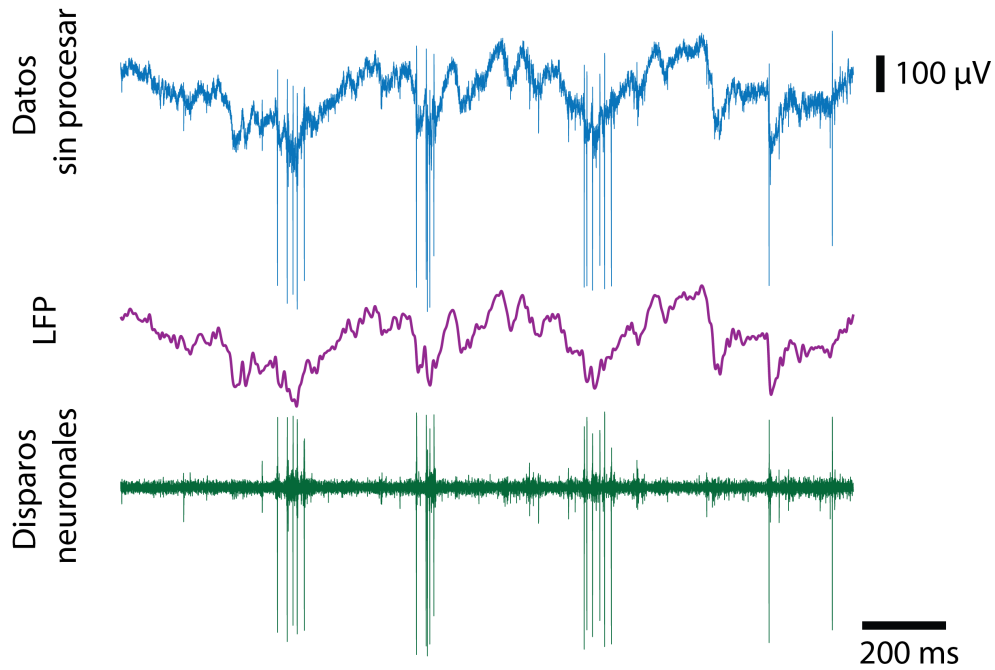


Figura 4.7: Ejemplo de segmento de un canal de registro neuronal. Notar cómo en el segmento de datos sin procesar presentado en la parte superior existen tanto componentes de fluctuación rápida y otras de evolución lenta. El potencial de campo local (LFP, panel medio) se obtiene a partir de filtrar la señal original con un filtro pasabajos de fase nula (Butterworth de 4to orden, frecuencia de corte: 100 Hz). Los disparos neuronales o espigas corresponden al registro extracelular de los potenciales de acción por parte de las neuronas en la cercanía del sitio de registro. Para obtener las espigas (actividad neuronal, panel inferior), se aplica un filtro del tipo pasa-altos a la señal original (ver Capítulo 5). De esta manera, se puede separar el análisis en términos del LFP y de la actividad de las neuronas.

Análisis de la respuesta Medir la respuesta al estímulo en el LFP difiere del procedimiento discutido en capítulos anteriores, en los cuales se buscó determinar instancias de disparo de neuronas individuales. En principio, es necesario definir qué característica del potencial de campo local será empleada como medida de respuesta, dado que las señales presentan apartamientos significativos de la línea de base tanto para valores positivos como hacia valores negativos en voltaje. Sin embargo, la distribución de valores máximos y mínimos absolutos para los LFP_{avg} obtenidos (de 16 protocolos) indican que las instancias de mayor prominencia son los mínimos de la señal. En valor absoluto, los mínimos de máxima amplitud fueron en promedio de $129 \pm 17 \mu V$, mientras que para los máximos de la señal esto resultó en $81 \pm 4 \mu V$, resultando en diferencias significativas de amplitud (prueba t de dos muestras, $p = 1,5 \times 10^{-9}$), con una diferencia media dada por los intervalos de confianza al 1 % de $CI = [36, 38] \mu V$. **Por este motivo, el análisis de las instancias significativas en las señales fue realizado a partir de los mínimos en el LFP.**

A partir de observaciones preliminares, se observó que existen mínimos prominentes tanto en respuesta a un tipo específico de sílabas (P0) como en otro tipo de instancias, dado por las

transiciones entre frases (esto será discutido en Sección 4.3). Para caracterizar estas instancias de respuesta en los LFP, se realizó una búsqueda de los mínimos de mayor prominencia en la señal y se analizó su distancia a la transición de frases del canto más cercana.

Análisis de transiciones. Para capturar las características más salientes y ayudar en la detección de los mínimos de gran amplitud, se realizó un suavizado adicional dado por un filtrado pasa-bajos (Butterworth de 4to orden, frecuencia de corte: 10 Hz). La detección de mínimos prominentes en el LFP se realizó en dos pasos. El primer paso consistió en una búsqueda ingenua de picos en la señal sin imponer ningún tipo de condición de amplitud. Esto dio como resultado una distribución de todos los mínimos (globales y locales) en la señal. Con la información de la ubicación de estos mínimos, se filtraron aquellos que estuvieran en el interior de una frase de sílabas del tipo P0. Para los mínimos restantes de la señal, se impuso como umbral para la detección que superaran el 75 % de la prominencia máxima, eliminando del análisis cualquier mínimo que no cumpliera con esta condición. El parámetro adicional en esta búsqueda fue el ancho de la ventana en la cual considerar una coincidencia entre las instancias de transiciones en el canto y las instancias de actividad marcada en el LFP, buscando que la cobertura de la ventana a utilizar cubriera sólo una porción de la duración de una frase. Para esto, se tomó la información obtenida a partir del análisis de los cantos (ver en detalle en *Análisis de los cantos grabados* (Sección 4.2.B)). La duración promedio de las frases de los cantos analizados fue de $1,18 \pm 0,61$ s (72 frases de canto, provenientes de 5 cantos correspondientes a 4 aves distintas). Cabe notar que este resultado es compatible con distribuciones de duraciones de frases previamente reportada para canarios (Del Negro et al., 2005), duración promedio de frases ($d = 1,13 \pm 0,14$ s) y (Markowitz et al., 2013), mediana de la duración de frases reportada como un intervalo de confianza del 95 %, $d \in [1,3375s, 1,3589s]$. Por lo tanto, una ventana de $\pm 150ms$ centrada en cada transición cubre aproximadamente el 25 % de la duración de frase promedio, y asegura que no existe superposición entre instancias de transición consecutivas. **En este análisis, la hipótesis a probar es que los mínimos prominentes en la señal (que no caen en el interior de una frase con respuesta de gran amplitud, como se mostrará que ocurre para las sílabas P0) están asociados a transiciones de frases.**

Análisis de actividad oscilatoria. Por otro lado, los LFP medidos fueron caracterizados por su respuesta a distintas frases del canto, a lo cual se define como una “región de interés” de la señal. Éstas corresponden a regiones donde los LFP del núcleo HVC presentan una respuesta en una escala característica de las frases de canto. Por este motivo, los segmentos de las señales que presentan respuesta robusta a frases fueron obtenidos mediante un análisis de la autocorrelación del LFP_{avg} en cada segmento delimitado por las transiciones de frases. La autocorrelación sirvió como una medida normalizada para encontrar periodicidad en la señal. Como se verá en Sección 4.3, esta es una de las características principales de interés en la respuesta de los LFP. Por este motivo, se detectaron los picos prominentes presentes en la autocorrelación en cada

segmento (prominencia $\geq 0,1$). Si los picos encontrados en esta función corresponden a un comportamiento periódico, la distancia entre ellos debe ser aproximadamente constante. Por esto, en cada segmento se utilizaron las posiciones de los picos detectados en la autocorrelación para determinar una potencial frecuencia $f_{test} = \frac{1}{\bar{\Delta}t}$, con $\bar{\Delta}t$ el valor medio de las distancias entre los picos detectados. f_{test} fue admitida en los casos en que estuviera determinada con un error porcentual menor al 25 %, indicando que proviene de picos cuyas distancias se mantienen regulares durante el segmento. Para los casos de frecuencias superiores a los 3 Hz, se impuso adicionalmente que f_{test} fuese determinada por al menos 3 puntos. **De esta manera, se etiquetaron las distintas regiones de los LFP_{avg} como zonas de interés sólo en caso en que se encontrara una oscilación robusta en las señales.**

En el interior de estas regiones, se buscó cuantificar para cada caso la distancia entre alguna fase específica de la respuesta en el potencial de campo local y alguna característica en la evolución temporal del canto. Por lo discutido anteriormente, la característica de mayor relevancia en los LFP resultaron ser los mínimos de las señales. Por esto, se detectaron los mínimos de los LFP en las frases donde la respuesta fuera relevante. **En la detección de mínimos en la respuesta dentro de cada frase, se utilizó como umbral el valor RMS de la señal.** Como característica de respuesta asociada al canto, se tomó la distancia entre los mínimos detectados en los LFP_{avg} y el inicio silábico previo. La racionalidad detrás de medir la distancia al inicio silábico previo se debe a que en estos experimentos se midió la respuesta auditiva ante la presentación de estímulos, por lo cual es plausible que cualquier rasgo de la respuesta ocurra con un cierto retraso respecto del elemento al que está respondiendo. Se tomó la medida de los inicios silábicos debido a que ésta es una característica ubicua de todas las sílabas, independiente del tipo silábico al que se presente respuesta. **Con este análisis se cuantificaron las instancias de respuesta en el LFP_{avg} como distancias temporales respecto al inicio silábico previo (Δt).**

4.3. Resultados

Los experimentos que constituyen los resultados analizados en lo que sigue de esta tesis corresponden a datos registrados en 4 aves distintas. Para cada ave se obtuvieron las respuestas auditivas ante la presentación de los estímulos y se obtuvieron mediciones del potencial de campo local en HVC, por un total de 25 protocolos completos (20 repeticiones de 3 estímulos distintos) repartidos entre las 4 aves. De esos 25 protocolos, 9 fueron removidos del análisis. Los protocolos removidos corresponden a protocolos en los cuales la señal se degradó durante el registro o protocolos correspondientes a respuesta de menor prevalencia para variaciones del canto en un mismo sitio de penetración. El total de mediciones a analizar con potencial de campo local (LFP) fueron un total de 16 protocolos completos provenientes de 4 animales, representando aproximadamente 5 horas de registro de actividad neuronal por canal (160 horas de actividad en

total, dando un total de aprox. 25 GB de datos). Para un esquema de los sitios de penetración en HVC con cada ave, ver Sección 7.1. Para 3 de los 4 sujetos experimentales analizados fue posible obtener registros de buena calidad en los núcleos HVC correspondientes a ambos hemisferios. En los experimentos realizados, se exploró sistemáticamente primero HVC izquierdo antes de realizar registros en el hemisferio derecho. Cabe notar que aunque el número de sujetos puede ser bajo, las respuestas analizadas corresponden a un gran número de sílabas. Esto se beneficia, adicionalmente, de que los datos de distintos animales pueden agruparse, como se verá en esta segunda parte del capítulo.

La primer etapa de análisis de los resultados de estos experimentos, mostrada en este capítulo, se concentra en describir los hallazgos a nivel del LFP en el núcleo HVC.

4.3.A. El potencial de campo local promediado en ensayos

El procedimiento descrito en *Registros electrofisiológicos* (Sección 4.2.C) permitió, en todos los casos, reconstruir los momentos de cada registro en que se comenzó a presentar un estímulo auditivo. Con esto, se alinearon temporalmente los datos correspondientes a múltiples ensayos para un mismo estímulo.

En Figura 4.8a se muestra un ejemplo del LFP promediado en ensayos para un canal de registro, mientras que en Figura 4.8b se graficó una muestra tomada al azar de 10 de los 20 ensayos del protocolo. Las señales obtenidas presentan variaciones entre ensayos, pero el LFP promediado captura satisfactoriamente el emergente en la respuesta. Ver, por ejemplo, las regiones de 1–2 s y 4–5 s, en las cuales el promedio en ensayos muestra una estructura dada por mínimos de gran amplitud. Como ayuda en la visualización, las líneas punteadas muestran la posición de los mínimos en el LFP promediado y cómo estos mínimos se encuentran en un gran número de ensayos. Para uno de los casos, se ha graficado una flecha en la zona de uno de los mínimos, indicando su presencia en cada ensayo. Se tomó como error en el LFP promediado $\pm$ SEM, con SEM el error estándar de la media. En la figura, el promedio ha sido graficado con una línea sólida y el error se grafica como un área sombreada. Notar que para el caso de los picos prominentes en el LFP promediado, este error disminuye significativamente en comparación a otras instancias temporales, indicando una menor variabilidad. De esta manera, **se evaluó para cada protocolo de cada experimento la respuesta emergente a partir del LFP promediado en ensayos.**

4.3.B. El LFP captura respuestas al canto propio

Estudiando los registros de LFP obtenidos en los distintos experimentos se encontró que puede apreciarse una respuesta significativa en estas señales. La amplitud en valor RMS de la señal LFP_{avg} es mayor durante la presentación de los estímulos que en los períodos de silencio, como puede verse en Figura 4.9. Esta diferencia es sistemática, y ocurre para los 16 protocolos

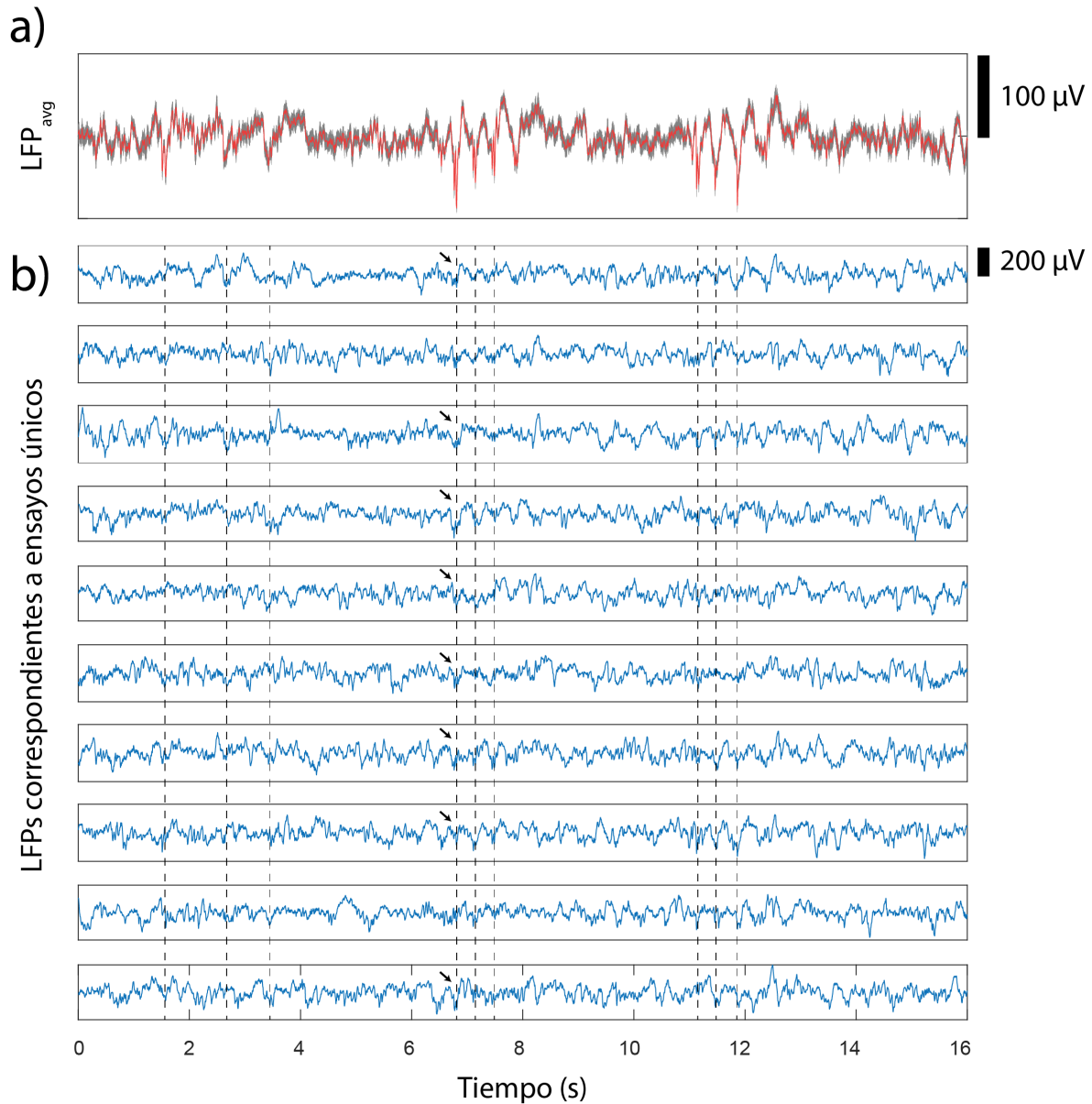


Figura 4.8: LFP promediado en ensayos. (a) LFP promediado en ensayos ($n=20$) para un protocolo medido. La línea roja representa el promedio, y la zona sombreada denota $\pm$ SEM. En la señal pueden verse distintas instancias con estructura robusta en los 20 ensayos promediados (por ej., las regiones entre 1–2 s y más notablemente, entre aproximadamente 4–5 s). Notar, consecuentemente, que el área de la zona sombreada disminuye en estas instancias, lo que indica una menor variabilidad entre ensayos respecto de otras instancias. (b) LFPs de 10 ensayos seleccionados al azar entre los 20 que dan origen al promedio mostrado en (a). Notar que existe gran variabilidad entre los distintos ensayos. Sin embargo, existen instancias robustas que emergen en múltiples ensayos y dan lugar a picos prominentes en el potencial promediado. Las líneas punteadas marcan algunas de las instancias prominentes en el LFP_{avg} . Para estos casos, puede verse cómo en un gran número de ensayos se encuentran mínimos del potencial en estas instancias, dando lugar al emergente mostrado en (a).

analizados. Las distribuciones obtenidas de valores RMS durante el canto propio (BOS) y durante el silencio no rechazan la hipótesis nula de la prueba de Shapiro-Wilk de normalidad con un nivel de significancia del 1 % ($p = 0,41$) para los valores RMS durante el canto y ($p = 0,15$) para los valores RMS durante el silencio).

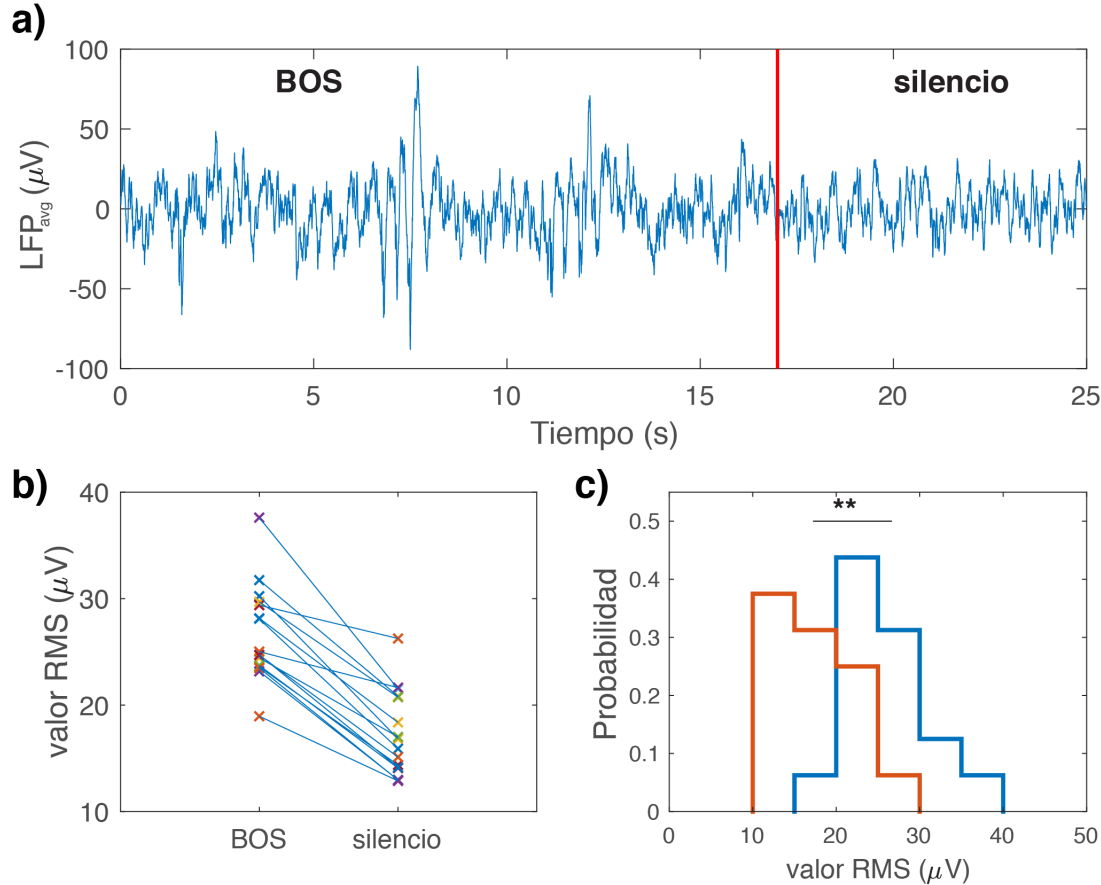


Figura 4.9: La amplitud de los LFP en HVC es mayor durante la respuesta al canto propio (BOS) que durante el silencio. (a) LFP_{avg} para el canal de máxima amplitud RMS en el registro. Una línea vertical marca el momento de transición entre el final de la presentación del estímulo y el comienzo de un intervalo de silencio de 8 segundos. Notar que no existen durante el silencio mínimos prominentes como los encontrados durante el canto. (b) Valores RMS de LFP_{avg} durante la presentación de BOS (izquierda) y durante el silencio (derecha). Los pares que corresponden a un protocolo han sido unidos por una línea. Como puede visualizarse de esta manera, los valores de amplitud durante el silencio son siempre más pequeños que durante la presentación de canto. (c) Histogramas de los valores RMS durante el silencio (en naranja) y durante el canto (en azul). Las distribuciones resultaron ser significativamente diferentes bajo una prueba t pareada $p = 1,5 \times 10^{-6}$ (ver texto para más detalle).

Durante los segmentos de presentación del canto, los LFP_{avg} presentaron valores de $27 \pm 5 \mu V$, mientras que en los segmentos de silencio esto disminuyó a $14 \pm 4 \mu V$. En todos los casos, los valores reportados como $\pm$ indican desviación estándar. Las distribuciones de valores RMS

durante la presentación de los cantos y durante los silencios presentaron diferencias significativas entre sí (prueba t pareada, $p = 1,5 \times 10^{-6}$, nivel de significancia establecido en 1%). La distribución de las diferencias tampoco pudo ser distinguida de una distribución normal bajo la prueba de Shapiro-Wilk ($p = 0,38$). La diferencia entre pares de valores de amplitud RMS durante el canto y en el silencio fue, en promedio, de $9 \pm 4 \mu V$. **Estos resultados validan estadísticamente la diferencia de amplitud entre las regiones de respuesta al canto y de silencio en las señales.** En términos del paradigma estudiado, esto significa que existe un nivel de respuesta apreciable en la señal. Los resultados mostrados en Figura 4.9 corresponden al canal de máxima amplitud RMS entre los 32 canales registrados para cada protocolo.

En los protocolos analizados, las mediciones del potencial de campo local LFP_{avg} presentaron características similares a las mostradas en la figura Figura 4.10. En esta figura puede apreciarse el fenómeno descrito para el canal de máxima amplitud RMS en Figura 4.9: se observa que las señales de mayor amplitud presentan una estructura durante el canto que no está presente cuando la presentación del estímulo ha terminado. Esto se debe a la presencia de picos (mínimos) de gran amplitud en la señal.

Las trazas correspondientes a LFP_{avg} han sido ordenadas verticalmente según la posición del sitio de medición en la sonda (mostrada a la izquierda). Adicionalmente, las señales más salientes están confinadas a algún número de canales en cada registro, debido a que no hay presencia de actividad neuronal en la cercanía de todos los canales. Cabe notar que aunque en promedio la amplitud de las señales sea mayor durante presentaciones del canto, también existen regiones dentro del canto donde la señal no presenta respuesta apreciable. **Es decir, los resultados mostrados en Figura 4.9 se corresponden con la emergencia de una estructura en la señal durante algunos segmentos o instancias durante la presentación del canto, pero no a todos los elementos contenidos en él.**

Adicionalmente, en Figura 4.10 puede verse que los canales de mayor amplitud en la señal están altamente correlacionados. Si bien el análisis en detalle de la extensión y correlación espacial se presenta y discute en Capítulo 5, aquí daré una noción preliminar de esta observación. Tomando como canal de referencia el de máxima amplitud RMS (CH_M) en el ejemplo mostrado en Figura 4.10 y computando el coeficiente de correlación de Pearson entre los LFP de distintos canales como r_{CH_i, CH_M} , con CH_i el canal i-ésimo del registro, se puede ver que esta correlación disminuye a medida que la distancia al canal CH_M aumenta. Sin embargo, existe una zona no despreciable donde estas señales están altamente correlacionadas. Si, por ejemplo, se toma el rango de canales que presentan un coeficiente de correlación $r_{CH_i, CH_M} > 0,8$ se obtiene una región de unos 8 canales, que corresponden a una correlación espacial de unos $200 \mu m$. Aunque la actividad en canales vecinos está altamente correlacionada, como puede observarse en Figura 4.10, la amplitud disminuye progresivamente, haciendo que las características que quieren estudiarse de las señales sean menos salientes en los canales a medida que disminuye la amplitud. **Dada**

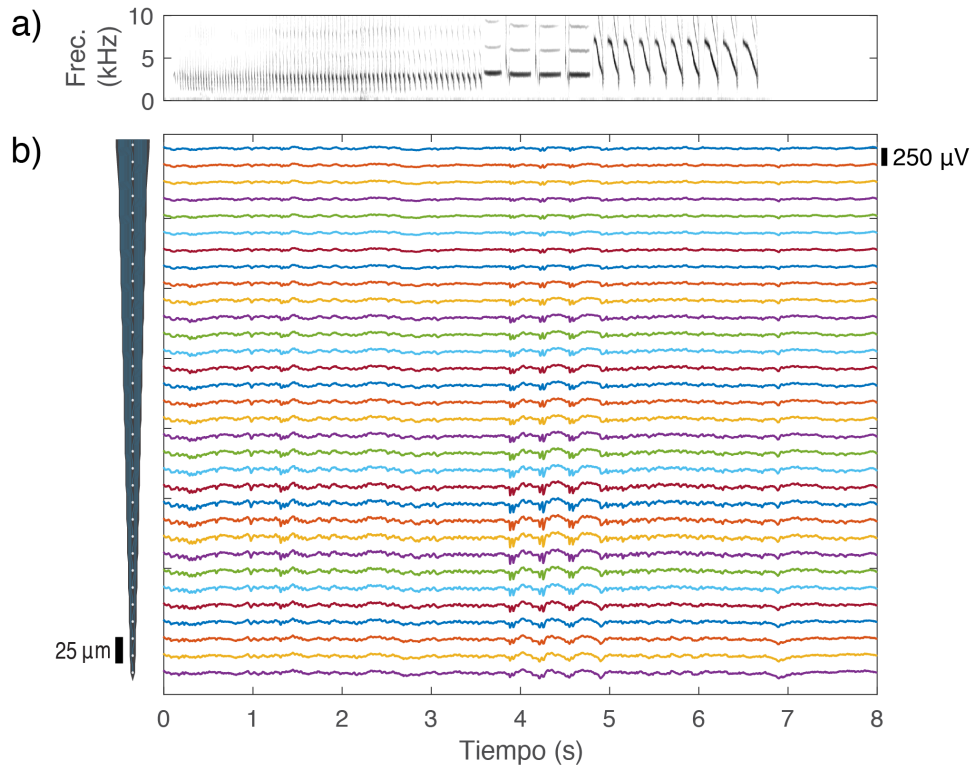


Figura 4.10: Ejemplo de potenciales de campo obtenidos en un protocolo experimental. (a) Sonograma del canto propio del ave (BOS) presentado durante un experimento. (b) Panel izquierdo: esquema de la sonda de sílice Neuronexus A1x32, junto con la escala que muestra la separación entre los canales ($25 \mu\text{m}$). Panel derecho: cada traza representa el LFP de cada canal de la sonda de sílice mostrada a la izquierda. Se aprecia que estos potenciales de campo local poseen una estructura (denotada por la presencia de mínimos prominentes en el potencial respecto a la línea de base), y que esta estructura está relacionada con el canto presentado. Adicionalmente, las señales están correlacionadas en el rango de canales en el que están presentes (ver texto). Esto será profundizado en Capítulo 5.

esta observación, los resultados que se discuten en el resto de este capítulo corresponden a datos de los LFP_{avg} provenientes del canal de máxima amplitud RMS en cada protocolo. Adicionalmente, en todos los datos analizados que no correspondan a una caracterización espacial se utilizaron tanto los datos del canal con máxima amplitud RMS, fueran registrados con la sonda A1x32 (14 protocolos) como A1x32-Poly2 (2 protocolos) (ver Sección 7.1, Sección 7.2).

4.3.C. El LFP indica transiciones entre frases de canto

Una observación que se desprende del análisis mostrado en Subsección 4.3.B es que existen instancias donde la señal del LFP durante el canto cuenta con mayor amplitud respecto a períodos de silencio. Debido a esto y a lo presentado en *Análisis de la respuesta* (Sección 4.2.C), se tiene que estas instancias de mayor amplitud corresponden a mínimos prominentes en la señal.

En este caso, se tiene que en la respuesta existen mínimos de gran amplitud en la cercanía de las transiciones entre frases. En Figura 4.11 se muestra un ejemplo de este fenómeno. En (a) se muestra el sonograma del canto presentado en el experimento y en (b), el LFP_{avg} correspondiente a un protocolo de un ave (Cs253-AzuAma). Las líneas verticales sólidas superpuestas al sonograma en (a) marcan las transiciones entre las distintas frases que componen el canto, determinadas como en *Análisis de los cantos grabados* (Sección 4.2.B). El sombreado en verde en (a) y (b) representa una zona de ± 150 ms respecto de cada transición y el LFP suavizado para la detección de picos prominentes está superpuesto con líneas punteadas a la señal original en Figura 4.11b (ver *Análisis de la respuesta* (Sección 4.2.C)). En el ejemplo mostrado, la proporción del canto cubierta por la suma de todas estas ventanas es del 32 %. Dejando afuera los picos de mayor prominencia correspondientes a las respuestas a sílabas del tipo P0, en este ejemplo se tiene que 5 de 21 de estas ventanas tienen un mínimo asociado en el LFP (marcados con líneas verticales sobre la señal). Esta coincidencia parcial indica que no toda transición es representada en los LFP analizados.

Se calculó, adicionalmente, el porcentaje entre la cantidad de falsos positivos (mínimos de gran amplitud no asociados a transiciones) y la cantidad de picos detectada en cada protocolo, obteniendo una razón de $15 \pm 19\%$ falsos positivos (11 eventos sobre un total de 71 mínimos prominentes analizados). Esto, a su vez, quiere decir que **sobre esos 71 eventos, se encontró que 60 sí cayeron dentro de una ventana de ± 150 ms respecto de las transiciones de frases. Esto significa que el 84 % de los picos de mayor prominencia indican transiciones de frases.** De esos 60 mínimos, 53 (el 88 % de los datos que indican transiciones) se encuentran con un retraso > 0 ms, indicando que ocurrieron luego de la instancia de transición asociada. Debido al reducido número de mínimos que tienen un retraso negativo, se caracterizó la distribución de retrasos sólo para los casos con retraso positivo. Para este subconjunto de datos, no se puede rechazar la hipótesis nula de que los datos provienen de una distribución normal (test de Shapiro-Wilk, $p=0.52$), con valor medio en $\Delta t = 85 \pm 25$ ms. Los 7 puntos restantes están distribuidos en el rango $[-110$ ms, 0 ms] sin mostrar un agrupamiento significativo como ocurre para el caso de retrasos positivos.

Este resultado establece la presencia de instancias de gran amplitud en la señal dada por los potenciales de campo local. En general, existe una amplia representación de distintas transiciones en las distintas aves. En Tabla 4.1 se muestran las transiciones encontradas en los protocolos analizados.

Entre las instancias con mayor representación se encuentra la presencia de un pico cerca del comienzo del canto (10/16 protocolos), de los cuales 7 corresponden a comienzos del canto con una frase del tipo P1 y 3 a comienzos del tipo pulsátil (P1b). En los cantos, Csb1162-BlaVe comienza con una frase del tipo P1b, pero Csb103-VeVio y Csb253-AzuAma lo hacen con una frase del tipo P1. Transiciones del tipo $P1 \rightarrow P1$ también están representadas en tres de las

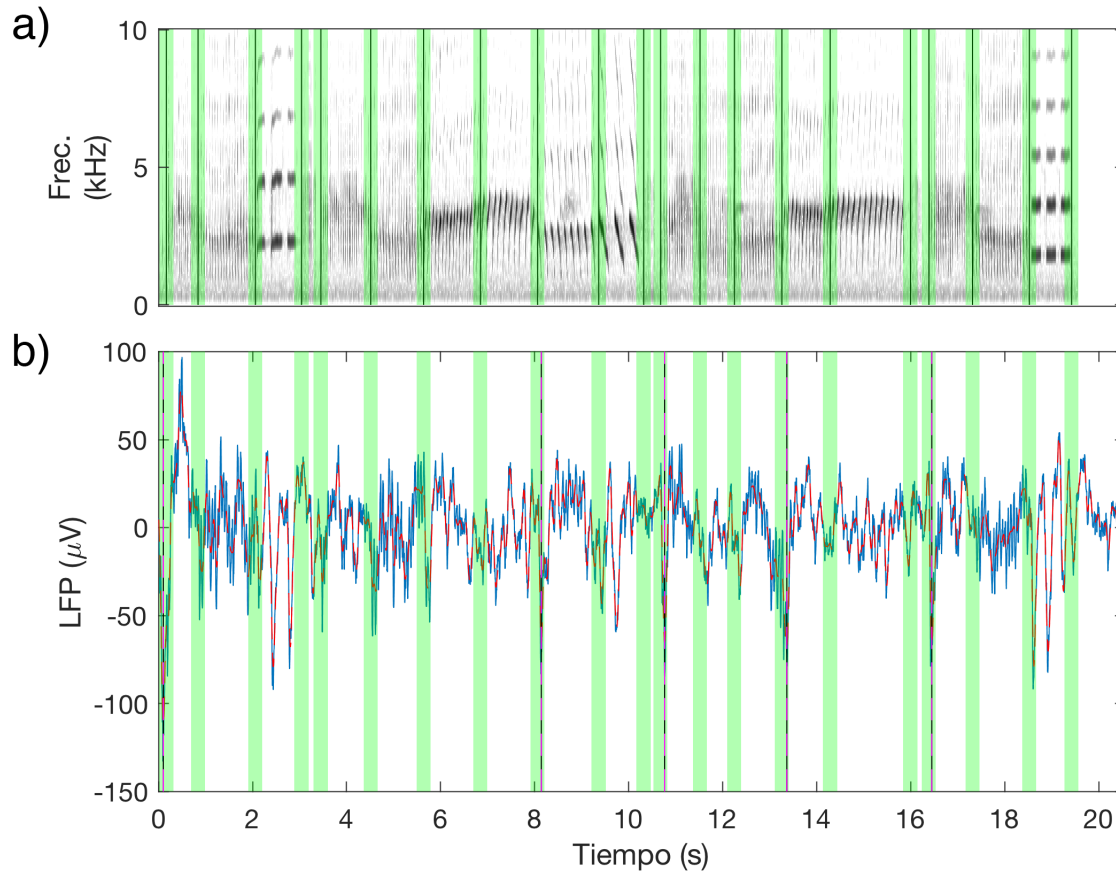


Figura 4.11: El potencial de campo local presenta mínimos prominentes en transiciones entre frases. (a) Sonograma del canto de un ave (Csb253-AzuAma), indicando las frases (líneas verticales sólidas) y una ventana de ± 150 ms respecto de cada una de ellas, usadas como ventanas de detección de coincidencia con la presencia de un mínimo prominente en el LFP_{avg} . (b) Señal correspondiente al LFP_{avg} del canal de máxima amplitud RMS para un protocolo de medición. La línea punteada corresponde a la señal suavizada para la detección de mínimos prominentes (ver Sección 4.2.C). Se muestran las ventanas indicadas en (a) y las líneas verticales sólidas corresponden a mínimos seleccionados a partir de un criterio de amplitud relativa. Para un subconjunto de las transiciones en (a), existe una coincidencia con la ocurrencia de un pico de actividad en el LFP (en el ejemplo mostrado, 5/21 transiciones). Notar, adicionalmente, que los mínimos prominentes en el interior de una frase tipo P0 no fueron tenidos en cuenta en este análisis.

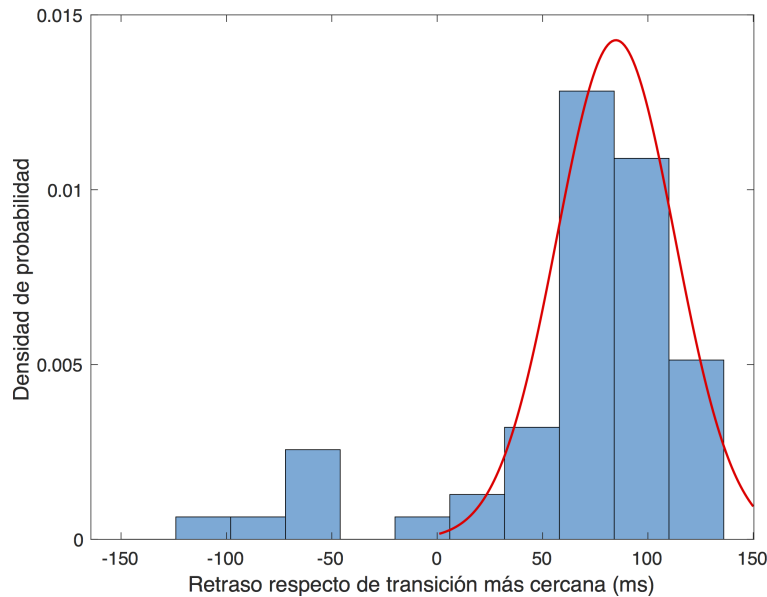


Figura 4.12: Distribución de distancias entre mínimos del LFP y la transición de frases más cercana. Datos agrupados para todos los protocolos (16) de los animales estudiados (4). El 84 % de los picos prominentes estuvo asociado a una instancia de transición entre frases. De esos puntos, el 88 % presentan un retraso positivo ($> 0 \text{ ms}$, 53/60 eventos). La distribución de eventos con retraso positivo sigue una distribución normal, con valor medio $\Delta t = 85 \pm 25 \text{ ms}$. (ver texto).

Transición	Csb039-VioAma	Csb103-VeVio	Csb1162-BlaVe	Csb253-AzuAma	Total
Comienzo	x	2 (3.3 %)	3 (5 %)	5 (8.3 %)	10 (16.7 %)
P1b	2 (3.3 %)	5 (8.3 %)	x	x	7 (11.7 %)
P1b $\rightarrow$ P1	x	1 (1.7 %)	x	9 (15 %)	10 (16.7 %)
P1 $\rightarrow$ P1	x	3 (5 %)	3 (5 %)	6 (10 %)	12 (20 %)
P1 $\rightarrow$ P2	x	x	4 (6.7 %)	3 (5 %)	7 (11.7 %)
P2 $\rightarrow$ P2	x	x	4 (6.7 %)	1 (1.7 %)	5 (8.3 %)
P2 $\rightarrow$ P1	x	x	4 (6.7 %)	x	4 (6.6 %)

Tabla 4.1: Tabla de transiciones registradas para cada animal en los protocolos analizados. Total de puntos representados en la tabla: 55/60. Los restantes corresponden a transiciones de las cuales se registraron pocos ejemplos, como finales del canto (2 puntos), $P0 \rightarrow P2$ (1 punto) y final de un segmento tipo P2 (2 puntos). Estos datos dan cuenta de que las transiciones encontradas cubren múltiples tipos de transiciones de frases.

cuatro aves, marcadas por diferencias en el tipo de sílaba P1 antes y después de la transición. La transición P1b $\rightarrow$ P1 está ampliamente representada en Csb253-AzuAma, y hay un ejemplo adicional en Csb103-VeVio, pero no se encontró en Csb1162-BlaVe. Transiciones del tipo P1 $\rightarrow$ P2, P2 $\rightarrow$ P2 y P2 $\rightarrow$ P1 estuvieron representadas con un pico en el LFP para un subconjunto de las aves. Cabe remarcar que esta caracterización se realizó a partir de la tasa silábica antes y después de cada transición, y no a partir de una caracterización de los gestos de presión.

Este resultado muestra que no existe un único tipo de transición representada en los potenciales de campo locales en el núcleo HVC, sino que hay una amplia representación de las posibles transiciones para los cantos de canarios. Para cada ave se encontró un subconjunto de las transiciones presentes en cada canto. En términos de la actividad predicha para el núcleo HVC por parte del modelo circular, la reproducción de todos los gestos de presión requiere de una actividad poblacional sincronizada a nivel del núcleo HVC, ocurriendo con un retraso de unas decenas de milisegundos respecto del inicio de los gestos (ver *El modelo "circular"* (Subsección 1.7.A)). En este caso, las respuestas medidas corresponden a respuestas auditivas al canto propio, lo cual podría estar induciendo un retraso mayor a lo esperado. **La presencia de estas instancias robustas a las transiciones es un resultado no descrito con anterioridad en canarios, y es relevante en la caracterización de los LFP en el núcleo HVC.**

4.3.D. El LFP presenta sincronización en frecuencia a segmentos de canto

La respuesta en los LFP medidos presenta un resultado no descrito con anterioridad: los LFP_{avg} en el núcleo telencefálico HVC presentan oscilaciones de la actividad que están sincronizados en frecuencia y fase a segmentos del canto presentado. Estos segmentos resultan estar relacionados, adicionalmente, con la estructura en frases presente en el canto de canarios. En otras palabras: **en respuesta a algunas frases de los cantos presentados, los LFP del núcleo HVC presentan actividad sincronizada a la tasa silábica en distintas frases.** En términos de la búsqueda de un observable para caracterizar instancias de sincronización de múltiples neuronas en el núcleo, esto es un avance cualitativo: significa que en el LFP no sólo puede medirse una respuesta a nivel general (dado por el aumento de amplitud RMS en la señal durante el canto, Subsección 4.3.B) o asociado a instancias robustas como las transiciones de frases (Subsección 4.3.C), sino que además se puede definir una estructura asociada a características de la evolución temporal de las frases de canto.

Un ejemplo de esta observación puede verse en Figura 4.13. En la figura se muestra el sonograma de un segmento del canto para uno de los animales (Csb253-AzuAma), la señal correspondiente al LFP_{avg} del canal de máxima amplitud RMS para ese protocolo y, por último, el espectrograma del LFP_{avg} , que muestra el contenido espectral y las bandas de frecuencias activas durante distintos segmentos del canto. La sincronización en frecuencia puede apreciarse a partir

de las bandas en el LFP asociadas a respuestas ante distintas frases. Adicionalmente, resulta notable cómo en distintas instancias estas oscilaciones se acoplan a la tasa silábica, incluso de frases contiguas (ver región entre 0 s - 2 s, por ejemplo). Sin embargo, aunque existen oscilaciones bien definidas para algunos casos, éstas no cubren todo el canto (notar, por ejemplo, la ausencia de bandas de frecuencias activas en la región de 6.0 s - 7.5 s). **Es decir, las oscilaciones asociadas a frecuencias silábicas ocurren con mayor prominencia para algunas frases por sobre otras, y no de manera homogénea durante todo el canto.** Por ejemplo, la oscilación generada en respuesta a la segunda frase, correspondiente a una sílaba con tasa silábica de $16,7 \pm 0,9$ Hz, es de mayor amplitud y con una frecuencia estable en toda la duración de la frase en comparación a otros segmentos, como por ejemplo, la respuesta a la frase entre 3.4 s - 4.4 s. En este caso, la oscilación en el LFP está sincronizada a los $21,0 \pm 0,4$ Hz de la frase de canto, pero sólo al principio del segmento. En el segmento de 8–9 s (frase del tipo P2) se observa, curiosamente, que existe una oscilación de corta duración que ocurre a aproximadamente el doble de la tasa silábica (aunque de muy baja amplitud respecto de las descriptas más arriba). Para sílabas del tipo P2, se obtuvieron pocos casos de respuesta como para evidenciar si este es un fenómeno robusto. En las demás respuestas analizadas, este efecto no se reproduce, consiguiendo también para sílabas P2 una respuesta sincronizada en frecuencia a la tasa silábica (de lo cual un ejemplo se muestra en Subsección 4.3.F).

Respecto de la discusión establecida en la introducción sobre si en el núcleo HVC se codifica la cadena de tiempo o instancias de información motora, la posibilidad de medir actividad a gran escala como la dada por los LFP_{avg} podría resultar en un cambio de paradigma experimental, en especial tras el descubrimiento de estas oscilaciones. **Esto se debe a que los LFP y su comportamiento podrían aportar información adicional sobre la cual interpretar la actividad del núcleo y, en particular, la actividad de múltiples neuronas sincronizadas.**

Cabe notar que aunque resultados previos de mediciones del potencial de campo local en diamantes mandarines cantando (Markowitz et al., 2015) mostraron la presencia de actividad oscilatoria en el núcleo HVC, no se estableció ninguna conexión entre el ritmo de 30 Hz encontrado y la estructura del canto. La oscilación en la banda 25–35 Hz fue reportada como la banda más prevalente en el rango de 0 Hz - 100 Hz, con oscilaciones presentes sólo mientras el ave cantaba. Es interesante que en esa especie, la frecuencia característica encontrada en el LFP esté relacionada con la escala temporal característica en la que ocurren cambios a lo largo del canto (Norton & Scharff, 2016).

En los resultados de esta tesis, el contenido espectral de los LFP estuvo siempre acotado a frecuencias por debajo de los 50 Hz, con una frecuencia sincronizada a la tasa silábica en distintos segmentos del canto. Como este fenómeno no fue descripto con anterioridad, este resultado será discutido en detalle durante el resto de la tesis. En particular, en lo que queda de este capítulo se detallarán los resultados obtenidos a nivel de los LFP, y se integrará la información obtenida

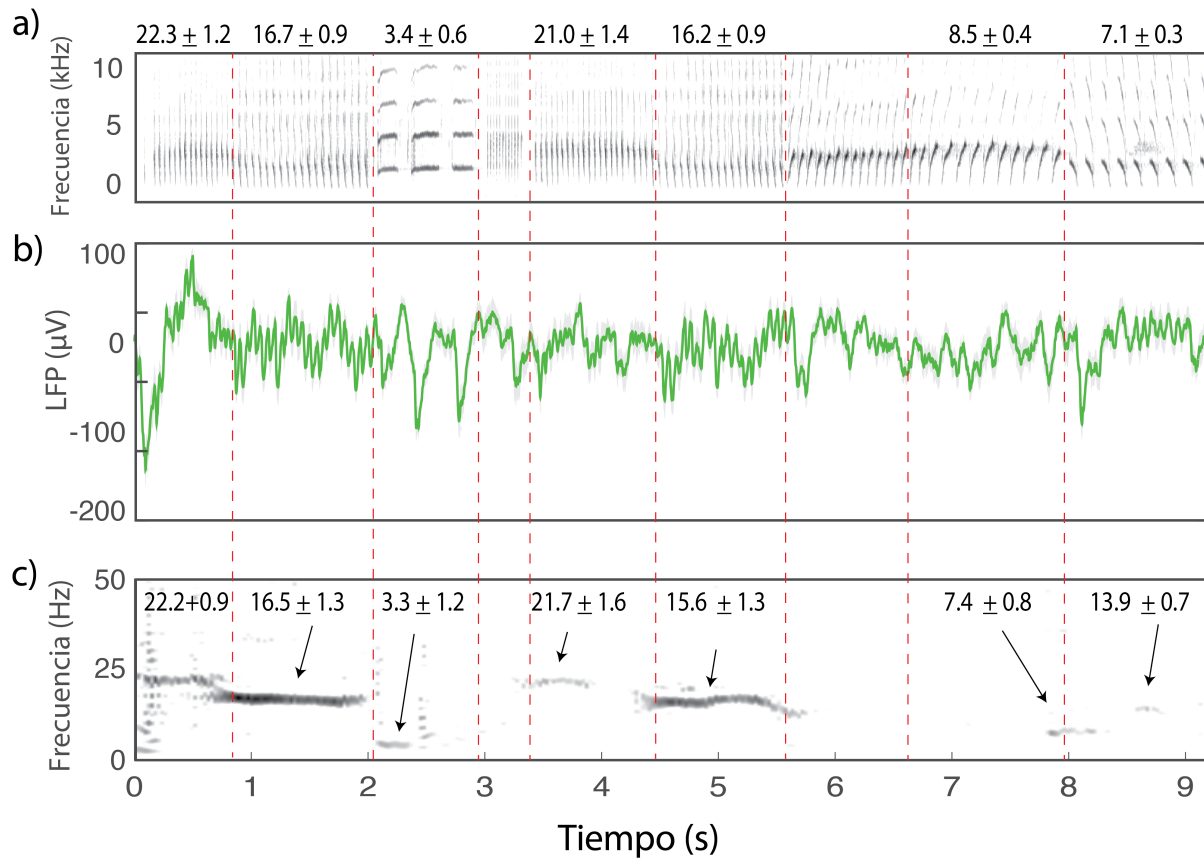


Figura 4.13: Los LFP_{avg} obtenidos para los distintos protocolos presentan oscilaciones robustas durante algunas (pero no todas) las frases del canto. (a) Sonograma de un segmento del canto, mostrando la evolución temporal del contenido espectral. La escala de grises indica la amplitud del espectro en escala logarítmica, normalizado a 70 dB (negro: máxima amplitud, blanco: silencios). Las transiciones entre frases han sido marcadas con líneas punteadas y se extienden sobre la figura como guía visual. En la parte superior del panel se reporta la tasa silábica media de cada frase (en Hz) como (media $\pm$ SD). (b) Potencial de campo local (LFP_{avg}) correspondiente al canal de máxima amplitud RMS en un protocolo de un ave (Csb253-AzuAma). La señal ha sido alineada temporalmente con el estímulo en (a). Como en Figura 4.8, la línea representa el promedio en los ensayos y el sombreado, ($\pm$ SEM). Esta señal presenta oscilaciones definidas y mínimos prominentes durante distintas instancias del canto. (c) Espectrograma del LFP mostrado en (b). Escala de grises representa la amplitud del espectro de potencia, normalizado a 10 dB para visualizar sólo las componentes más salientes del espectro y descartar las componentes de ruido eléctrico de banda ancha de baja amplitud. En la parte superior del panel se muestran los valores de las frecuencias del LFP (en Hz) para estas instancias, ($\pm$ indica SD). Esta figura muestra un resultado sorprendente: la respuesta medida en los LFP corresponde a oscilaciones de la actividad, sincronizadas a la tasa silábica de distintas frases en el canto. Esta sincronización ocurre para algunas (pero no todas) las frases del canto presentado, así como también con mayor o menor amplitud, dependiendo de la frase. En el caso de la última frase de canto, por ejemplo, representa uno de los únicos casos en que la banda de la respuesta ocurre para una frecuencia cercana al primer armónico de la tasa silábica correspondiente y, sin embargo, esta oscilación es de baja intensidad respecto de las encontradas en regiones previas.

con la actividad de las neuronas en el núcleo HVC durante el capítulo siguiente.

4.3.E. El LFP presenta sincronización en fase al estímulo

En la sección anterior se mostró respuesta sincronizada en frecuencia a la tasa silábica de distintas frases a nivel del potencial de campo local. Los resultados mostrados en Figura 4.13 corresponden al LFP_{avg} proveniente de una penetración en el núcleo neuronal HVC. **Este resultado se reproduce también en las mediciones de la actividad en distintos sitios del núcleo.** Se realizaron registros en sitios de HVC separados una distancia mínima de $100\ \mu m$ y máxima de $540\ \mu m$. Adicionalmente, las mediciones analizadas provienen no sólo de distintos sitios de HVC para distintas aves, sino también de sitios de los núcleos HVC de ambos hemisferios cerebrales para 2 de las 4 aves analizadas (ver *Sitios de penetración* (Sección 7.1)).

Las señales correspondientes a los LFP_{avg} de los protocolos de un ave con información bilateral (Csb103-VeVio) se muestran en Figura 4.14. A la izquierda de las señales de los LFP se indica cuáles corresponden a mediciones en HVC de hemisferio izquierdo y cuáles en HVC del hemisferio derecho HVC_{izq} y HVC_{der} , respectivamente. Los protocolos no mostrados en estas figuras fueron o bien protocolos de prueba, protocolos que no tuvieron señal significativa, o que corresponden a la respuesta a un canto propio alternativo y por lo tanto, no fueron tenidos en cuenta en el análisis aquí mostrado.

En una escala global, notar que existen instancias similares entre todos los protocolos del animal, en particular en las oscilaciones de mayor amplitud, que corresponden a la respuesta generada por sílabas del tipo P0. Este resultado resulta tan sorprendente como la primera observación: **los LFP en distintas zonas de HVC comparten características similares en respuesta a las presentaciones auditivas de estímulos, indicando que existen instancias de actividad con un alto grado de sincronización en el núcleo.** Para ver el detalle de este resultado, en las ampliaciones de la figura Figura 4.14b se muestran las regiones de sílabas del tipo P0 de las señales de los LFP_{avg} de los distintos protocolos.

Aunque en la estructura interna de la oscilación lenta se noten diferencias (por ej., la presencia de un doble pico en algunos protocolos en Figura 4.14b), sí es importante resaltar que la oscilación **no sólo está relacionada con la tasa silábica entre los distintos protocolos, sino que además los mínimos prominentes en el potencial de campo local ocurren en instancias características de la sílaba.** Como guía visual, las líneas negras en la figura indican este fenómeno. Estos valles ocurren para cada repetición de la sílaba P0 siguiendo la tasa de repetición silábica del canto original. **Este resultado es sorprendente, en particular al observar la sincronización en la respuesta de distintas zonas de HVC y de los HVC de ambos hemisferios.**

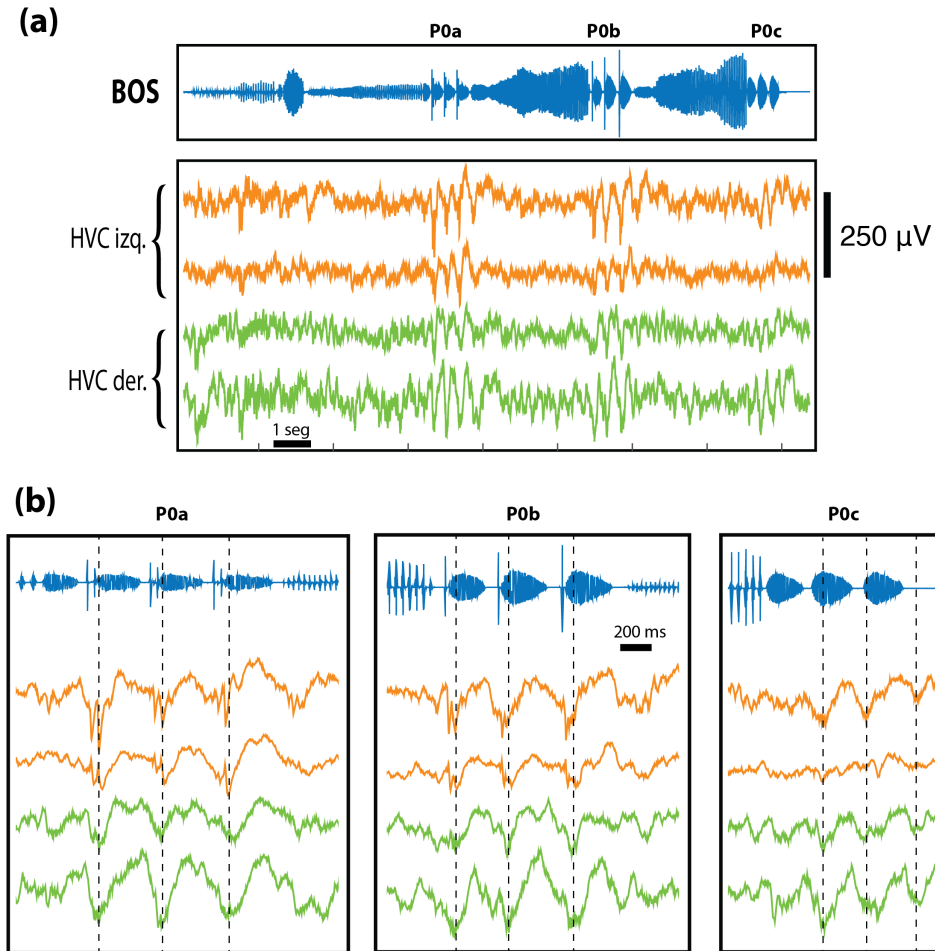


Figura 4.14: LFP_{avg} para los protocolos analizados de un ave (Csb103-VeVio). Los registros están separados en protocolos provenientes de HVC izquierdo y HVC derecho (verde y naranja, respectivamente). En (a) se muestra la respuesta durante todo el canto. En (b) se muestran ampliaciones de las tres regiones de la señal que presentan mayor nivel de respuesta. En estas regiones existen mínimos prominentes en respuesta a las sílabas del tipo "P0". Estos mínimos aparecen como respuesta a cada una de las sílabas en cada frase, generando una oscilación que se corresponde con la tasa silábica del canto. Adicionalmente, la distancia de los mínimos al comienzo silábico es consistente en las distintas mediciones dentro de un mismo núcleo HVC (líneas punteadas). Más sorprendente aún, este fenómeno es también observado al registrar la actividad en los HVC de ambos hemisferios para el mismo animal. En esta figura, "P0a", "P0b" y "P0c" indica 3 frases de sílabas P0 distintas. La frase "P0c" corresponde a sílabas P0 que no presentan la primer nota de una sílaba P0 típica.

4.3.F. Respuesta estructurada en frases

Existen diversos ejemplos de regiones de interés en las respuestas analizadas, más allá de los casos de sílabas P0. En Figura 4.15, Figura 4.16 y Figura 4.17 se muestran ejemplos de respuesta para frases del tipo P1 y P2 para distintos animales. Esto construye sobre la observación mostrada en Figura 4.13 y muestra la robustez de la adaptación en frecuencia por parte del LFP_{avg} en respuesta a distintos tipos de sílabas presentes en el canto.

En Figura 4.15 y Figura 4.16 se muestran las respuestas medidas en múltiples protocolos para sílabas del tipo P1, Figura 4.16 corresponde a datos del mismo animal que los datos mostrados en Figura 4.13, Csb253-AzuAma. Los datos mostrados en Figura 4.15, en cambio, corresponden a Csb103-VeVio, el mismo animal cuyos datos se mostraron en escala global en Figura 4.14. En cada figura, el panel superior (a) muestra el segmento de canto y su correspondiente sonograma. Cada traza mostrada en (b), el panel medio, es el LFP_{avg} de un protocolo distinto. Notar que en cada caso las oscilaciones son robustas durante la mayor parte de la duración de la frase. No sólo esto, sino que, como se discutió arriba, **esta oscilación ocurre de manera similar para los distintos sitios explorados del núcleo HVC**. Este efecto es más dramático aún cuando se considera que es independiente del hemisferio en que se mide, mostrando que las oscilaciones no sólo están sincronizadas en frecuencia a la tasa silábica de la respectiva frase, sino que además presentan sincronización en una fase específica respecto del inicio silábico. Notar que existen pequeñas variaciones en las trazas de los LFP_{avg} , y en algunos casos la oscilación no presenta robustez durante toda la frase. Aún siendo este el caso, **la presencia de la oscilación con una fase común en distintos sitios puede estar dando cuenta de actividad sincronizada a gran escala**.

Las instancias marcadas con líneas por encima de cada mínimo en las señales indican el tiempo de detección de un evento considerado. Para detectarlas, se realizó una búsqueda de picos sobre los LFP_{avg} imponiendo que la amplitud mínima para la detección equivaliera al valor RMS de toda la señal (para el detalle de cómo se detectaron estos eventos, ver *Análisis de la respuesta* (Sección 4.2.C)). De esta manera, se lograron aislar los picos prominentes en las regiones de interés para cada señal.

En los paneles superiores (a) de Figura 4.15 y Figura 4.16 se muestran los eventos detectados superpuestos sobre la señal de sonido. Notar que existe una gran densidad de eventos en los intervalos entre el final de las sílabas y el comienzo de la siguiente. En principio, este agrupamiento podría estar ocurriendo hacia el final de las sílabas o hacia el comienzo de la siguiente, dado que existe una cierta dispersión en la distancia al inicio silábico de los distintos eventos. Los histogramas de los paneles inferiores (c) corresponden a valores de frecuencia relativa ($\#cuentas/N$), con N el total de observaciones, interpretados como valores de probabilidad de ocurrencia de un pico en cada columna. Estos histogramas muestran las distribuciones obtenidas para los datos mostrados en cada figura, cuantificando la observación de que los mínimos de los LFP están

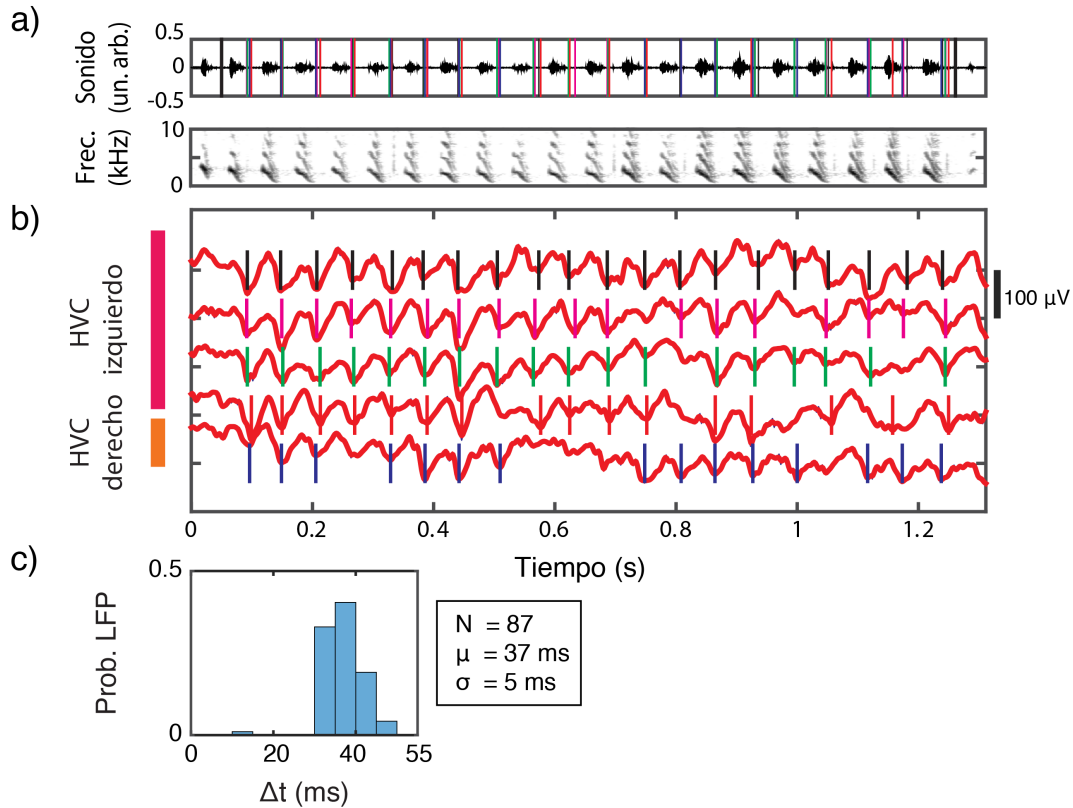


Figura 4.15: Ejemplo de respuesta observada en el LFP para una frase del tipo P1, para todos los protocolos que presentaron respuesta para un animal (Csb253-AzuAma). La oscilación sostenida del LFP corresponde a la frecuencia silábica, independientemente del sitio de medición dentro del núcleo neuronal HVC o del hemisferio cerebral donde fueron registrados los datos. (a) Segmento de señal de canto y su sonograma. (b) Trazas correspondientes a los LFP_{avg} de distintos protocolos, provenientes de distintos sitios en HVC (indicados a la izquierda). Las líneas verticales muestran la posición de los mínimos detectados sobre la señal con un criterio de umbral de amplitud relativa (ver *Análisis de la respuesta* (Sección 4.2.C)). Las distancias de los picos del LFP respecto al inicio de cada sílaba se agrupan en término de una instancia específica, como se muestra en el histograma en (c). Notablemente, existe un agrupamiento de los valores de Δt entre todos los protocolos. Esto implica que la oscilación no sólo ocurre sincronizada en frecuencia a la tasa silábica de la frase, sino que además existe una sincronización en fase que se mantiene los sitios de HVC explorados, dada por $\Delta t = 37 \pm 5$ ms.

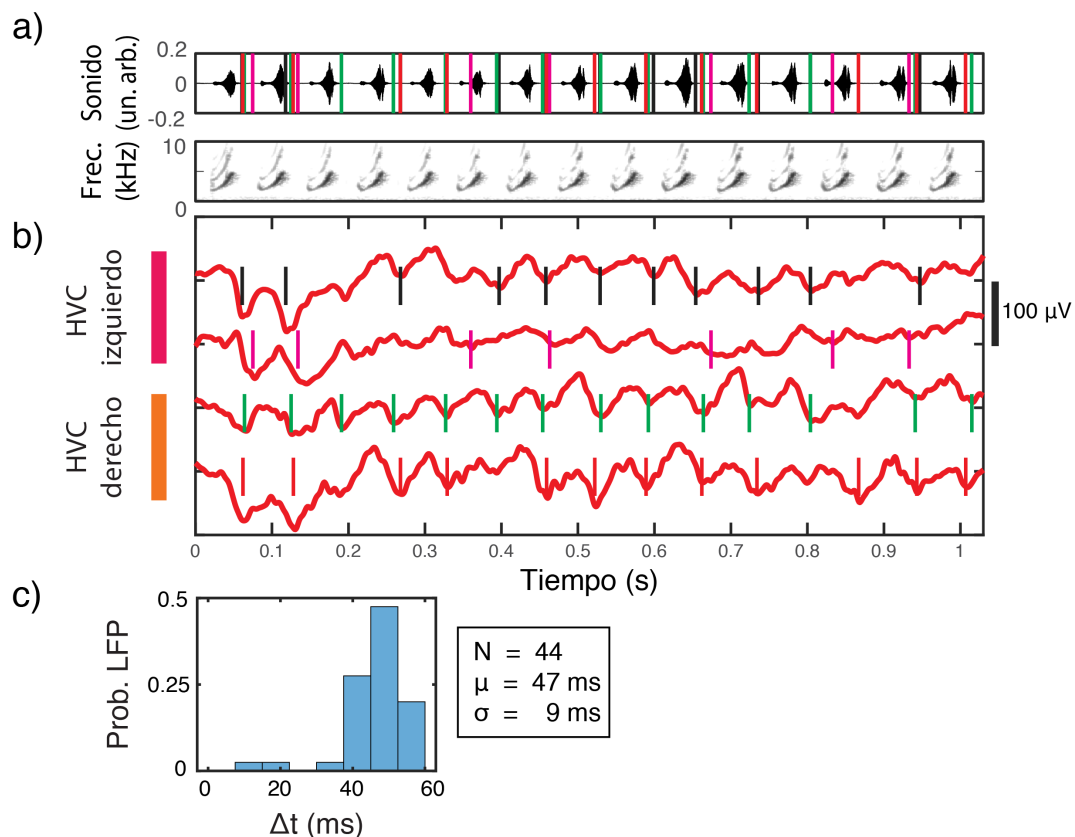


Figura 4.16: Ejemplo de respuesta observada en el LFP para una frase del tipo P1 en otro sujeto que la mostrada en Figura 4.15 (Csb103-VeVio). La figura está organizada de la misma manera que Figura 4.15. Al igual que en el caso anterior, se puede ver que la respuesta presenta oscilaciones robustas de la actividad a lo largo de los protocolos. Ante oscilaciones de baja amplitud, como la segunda traza mostrada en (b), el umbral de detección resulta robusto al no inducir falsos positivos. Como en el ejemplo mostrado en Figura 4.15, las instancias detectadas se agrupan para un Δt característico, indicando actividad sincronizada en respuesta a las sílabas de la frase. En este caso, $\overline{\Delta t} = 44 \pm 9$ ms, valor que resulta comparable al encontrado para el ejemplo anterior. Este resultado muestra que para sílabas del mismo tipo, se tienen resultados comparables, incluso para frases distintas y provenientes de aves diferentes.

agrupados en un entorno de cierta instancia específica respecto del inicio silábico. En particular, notar cómo para sílabas del tipo P1 de distintos animales las distribuciones resultan similares, con valores medios de 37 ± 5 ms y 47 ± 9 ms. Esto es una consecuencia directa de la elección de canarios como aves de estudio: dado que las sílabas del mismo tipo tienen su origen en gestos motores similares, una hipótesis de trabajo es que la estrategia de codificación neuronal también debe presentar características similares. **Estos resultados muestran indicios de que para sílabas del mismo tipo, las respuestas en los LFP de distintos animales resulta comparable, haciendo que sea posible agrupar los datos medidos en los núcleos HVC de aves diferentes.**

Aunque en menor cantidad de ejemplos sobre el total de los protocolos mostrados, en Figura 4.17 se muestra la respuesta ampliada en múltiples protocolos para una frase del tipo P2,

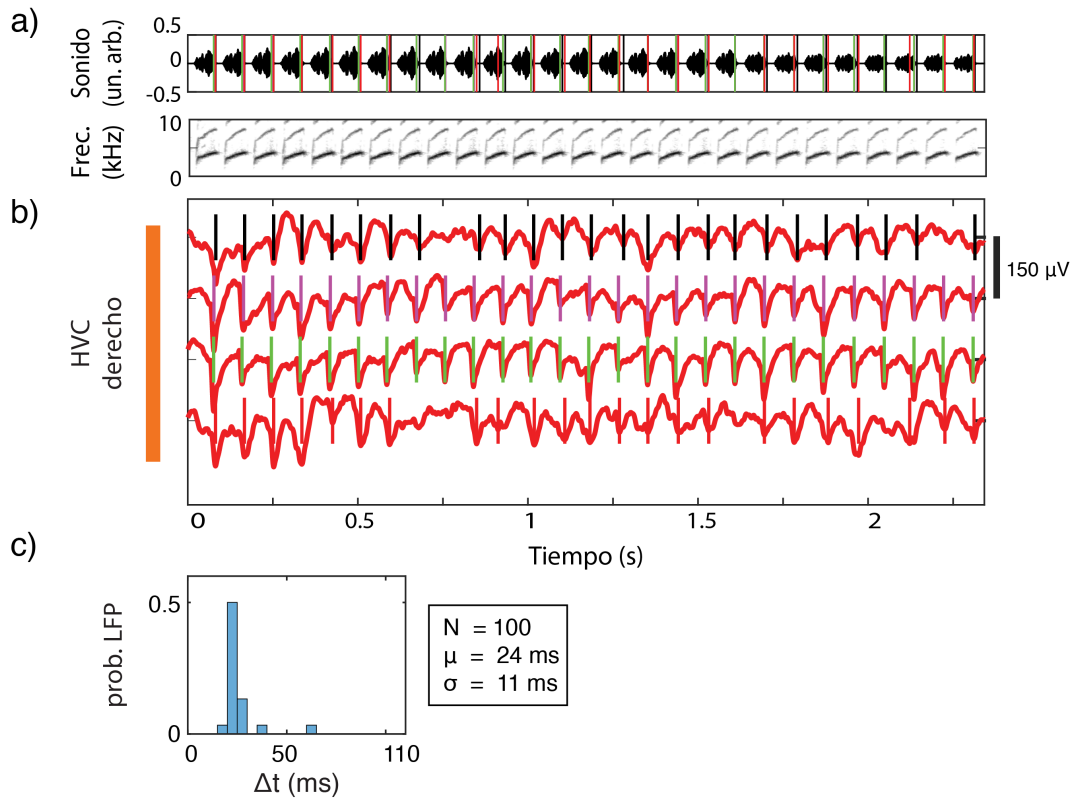


Figura 4.17: Ejemplo de respuesta observada en el LFP para una frase del tipo P2. Los datos provienen de un animal distinto que los mostrados en Figura 4.15 y Figura 4.16 (Csb1162-BlaVe). La figura está organizada de la misma manera que los casos anteriores. Se observa la presencia de una oscilación sincronizada a la tasa silábica del estímulo en el LFP_{avg} , y con una fase determinada respecto del estímulo presentado. Para estas sílabas, notar que existe una gran asimetría en la forma de los mínimos encontrados respecto de los casos de sílabas P1. Esto hace que la fase respecto del inicio sea distinta, con $\overline{\Delta t} = 24 \pm 11 \text{ ms}$. Más allá del valor obtenido para Δt es importante notar que la dispersión no aumenta considerablemente. Pero, dado que la duración de la sílaba es mayor respecto de las P1, esta dispersión hace que las instancias cubran un porcentaje menor de la duración total de las sílabas.

provenientes de otro animal distinto al de Figura 4.15 y Figura 4.16 (Csb1162-BlaVe). Como para los casos de sílabas del tipo P1, **para las tipo P2 también se encontraron oscilaciones robustas en múltiples sitios del núcleo HVC**. Los datos analizados para este animal provienen de mediciones realizadas en el núcleo HVC del hemisferio cerebral derecho. En este caso, **las instancias de mínimos prominentes presentan una menor dispersión relativa respecto del período silábico, debido a la mayor duración de las sílabas del tipo P2 por sobre las sílabas P1**. Este es el principal argumento sobre el cual se quiere construir evidencia para aportar al debate respecto del rol de las neuronas del núcleo HVC en la producción del canto: en canarios, el canto cuenta con sílabas de mayor longitud, donde las transiciones de gestos están más separadas entre sí respecto de lo observado para de diamantes mandarines. Dado que para sílabas del tipo P2 no se encontraron ejemplos de respuesta robusta en más de un animal, los análisis del resto de la

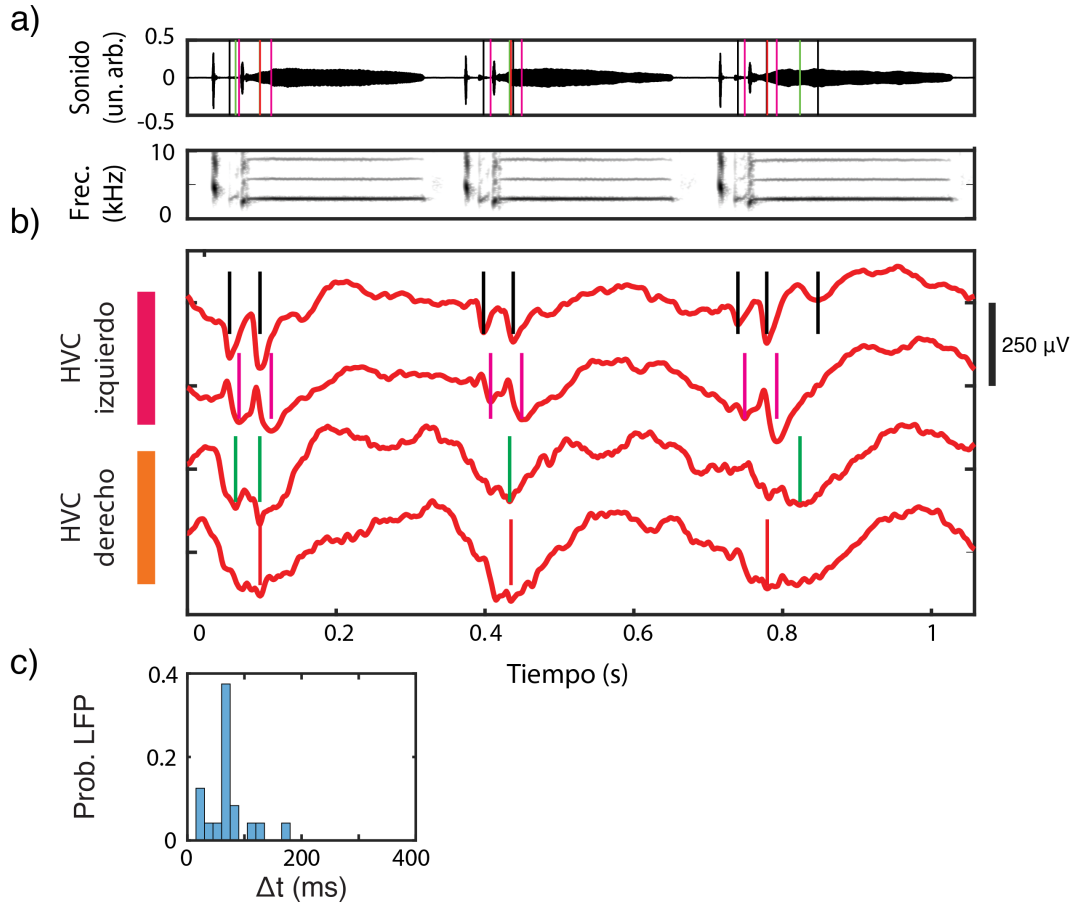


Figura 4.18: Ejemplo de respuesta observada en el LFP para una frase del tipo P0 (Csb103-VeVio). La figura está organizada como los ejemplos anteriores. En este ejemplo se muestran trazas de LFP_{avg} correspondientes a protocolos medidos en los núcleos neuronales HVC de ambos hemisferios para el mismo animal. Notar que, en adición a la oscilación que se corresponde con la tasa silábica, existen casos donde hay una estructura interna, dada por el doble pico en los LFP_{avg} correspondientes al hemisferio izquierdo. Notar adicionalmente el agrupamiento de los eventos de gran amplitud en los LFP medidos, con la mayor parte de los retrasos en $\Delta t < 150$ ms. Estos resultados son compatibles con las predicciones del modelo circular para la actividad del núcleo HVC, entre las cuales está la predicción que para estas sílabas se debería tener actividad neuronal sincronizada cerca del comienzo de la sílaba. El LFP, al ser una medida de actividad neuronal a gran escala, podría estar relacionado con la actividad de las neuronas en el núcleo. Esto será explorado en Capítulo 5.

tesis se centrarán en sílabas del tipo P0 y P1.

Finalmente, como se mostró en figuras anteriores, **la respuesta de mayor prominencia en cuanto a amplitud de la señal corresponde a sílabas del tipo P0**. Debido a que son las sílabas de mayor longitud, se espera que éstas provean un marco muy claro en el cual contrastar las predicciones del modelo circular (Subsección 1.7.A). En Figura 4.18 se observa que los mínimos prominentes de la señal ocurren de manera robusta durante el primer tercio de la sílaba, cerca del inicio, para los distintos protocolos. Por este motivo, la agrupación de las instancias en estas sílabas es de gran interés. Notar que sólo algunos protocolos (las dos trazas superiores en (b)) presentan de manera robusta la estructura de doble pico en la señal, mientras que los otros protocolos sólo presentan la oscilación a la tasa silábica. El doble pico queda representado en el histograma como un primer pico pequeño donde se agrupan las instancias (entre 15–30 ms), mientras que el pico principal se encuentra a 65–75 ms. La ventana mostrada en (c) corresponde al período intersilábico, por lo cual es notable la agrupación de las instancias en la primer porción de la sílaba.

Teniendo todos los ejemplos mostrados en esta sección en cuenta, resulta notable el nivel de sincronización de la actividad para distintos sitios del núcleo HVC de un mismo animal, e incluso para los datos de HVC de ambos hemisferios. En particular, las sílabas del tipo P0 presentan un candidato ideal sobre el cual evaluar las predicciones del modelo circular. En estas sílabas, **las instancias encontradas apuntan en dirección a validar las predicciones realizadas por el modelo circular, y también están en acuerdo con la predicción de que éstos deberían ocurrir retrasados respecto del inicio silábico**. Esto, a su vez, plantea el camino sobre el cual profundizar la caracterización de esta medida de la actividad en el núcleo, haciendo especial énfasis en la pregunta de si las instancias de información motora que son representadas a nivel del LFP están relacionadas con la actividad sincronizada de múltiples neuronas en HVC. Esta pregunta será el eje central de Capítulo 5.

4.3.G. Resultados agrupados

Antes de abarcar la pregunta de la relación de las respuestas medidas en el LFP con la actividad de las neuronas en el núcleo, en esta sección se plantea el agrupamiento de los datos obtenidos para todas las mediciones de distintos animales.

En los 16 protocolos analizados de las 4 aves que presentaron señal con respuesta significativa, se encontraron casos de sincronización a la tasa silábica para ejemplos de frases P0, P1 y P2, cubriendo un amplio rango de frecuencias posibles para las oscilaciones encontradas en el potencial de campo local (2 Hz a 25 Hz). En los protocolos analizados se buscaron instancias de interés en el LFP a partir de la detección de picos prominentes en los segmentos de las señales que presentan respuesta a distintas frases del canto. En Tabla 4.2 se muestra un resumen de la

cantidad de frases que presentaron respuesta y en cuántos protocolos para los distintos animales analizados.

	P1b	P1	P2	P0
Csb039-VioAma [†]	◇	2(1)	x	4(1)
Csb103-VeVio	◇	1(5)	x	3(5)
Csb253-AzuAma	x	1(6)	x	2(6)
Csb1162-BlaVe [†]	x	7(4)	2(4)	x
Rango freq. (Hz)	x	14.9–21.7	x	2.5–3.2
Período sil. (ms)	x	46–67	x	310–400
Eventos totales	◇	597	x	95

Tabla 4.2: Resumen de eventos en LFP relacionados con tasa silábica. Cada columna indica un tipo de sílaba distinto, siguiendo la clasificación mostrada en *El canto de los canarios* (Subsección 4.2.A). En cada fila, el valor numérico indica la cantidad de segmentos en la respuesta asociados a cada tipo silábico. Los valores entre paréntesis indican la cantidad de protocolos de ese animal en los que se tuvo respuesta. [†] indica que para esos animales se tienen datos sólo de un hemisferio cerebral (izquierdo para Csb039-VioAma y derecho para Csb1162-BlaVe). ◇ marca la ocurrencia de respuesta en sílabas pulsátiles (P1b), en las cuales hubo presencia de un evento robusto al inicio de la frase, pero no se tuvo una oscilación sostenida (ver *El LFP indica transiciones entre frases de canto* (Subsección 4.3.C)). Por el mismo motivo, sólo se detallan los rangos de tasas silábicas para sílabas de tipo P1 y P0, sobre las cuales se centra el análisis de datos agrupados. La cantidad de eventos refiere a la cantidad de mínimos prominentes detectados en total para cada tipo silábico, repartidos entre los protocolos de las distintas aves.

A partir de los resultados mostrados en Tabla 4.2, se agruparon los datos de las respuestas. Siguiendo con lo mostrado en la sección anterior, al agrupar los datos se tiene que **la frecuencia medida en el LFP_{avg} para cada segmento del canto con respuesta sigue una relación lineal con la tasa silábica de la frase en ese segmento**, como puede verse en la figura Figura 4.19. En esta figura, cada punto corresponde a una frase de canto y cada tipo de símbolo a un animal distinto. Las barras de error de cada punto representan la desviación estándar a partir de tomar el promedio de la frecuencia en la respuesta medida en el LFP en los distintos protocolos. Por ejemplo, tomando el caso de las trazas de la figura Figura 4.17, esto quiere decir que se determinó la frecuencia de la oscilación para cada traza de LFP_{avg} y de los valores obtenidos se tomó promedio y desviación estándar, dando así un punto en la figura Figura 4.19. El valor asignado al eje de las abscisas proviene de la tasa silábica promedio en la frase, determinada a partir de los inicios silábicos (ver Sección 4.2.B)

El ajuste lineal realizado a los datos fue $LFP_{freq} = ax + b$, con $a = 0,99 \pm 0,03$ y $b = -0,2 \pm 0,4$ ($R^2 = 0,998$). En Figura 4.19, las líneas punteadas verticales marcan los rangos de tasa silábica para las sílabas del tipo P0, P1 y P2 (ver *El canto de los canarios* (Subsección 4.2.A), (Alliende et al., 2010)). Todos los puntos salvo uno caen en el interior de las rectas dadas por un intervalo de confianza del 95 %, indicando que una relación lineal explica satisfactoriamente la relación entre los datos. A pesar de lo impactante del resultado, es curioso que estas oscilaciones no hayan sido

observadas para todas las frases del canto. Esto puede deberse a un sub-muestreo de la actividad de HVC (la actividad medida corresponde a sólo una zona dentro del núcleo). Adicionalmente, para el caso de sílabas de tipo P2 sólo se registró respuesta de manera robusta para un solo ave, por lo cual todos los análisis subsiguientes se centraron en sílabas del tipo P0 y P1. Es interesante notar que tampoco se encontraron oscilaciones de frecuencias mayores a los 27 Hz (rango de sílabas del tipo pulsátil). De todos los protocolos medidos, aproximadamente el 35 % de las instancias de frases de canto presentaron oscilaciones robustas. Esto reafirma el resultado discutido a partir de un ejemplo particular en Figura 4.13: los LFP_{avg} medidos no presentan una sincronización a la tasa silábica en todas las frases durante el estímulo. Esto puede deberse a que no se haya explorado de manera completa el núcleo HVC.

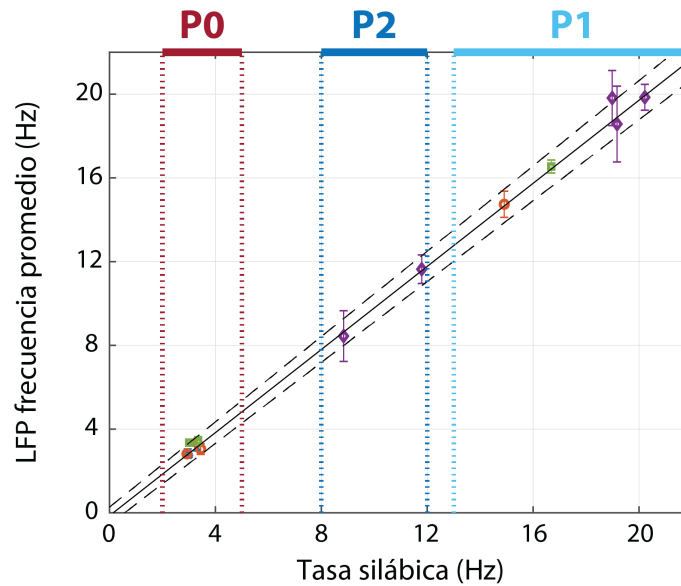


Figura 4.19: Correspondencia entre la frecuencia medida en LFP_{avg} y la tasa silábica de la frase correspondiente. Los datos agrupados de las frases que presentaron una oscilación robusta cubren el rango de frecuencias asociado a las sílabas del tipo P0, P2 y P1. La frecuencia medida en el LFP está relacionada linealmente con la tasa silábica del segmento evaluado en cada caso. La pendiente del ajuste lineal $a = 0,99 \pm 0,03$ es cercana a 1, y la banda de confianza del ajuste cubre todas las observaciones realizadas.

Adicionalmente a la caracterización de la correspondencia en frecuencia, **el resultado más sorprendente es la sincronización en fase que se obtiene al analizar los eventos detectados en cada señal respecto del inicio silábico previo.** Para cada tipo de sílabas se agruparon los datos provenientes de las distintas aves (histogramas mostrados en Figura 4.20). Los segmentos de sílabas mostrados en la figura corresponden a un ejemplo de cada tipo silábico (normalizados por amplitud máxima) y al silencio entre una sílaba y la siguiente. Es decir, la ventana de tiempo mostrada corresponde a un período silábico. La diferencia de tamaño entre las figuras para sílabas del tipo P0 y P1 mantiene la relación entre las duraciones de ambos tipos silábicos. Para

las sílabas del tipo P0 se tomó como inicio silábico el comienzo de la primer nota (pulso breve de alto contenido espectral). En el análisis agrupado no se tuvieron en cuenta las sílabas P0 que no presentaran esta primer nota.

Estos resultados muestran que las instancias medidas en la respuesta a partir de los LFP_{avg} no sigue una distribución uniforme a lo largo de las duraciones de las sílabas de los distintos tipos, si no que presentan mayor densidad de probabilidad al estar agrupadas en ciertas instancias. En particular, el caso de las sílabas P0 hacen evidente que existen grandes zonas con una muy baja probabilidad de ocurrencia de un pico. Esto aporta nueva evidencia en pos de rechazar la “hipótesis del reloj”, dado que la mayor probabilidad de ocurrencia de picos en el LFP se agrupan en un entorno de instancias motoras relevantes.

Para poner a prueba la hipótesis de que estos datos no están uniformemente distribuidos, se realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov de bondad de ajuste bajo la hipótesis nula de que los datos provienen de una distribución continua uniforme en el rango determinado por el intervalo [0,400] ms para las sílabas P0 y [0,55] ms para las sílabas del tipo P1. Tanto para este caso (P1) como para el primero (P0s), esta prueba rechazó la hipótesis nula al 1 % de significancia ($p = 1 \times 10^{-28}$) para los datos provenientes de sílabas del tipo P1 y ($p = 6 \times 10^{-22}$) para el caso de las sílabas P0. Esto da relevancia estadística a los resultados, e indica que **las instancias encontradas en los LFP_{avg} no están distribuidas uniformemente durante la duración de las sílabas.**

Como caracterización adicional, las distribuciones de los datos no siguen una distribución normal (test de Shapiro-Wilk al 1 % de significancia), dando como resultado $p = 1 \times 10^{-7}$ para las sílabas del tipo P0 y $p = 2 \times 10^{-7}$ para los datos correspondientes a sílabas del tipo P1. Para el caso de las sílabas P0, esto probablemente se deba a la presencia de un doble pico en la distribución, mientras que para las sílabas del tipo P1 se obtienen algunas instancias más cercanas al inicio de las sílabas (<20 ms) que hacen que la distribución se desvíe de una distribución normal.

El doble pico en la distribución de los datos de respuesta a sílabas del tipo P0 emerge de los datos a partir de casos en los cuales el LFP presenta una estructura por sobre la oscilación, como se ve en Figura 4.18. Como puede observarse en los histogramas, aunque el 82 % de los valores estén concentrados por debajo de los 150 ms, existen algunos casos de picos presentes durante el resto de la sílaba. Estos picos corresponden a picos secundarios y de menor prominencia que los concentrados en < 150ms. **Los picos de mayor interés y que aportan información relevante en términos de las instancias robustas en los LFP_{avg} de los datos agrupados están acotados en el rango < 150 ms.** Para estos datos, un modelo de mezcla Gaussiana, con dos funciones centradas en los valores más probables del histograma logran capturar la distribución de probabilidad. Para este motivo, se realizó un ajuste utilizando el método de estimadores de máxima verosimilitud a un modelo del tipo:

$$f(x|p, \mu_1, \mu_2, \sigma_1, \sigma_2) = (1 - p) \frac{1}{\sigma_1 \sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(x - \mu_1)^2}{2\sigma_1^2}\right) + p \frac{1}{\sigma_2 \sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(x - \mu_2)^2}{2\sigma_2^2}\right) \quad (4.1)$$

, con p un parámetro de proporcionalidad para la mezcla de las dos funciones gaussianas, y μ_1 y μ_2 ; σ_1 y σ_2 los parámetros correspondientes para cada una de las funciones. Los parámetros con los que se inicializó el ajuste se muestran en Tabla 4.3, así como los valores obtenidos para cada parámetro con sus intervalos de confianza al 95 %. Los valores encontrados para μ_1 y μ_2 presentan una diferencia (en promedio) de unos 51 ms. Tomando los valores extremos de límites inferiores y superiores, se obtiene el intervalo $\Delta\mu_{1,2} = [39, 64] \text{ ms}$. Este intervalo es del orden de magnitud de la distancia promedio entre el inicio de la primer nota (pulso de alto contenido espectral, de corta duración) y la segunda (sonido tonal de larga duración), de $\Delta t_{P0} = 31,6 \pm 7,1 \text{ ms}$. Como referencia adicional, tomando los valores máximos en histogramas con columnas de 15 ms, el primer pico se presenta en la columna de (15–30) ms, mientras que el segundo pico se encuentra en el intervalo (60–75) ms. Para las sílabas tipo P1, el máximo del histograma cae entre (35–40) ms y la distribución presenta un valor medio de $\Delta t = 34 \text{ ms} \pm 13 \text{ ms}$, con $\pm$ la desviación estándar de la muestra.

Parámetros	p	μ_1 (ms)	μ_2 (ms)	σ_1 (ms)	σ_2 (ms)
Valor inicial	0.5	43	81	21	21
Valor MLE	0.2	24	76	8	22
Límite inferior	0.07	19	69	3	16
Límite superior	0.3	30	82	12	27

Tabla 4.3: Tabla de valores de parámetros estimados mediante el método de máxima verosimilitud para explicar el agrupamiento de los datos en las sílabas del tipo P0, para los valores en el rango por debajo de los 150 ms respecto de los inicios de la sílaba.

En conjunto, los resultados de este capítulo muestran que, para las frases en las que se encontró respuesta y, en particular para sílabas del tipo P0 y P1, la respuesta se agrupa en un entorno de instancias significativas del canto.

4.4. Discusiones

En este capítulo se han descripto en detalle las metodologías incorporadas al Laboratorio de Sistemas Dinámicos como parte del trabajo doctoral contenido en esta tesis. En comparación a los experimentos realizados con electrodos de un solo canal, los registros con sondas multielectrodo abren una miríada de nuevas posibilidades. El objetivo fue estudiar la codificación neuronal del canto propio del ave en el núcleo telencefálico HVC. Este núcleo, sensorimotor en naturaleza, contiene neuronas cuya actividad presenta patrones similares de activación durante el canto y

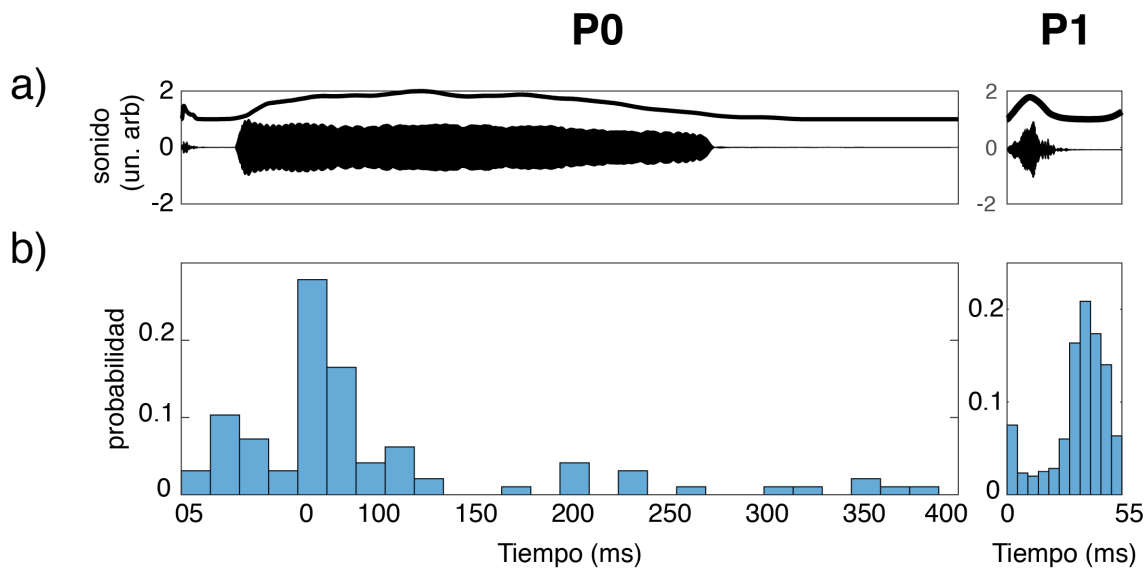


Figura 4.20: Datos agrupados de distancia entre inicio silábico y ocurrencia de mínimos en el LFP para sílabas del tipo P0 (derecha) y P1 (izquierda). Para P1, datos de 4 animales (Csb039-VioAma, Csb103-VeVio, Csb253-AzuAma y Csb1162-BlaVe), mientras que para P0 los datos corresponden a 3 animales (Csb103-VeVio, Csb253-AzuAma y Csb039-VioAma). Los datos corresponden a la distancia al inicio silábico de la ocurrencia de un pico prominente en el LFP. La ventana temporal mostrada corresponde al período intersilábico en cada caso. La diferencia de tamaño entre las figuras mantiene la escala relativa de duraciones para sílabas del tipo P0 y P1, de las cuales se muestran ejemplos característicos en (a)). Para la respuesta a sílabas P1, la distribución presenta un máximo entre $(30 - 50)ms$, con un valor medio de $\Delta t = 34ms$ y $\sigma = 13ms$ (b). Para las sílabas de tipo P0, se ajustó un modelo de mezcla gaussiana para capturar la bimodalidad de la estructura en el histograma. Restringiendo a los valores $\Delta t < 150ms$, se obtuvo un ajuste satisfactorio utilizando estimadores para los parámetros mediante el método de máxima verosimilitud (ver texto y Tabla 4.3). Notar que en (b), para las sílabas del tipo P0, el 82 % de los puntos se encuentra en una duración menor a 150 ms, indicando que los picos hallados del LFP no se encuentran uniformemente distribuidos a lo largo de toda la duración (prueba de Kolmogorov-Smirnov, $p = 6 \times 10^{-22}$).

ante la escucha de una grabación del canto propio (Dave & Margoliash, 2000; Prather et al., 2008). Los experimentos contenidos en este capítulo consistieron en estudiar la respuesta generada al usar grabaciones del canto como estímulo estímulos auditivos en canarios anestesiados.

Durante años, la estrategia utilizada en la descripción de la actividad del núcleo neuronal HVC se ha enfocado con sumo nivel de detalle en la actividad de las neuronas individuales (entre otros: (Hahnloser & Fee, 2007; Hahnloser et al., 2002; Mooney, 2000)). Este enfoque ha sido el motor de grandes avances técnicos, tecnológicos y del conocimiento de los circuitos y mecanismos neuronales relacionados con el canto. Pero, aunque las nuevas tecnologías y preparaciones han permitido medir un gran número de neuronas individuales, la máxima cantidad de unidades registradas en un mismo animal es del orden de las decenas o centenas (Lynch et al., 2016, registros electrofisiológicos), (Picardo et al., 2016, registros de actividad por marcadores de calcio). Sin embargo, en términos de un núcleo que tiene decenas de miles o hasta cientos

de miles de neuronas (Bottjer et al., 1986; Tramontin et al., 1998), esta cantidad es menor al 1 %. Comprender el rol de un núcleo en la producción del canto a partir de la medición de un número reducido de neuronas presenta la dificultad asociada de poder interpretar el rol de las unidades individuales sin un marco de referencia. Por el otro lado, observaciones inspiradas en la validación de un modelo de baja dimensión para la producción del canto llevaron a la descripción de un fenómeno que no podría haber sido interpretado sin el marco provisto por el funcionamiento de la biomecánica (Amador et al., 2013). Cerrar la brecha entre el mundo microscópico dado por la actividad de neuronas individuales y el macroscópico dado por el comportamiento resulta una tarea de suma dificultad. A esto se le sumó que el comportamiento de los diamantes mandarines no resulta adecuado para desambiguar entre las dos visiones del funcionamiento del sistema del canto introducidas en Capítulo 1. A partir de la perspectiva neuroetológica, la segunda mitad de esta tesis se centró en estudiar la codificación neuronal del canto en canarios, ya que esta especie presenta bondades respecto de los diamantes mandarines.

El enfoque en esta segunda mitad de la tesis, comenzó además abordando la pregunta con otra mirada, y en búsqueda de recuperar una descripción desatendida en el campo del canto de aves, pero que ha cobrado nuevamente relevancia en estudios en mamíferos (Buzsáki, 2006; Buzsáki et al., 2012). Una de las principales motivaciones de este capítulo fue la de sumar al debate entre modelos para el funcionamiento de HVC un observable mesoscópico de la actividad neuronal, dado por los potenciales de campo local. De esta manera, se obtuvo una herramienta en la cual pueden recuperarse instancias de sincronización de la actividad del núcleo.

Desde el inicial planteo de la hipótesis del reloj (Fee et al., 2004), la discusión se ha estancado, en parte, porque bajo esta visión cualquier “hueco” de la actividad de neuronas durante el canto puede interpretarse como un sub-muestreo de las neuronas en HVC debido a limitaciones técnicas. Por ese motivo, los observables de actividad a gran escala como el LFP representan evidencias novedosas sobre las cuales re-visitar y re-interpretar las extrapolaciones que se han realizado históricamente sobre la actividad del núcleo.

En la respuesta medida a nivel del LFP, se describieron fenómenos que no han sido reportados con anterioridad y que aportan nueva información sobre la codificación del canto en el cerebro de las aves canoras. A partir del análisis de las señales obtenidas para los distintos protocolos, se observó que existe una **distribución espacial de la señal, y que un gran número de canales en la sonda presentan actividad correlacionada** (esto será profundizado en el capítulo siguiente). Los resultados descriptos en el resto del capítulo consistieron en análisis sobre los LFP de los canales de mayor amplitud en cada registro. Las señales analizadas fueron promediadas en ensayos LFP_{avg} , de modo de estudiar el emergente robusto en la respuesta. La respuesta en el LFP se caracterizó como tal debido a la **presencia de eventos de mayor amplitud** (mínimos prominentes) en respuesta al canto respecto a los períodos de silencio. En esta línea, se encontró **la presencia de mínimos robustos en los LFP_{avg} a nivel de transiciones entre las**

frases del canto . En términos de la dinámica interna del núcleo neuronal HVC, estos mínimos pueden estar proveyendo una señal necesaria para el tipo de cambio cualitativo que implica una transición a un tipo de patrón motor (frase) diferente. Esto es de suma relevancia en el canto de canarios, dado que las transiciones en un punto del canto pueden afectar las probabilidades de transición de sílabas hasta 5 frases más adelante (Markowitz et al., 2013). No puede descartarse que el no haber encontrado representadas **todas** las transiciones de frases en los LFP estudiados se deba a un sub-muestreo del núcleo HVC. Sin embargo, dada la correlación de largo alcance en la estructura interna del canto, podría ser el caso que los mínimos del LFP en la cercanía de las transiciones constituyan señales que indiquen distintos puntos de ramificación en el canto.

Los resultados mostrados en este capítulo constituyen - a conciencia del autor - las primeras evidencias de las dinámicas neuronales subyacentes a la codificación de transiciones de frases en canarios, lo cual abre todo un conjunto de preguntas en sí mismo para abordar en experimentos a futuro. Por ejemplo, podría ser de sumo interés estudiar sistemáticamente la respuesta en un mismo animal ante variaciones del canto propio. De esta manera, se podrían evaluar diferencias en la codificación de distintas transiciones a nivel del LFP con respecto a la secuencia de frases del canto presentado. Por otro lado, interpretando la respuesta obtenida como evidencia indirecta de la actividad en el núcleo durante la producción del canto, estas señales podrían estar formando parte del comienzo de distintos gestos motores, como propone para la actividad poblacional el modelo circular discutido en Capítulo 1. Una opción adicional y no excluyente con estas hipótesis es que la presencia de actividad sincrónica en la cercanía de transiciones sea una señal relacionada con la coordinación entre hemisferios cerebrales (Ashmore et al., 2008; Schmidt, 2003). Para esto, sería de sumo interés realizar mediciones del LFP de manera bilateral en simultáneo.

Uno de los resultados de mayor relevancia fue la descripción de las oscilaciones encontradas en los distintos sitios de los núcleos HVC de múltiples animales: bandas de frecuencias de la actividad en respuesta a distintas frases del canto. Entre la escasa evidencia previa disponible del LFP en aves, un estudio previo mostró la presencia de una oscilación de la actividad a 30 Hz (Markowitz et al., 2015) y sin embargo, no se estableció ninguna correlación con la estructura interna del comportamiento. Desde entonces, se ha mostrado que el canto en esa especie también presenta una estructura en el mismo rango de frecuencias (Norton & Scharff, 2016), por lo cual es probable que estos dos fenómenos estén intrínsecamente relacionados. Resulta notable que la descripción y la relevancia de las oscilaciones en el LFP del núcleo HVC se hiciera de manifiesto sólo con el cambio de especie planteado en este capítulo, dando soporte a la perspectiva neuroetológica. **Debido a la estructura del canto de los canarios, las oscilaciones pueden interpretarse naturalmente en función de la tasa silábica de las distintas frases.** Las oscilaciones de la actividad a nivel del LFP no ocurrieron para todas las frases del canto. Sin embargo en aquellas respuestas que sí presentaron este comportamiento, las oscilaciones ocurrieron de

manera asombrosamente similar para **distintos sitios de registro de un ave, y hasta para sitios de medición en los núcleos HVC de ambos hemisferios.**

A nivel del procesamiento auditivo, en HVC existen neuronas sensibles a secuencias (Margoliash, 1983; Margoliash & Fortune, 1992). Este fenómeno puede estar siendo modulado por el comportamiento rítmico en HVC, a partir de una combinación precisa de entrada auditiva con el estado interno de la red en HVC. Esta pregunta queda abierta, dado que este fenómeno puede estar modulando las respuestas auditivas y que sea parte del motivo por el cual no se observó respuesta marcada durante todas las frases del canto. Para sílabas del tipo P0 y P1, sin embargo, se registró respuesta en un gran número de ejemplos, y en ellos se vio que para distintos protocolos (correspondientes a distintos sitios en los núcleos HVC), las oscilaciones presentan una fase común: **los mínimos de la señal presentan una distancia característica al inicio silábico, presentando evidencias adicionales de la codificación de instancias significativas del canto.** En particular, las sílabas P0 proveen un marco de especial interés, dado que para estas sílabas se maximiza la diferencia en las predicciones de la hipótesis del reloj y del modelo circular.

En los datos de 3 animales distintos, provenientes de ambos hemisferios cerebrales y distintos sitios dentro del núcleo HVC, la actividad medida a nivel del LFP **no presenta una distribución uniforme.** Este resultado es de suma relevancia. Tomados como una medición indirecta de la actividad durante la producción vocal, estos datos proveen evidencia experimental de la codificación de instancias motoras en el núcleo HVC, refutando así la “hipótesis del reloj”, según la cual la actividad debería estar uniformemente distribuida. No sólo esto, sino que las instancias encontradas son compatibles con las predicciones realizadas por el modelo circular para la actividad de HVC (ver Subsección 1.7.A). Esto es un resultado directo del cambio de estrategia hacia una medida de actividad en una escala mayor que la dada por la actividad de neuronas individuales. Debido a la estructura del canto del canario, la respuesta medida a nivel de frases conforma una oscilación temporal de la actividad. Esta es la razón más probable por la cual este comportamiento sincronizado con el estímulo no fue descrito en estudios del LFP previos en los diamantes mandarines (Markowitz et al., 2015). En esa especie, cada motivo de canto está conformado por la producción de una única sílaba, y el motivo está conformado por una secuencia de sílabas, y no por frases de canto en las cuales se repiten las sílabas de forma rítmica como es el caso en el canto de los canarios.

A pesar del éxito en la descripción de una respuesta en términos del LFP, debido a la escasa información previa disponible sobre este observable (y más aún en canarios), es necesario profundizar la descripción en búsqueda de establecer una correspondencia entre esta medida y la actividad de las neuronas del núcleo. Este, sin embargo, fue uno de los objetivos desde el principio: obtener una medida de la actividad a gran escala sobre la cual interpretar adicionalmente la actividad de las neuronas. **La pregunta que motiva y profundiza este análisis durante todo el Capítulo 5 es, en particular, si los mínimos de actividad encontrados en el LFP pueden**

relacionarse con la actividad sincronizada de múltiples neuronas del núcleo HVC.

Relación del LFP con la actividad de neuronas en HVC

5.1. Motivaciones

Debido a que el potencial de campo local (LFP) ha sido escasamente explorado en el modelo de canto de aves, el capítulo anterior se centró en describir la actividad dada por este potencial en los registros descritos en *Experimentos de electrofisiología* (Subsección 4.2.C). El LFP, tentativamente, representa la actividad de un gran número de neuronas sincronizadas en un volumen. Esta actividad, filtrada por el medio extracelular, es la responsable de la emergencia de la traza de evolución temporal lenta respecto de los potenciales de acción (Buzsáki et al., 2012). Si bien el LFP es usualmente estudiado en la actividad cortical en mamíferos, en aves aún es necesario describir los posibles orígenes del LFP en relación a la actividad de las neuronas en el núcleo, dado que el LFP también podría estar relacionado con la actividad en otras regiones del cerebro. En caso de existir una relación con las neuronas del núcleo HVC, esto posicionaría al LFP como una medida relevante de la actividad neuronal durante la producción y percepción del canto.

En este capítulo, por lo tanto, el eje central es estudiar la relación entre la actividad medida a nivel del LFP y la comparación con resultados obtenidos del análisis de la actividad de las neuronas presentes en los registros. Por este motivo, este capítulo seguirá con el análisis de los datos provenientes de los experimentos descritos en Capítulo 4. Una primera parte de la sección de resultados se centra en estudiar la correlación espacial de la actividad observada en los canales de la sonda para un protocolo Figura 4.10, y que motivó el uso del canal de máxima amplitud RMS en los análisis mostrados durante Capítulo 4. La segunda parte tratará sobre el estudio de la correspondencia entre la actividad neuronal y el LFP, para terminar con los resultados obtenidos

hasta el momento respecto de la actividad de neuronas únicas en la respuesta al canto propio. De esta manera, se evaluará con la evidencia actual la plausibilidad de las predicciones realizadas por el modelo circular, y se discutirán posibilidades a futuro.

5.2. Métodos

5.2.A. Actividad de múltiples neuronas

Longitudinalmente, los canales de las sondas utilizadas cubren un total de $775 \mu m$ en profundidad, como se describió en *Registros electrofisiológicos* (Subsección 4.2.C), con 32 canales separados $25 \mu m$ entre sí para el caso de la sonda A1x32 y $50 \mu m$ para el caso de la sonda A1x32-Poly2 (ver *Sondas de registro* (Sección 7.2)). En comparación, los cuerpos neuronales en HVC presentan diámetros del orden de los $10 \mu m$ - $20 \mu m$ (Goldman & Nottebohm, 1983). Dada la extensión cubierta por las sondas y las impedancias de los sitios de medición ($1 M\Omega$ - $2 M\Omega$), en estos registros extracelulares se capturan potenciales de acción de múltiples neuronas dentro de HVC.

Como se mostró en *Procesamiento y análisis de las señales* (Sección 4.2.C), de los registros obtenidos se pueden obtener los potenciales de campo estudiados en Capítulo 4 a partir de un filtro pasa-bajos. En cambio, a partir de un filtro pasa-altos se puede recuperar la traza formada por los disparos de potenciales de acción de las neuronas registradas (filtro de fase nula tipo Butterworth de 4to orden, frecuencia de corte: 300 Hz). El estudio de la existencia de una correlación entre ambas señales (las oscilaciones lentas marcadas por el LFP y los disparos rápidos de las neuronas) se realizó en dos etapas. La primer etapa consistió en estudiar si la actividad en conjunto de múltiples neuronas presenta algún tipo de correlación con las instancias observadas en el LFP. Específicamente, se estudió la relación entre las señales del LFP promediada en ensayos LFP_{avg} y una medida también promediada en ensayos para la actividad neuronal, a partir del perfil de actividad de múltiples unidades o MUA (del inglés, *multi-unit activity*).

Para el cómputo del perfil MUA, se realizó el filtrado pasa-altos a las trazas registradas y se alineó la actividad utilizando los tiempos de comienzo de los estímulos, como se mostró en Sección 4.2.C. Para la detección de los eventos neuronales, se impuso un umbral a la señal filtrada de cada canal que permitiera separar las espigas (potenciales de acción registrados de manera extracelular) del ruido eléctrico de fondo. De esta manera, para cada presentación de estímulo (ensayo) se obtiene una lista de instancias de tiempos en los que ocurrió el disparo de un potencial de acción de alguna de las neuronas en el registro. **El perfil MUA es un histograma de ventanas deslizantes que representa la actividad promedio de los 20 ensayos (frecuencia de muestreo $f_s = 1000 \text{ Hz}$, ancho de ventana $w_s = 15 \text{ ms}$.** Para eliminar fluctuaciones pequeñas y obtener un perfil suavizado, se realizó un promediado cada 5 muestras al perfil obtenido. Un ejemplo de este proceso se muestra en Figura 5.1 para un segmento de señal de un canal en uno

de los protocolos medidos. Este análisis es comparable a los PSTH utilizados en Capítulo 2 y Capítulo 3 para evaluar la respuesta de unidades únicas, sólo que al realizar un histograma de ventanas deslizantes se obtiene mayor resolución temporal en el perfil de actividad, algo que fue de suma utilidad en la comparación con una traza temporal como el LFP.

La detección de espigas se realizó con un umbral dado por $thr = -5\sigma_n$, con σ_n un estimador robusto de la desviación estándar del ruido eléctrico de fondo en la señal (Donoho & Johnstone, 1994; Quiroga et al., 2004). Este estimador se obtiene a partir de una señal x como:

$$\sigma_n = median \frac{|x|}{0,6745} \quad (5.1)$$

El umbral se tomó como valor negativo debido a que las espigas registradas presentan mayor amplitud en esa dirección. En Figura 5.1 se muestra la detección de eventos para uno de los LFP_{avg} analizados, donde puede observarse que este valor de umbral (en valor absoluto) permite detectar las espigas correspondientes a potenciales de acción para los distintos canales y separarlas del ruido eléctrico de fondo. Un estudio sistemático de la cantidad de eventos detectados para distintos valores de umbral muestra que para valores menores aumenta drásticamente la detección de falsos positivos (detección de picos correspondientes a ruido), mientras que el aumento del umbral constituye una pérdida progresiva de la cantidad de espigas detectadas. Sin embargo, notar que para el ejemplo mostrado, la zona de menor pendiente corresponde a la zona de $30 \mu V - 125 \mu V$ (en valor absoluto). El umbral utilizado ($thr = -5\sigma_n = -41 \mu V$) está contenido en esa región.

Debido a que el nivel de ruido no varía sustancialmente entre los canales pero el nivel de actividad neuronal sí lo hace (ver, por ejemplo, Figura 4.5), los valores de umbral para los 32 canales no varían sustancialmente a lo largo de la sonda. A modo de ejemplo, para el protocolo del cual se muestra un canal en la figura Figura 5.1, se obtuvo un umbral promedio para los 32 canales de $thr = -35,5 \pm 5,5 \mu V$. De esta manera, los umbrales determinados a partir de σ_n permiten separar los eventos neuronales en cada canal respecto del ruido de fondo, obteniendo variaciones dramáticas en el número de eventos detectados para cada canal. Para el mismo ejemplo anterior, la cantidad de espigas detectadas varió 4 órdenes de magnitud entre el canal con menor eventos detectados y el canal de mayor eventos registrados (orden 10^1 espigas vs. 10^5 espigas, respectivamente, para un registro de 25 minutos). Como en el ejemplo de Figura 4.5, esto se debe a que hay canales en cada registro que no presentan señal apreciable. **Los perfiles de actividad conjunta de múltiples neuronas (MUA), computados a partir de la detección de todos los eventos neuronales, fueron la medida de actividad utilizada para el estudio de la relación entre la actividad global de múltiples neuronas y el LFP.**

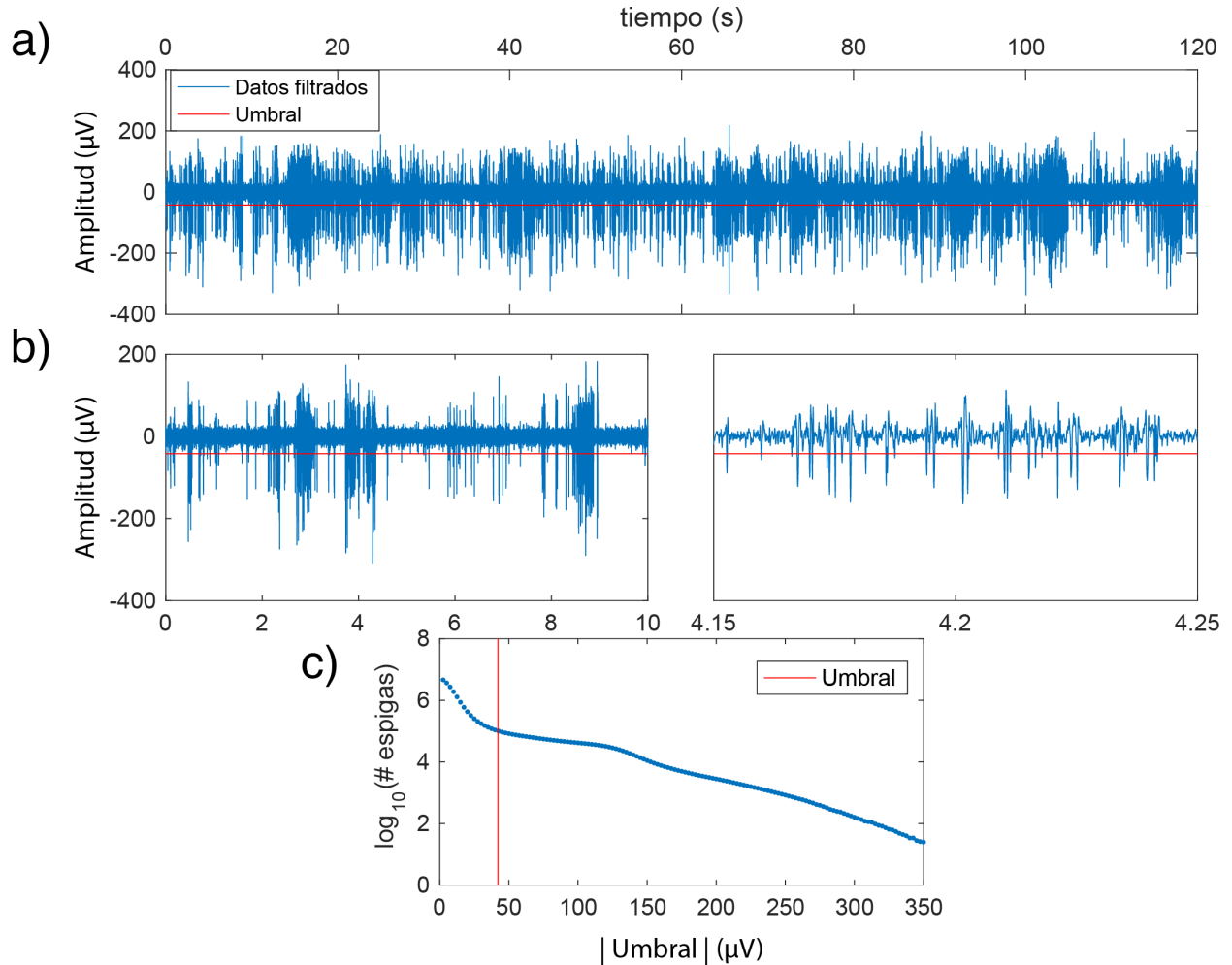


Figura 5.1: Detección de eventos neuronales en las señales registradas. (a) Trazo de actividad de neuronas para un segmento de 120 segundos en un canal de un registro, mostrando un gran número de espigas correspondientes a los potenciales de acción de múltiples neuronas registrados con electrodos extracelulares. Los datos han sido filtrados con un filtro pasa-altos de fase nula tipo Butterworth (4to orden, frecuencia de corte: 300 Hz). La línea sólida horizontal muestra el nivel de umbral utilizado para la detección de eventos neuronales $thr = -5\sigma_n$, con σ_n un estimador de la desviación estándar del ruido de fondo (ver texto). Para el caso mostrado, $thr = -41\mu V$. (b): ampliaciones de la señal mostrada en (a), donde se ve en mayor detalle que el nivel de umbral elegido separa la actividad neuronal del ruido de fondo pero detecta correctamente espigas de un gran rango de amplitudes. (c) Estudio de la cantidad de espigas detectadas en el canal en función del umbral (valores de umbral en valor absoluto). El eje vertical se presenta en escala logarítmica. El umbral elegido permite separar las espigas del ruido de fondo.

5.2.B. Extensión de la actividad en la sonda

Teniendo los perfiles de actividad conjunta de múltiples neuronas, esto permitió estudiar la relación entre las variaciones espaciales a lo largo de la sonda de la señal para el LFP (Subsección 4.3.B) con las variaciones espaciales de la actividad neuronal mencionadas en Subsección 5.2.A. Como punto de partida en la cuantificación de la relación entre las señales de LFP_{avg} y MUA, se analizaron los perfiles de amplitud RMS a lo largo de la sonda para ambas señales. Para determinar la presencia de una relación a espacial, se estudió la correlación de los perfiles de amplitud entre MUA y LFP. **Esta cuantificación permitió estudiar la existencia de una relación en las variaciones de amplitud en una escala global entre las distintas señales.** Por otro lado, también se estudió la correlación espacial en la sonda para cada tipo de señal por separado, **buscando estimar la distancia característica de correlación en la actividad.** Para esto, se estudió una función de correlación pesada por el perfil de amplitud. Esta medida, $Corr(x_i, x_j)$ se obtuvo a partir de calcular el coeficiente de correlación de Pearson entre cada par de canales (i, j) , con $i, j = 1, 32$ y pesar esta matriz por el perfil de amplitudes RMS para definir las zonas de mayor nivel de actividad. Esta medida de correlación pesada se definió como:

$$Corr(x_i, x_j) = r(x_i, x_j) \cdot \frac{RMS(x_i) \cdot RMS(x_j)}{A^2} \quad (5.2)$$

, con $x = MUA$ ó $x = LFP$, $r(x_i, x_j)$ el coeficiente de correlación de Pearson entre la señal del canal i -ésimo y el canal j -ésimo, $RMS(x_i)$ el valor RMS de la señal en el canal i -ésimo, y A el máximo del perfil de amplitudes RMS entre los 32 canales. **En este análisis se utilizaron los datos provenientes de protocolos en los que se haya utilizado sondas del tipo A1x32, debido a que representan la mayoría de los datos medidos (14/16 protocolos, ver Apéndices (Capítulo 7)).** A partir de la definición de una zona de interés en cada protocolo con $Corr(x_i, x_j) > 0,6$, se estimó la distancia de correlación de la actividad subyacente.

5.2.C. Relación entre las señales de actividad neuronal

Adicionalmente a la correlación de las variaciones de amplitud de las señales en la sonda, otra medida de interés es la correlación en la actividad. Esto es, el estudio de la correlación en la evolución temporal de los LFP_{avg} con sus respectivos perfiles MUA en la respuesta al canto. Esta relación también se estudió a diferentes escalas. En primer lugar, se computaron los valores de máxima correlación cruzada entre las señales, usando esta cuantificación como una medida global de similitud entre las señales. Este análisis, a su vez, se vale del análisis presentado en Subsección 5.2.B, dado que se estudió la correlación cruzada entre la evolución temporal del LFP_{avg} del canal de máxima amplitud RMS con el perfil MUA del canal que maximizara la correlación cruzada de las variaciones de amplitud a lo largo de la sonda.

La segunda etapa consistió en la detección de instancias prominentes de actividad, semejante al análisis de los mínimos prominentes en el LFP que determinaron la correspondencia con algunas de las transiciones de frases en el canto en Capítulo 4. En este caso, se mantuvo el conjunto de mínimos prominentes de la señal ya descritos en *El LFP indica transiciones entre frases de canto* (Subsección 4.3.C) para el LFP, sumando al conjunto los mínimos prominentes correspondientes a sílabas del tipo P0. Para la detección de picos prominentes de actividad en los perfiles MUA, se realizó un procedimiento similar, realizando un suavizado de la misma manera que se hizo para el LFP (filtro pasa-bajos de fase nula tipo Butterworth de 4to orden, frecuencia de corte en 10 Hz). Aunque este suavizado enmascara algunas de las estructuras finas dentro del perfil MUA, permite detectar instancias robustas de activación, que fue el objetivo en esta etapa de análisis. **Un pico fue considerado prominente si superó el 35 % del valor de prominencia (amplitud relativa) máxima en la señal y, para eliminar picos de baja amplitud en nivel absoluto, se impuso adicionalmente que el pico tuviera un 40 % de la amplitud absoluta máxima.** Estas dos condiciones son complementarias, en el sentido de que un pico puede presentar una amplitud absoluta significativa, pero ser un pico de baja amplitud relativa (máximo secundario).

Para comparar con los picos detectados en el LFP, se computó la distancia Δt a los picos detectados en el LFP_{avg} para cada protocolo. Se consideró que dos eventos eran coincidentes en la señal MUA y LFP si se encontraban a una distancia menor a 50 ms entre sí. Para estudiar la respuesta en la escala de frases de canto, como se hizo para el LFP en Capítulo 4, se detectaron picos sobre la señal MUA para las frases seleccionadas por el método de la autocorrelación en el LFP. Debido a que los picos en oscilaciones pueden estar bien definidos pero no ser necesariamente de gran amplitud, para esta detección de picos en el perfil MUA se utilizó la señal original (sin suavizado adicional), y el umbral fue fijado de modo que los picos considerados tuvieran una amplitud relativa que superara el 25 % de la prominencia máxima. Por último, también se computaron para el caso de sílabas del tipo P0 y P1 las actividades promediadas en todos los eventos, tomando la respuesta a cada sílaba como un evento individual y alineando al inicio silábico. Este promediado se realizó sobre la señal correspondiente al LFP y también sobre las señales del perfil MUA.

En conjunto, estos análisis permitieron estudiar a distintos niveles la correspondencia entre la respuesta medida en los LFP y los perfiles MUA. **En particular, se quiere poner a prueba la hipótesis que la respuesta medida a nivel del LFP es un emergente de la actividad de las neuronas del núcleo HVC en la zona de registro.**

5.2.D. Actividad de neuronas individuales en núcleo HVC

El mayor nivel de detalle de la actividad en los registros extracelulares está dado por la actividad de las neuronas individuales que componen la actividad multiunidad. Este análisis per-

mitiría, adicionalmente, evaluar la relación de la actividad de neuronas únicas con el emergente en la respuesta medido a nivel del perfil MUA y el LFP. En caso de existir una correspondencia en las 3 escalas estudiadas (neuronas individuales, perfil MUA y LFP), esto daría sustento a la medida del LFP como el emergente de la sincronización de la actividad de múltiples neuronas en una región del núcleo neuronal HVC. De esta manera, sería posible utilizar mediciones del LFP en futuros estudios para, por ejemplo, facilitar la medición en simultáneo de la actividad neuronal a gran escala en distintos núcleos del sistema neuronal del canto.

Como en Capítulo 2 y Capítulo 3, la estrategia para analizar la señal a este nivel de detalle consiste en la utilización de algoritmos de clasificación de espigas (*spike sorting*). A diferencia de esos registros, sin embargo, las mediciones realizadas con arreglos multielectrodo registran múltiples canales de actividad neuronal. Al mismo tiempo, las impedancias de los electrodos son levemente más bajas que en los casos anteriores $1 - 2 \text{ M}\Omega$ contra $> 3 \text{ M}\Omega$ utilizados previamente. Esto hace que en los registros con arreglos multielectrodo se esté registrando un mayor número de neuronas por sobre los registros de un solo canal (en electrodos extracelulares, mientras mayor es la impedancia, mayor es el poder de aislación de la actividad de neuronas individuales cercanas al electrodo, ver *Registros extracelulares de potenciales de acción* (Sección 1.5.A)). Los métodos de clasificación de espigas para registros multicanal están en continuo desarrollo, y la mayoría de los algoritmos para una alta cantidad de canales > 4 fueron publicados durante el desarrollo del trabajo presentado en esta tesis doctoral (Chung et al., 2017; Pachitariu et al., 2016; Rossant et al., 2016). La mayoría de estos algoritmos son desarrollados y puestos a prueba contra una base de datos provenientes de corteza en mamíferos; típicamente registros en ratas. Adaptar el funcionamiento de los algoritmos a registros con características distintas presenta dificultades asociadas, debido a que no existe una única estrategia para clasificar espigas y a que los algoritmos están desarrollados con una aplicación específica en mente. Más aún, el problema del disparo sincronizado de múltiples unidades puede dar lugar a la superposición de espigas en la señal, un problema aún no resuelto (Rey et al., 2015b).

A pesar de estas limitaciones, el análisis realizado con uno de estos paquetes de software (klustakwik/phy, (Rossant et al., 2016)) proporciona evidencia directa de las instancias de disparo de al menos algún subconjunto de las neuronas involucradas en los perfiles MUA. El algoritmo implementado por este programa realiza una clasificación semiautomática en los grupos de espigas presentes en cada registro. Para esto, el primer paso es la detección de las espigas en cada canal registrado a partir de un umbral comparable al empleado en Subsección 5.2.A. Añadiendo la información espacial (grafo de canales vecinos en la sonda), el algoritmo extrae una ventana de 1.5 ms alrededor de cada evento y realiza una descomposición en componentes principales (PCA, del inglés *principal component analysis*) de cada espiga detectada. Con esto, computa un vector relacionado a la ubicación espacio-temporal de cada espiga. Finalmente, el algoritmo de clasificación consiste en la minimización de un ajuste por un modelo de mezcla gaussiana a las

distribuciones de las características de las espigas, para separar los grupos presentes en la señal (para más detalle sobre el algoritmo, ver (Kadir et al., 2014; Pedreira et al., 2012)).

El proceso de clasificación automática requiere posteriormente una etapa de supervisión por parte de un usuario humano. En este proceso, se evalúa el desempeño del algoritmo para clasificar las espigas en los datos y se asiste manualmente a la clasificación final. Este proceso es similar a la supervisión realizada para la clasificación de espigas en un canal (Capítulo 2 y Capítulo 3), salvo la diferencia en la dimensionalidad del problema. Para evaluar la separación de los grupos detectados por el algoritmo se tienen en cuenta las proyecciones en el espacio de las PCA, las formas de las espigas, su ubicación en la sonda y cuantificaciones estadísticas sobre el tren de espigas. Estos análisis se utilizan en conjunto como medida de calidad de separación de cada grupo (en inglés, *cluster*). Cada grupo bien aislado puede considerarse, en principio, como la actividad de una neurona individual. El análisis estadístico sobre el tren de espigas consiste en este caso del autocorrelograma (Dayan & Abbott, 2001). Éste es un histograma en el cual en cada columna temporal t_i corresponde a la cantidad de pares de espigas que presentan una distancia en el rango $[t_i - \Delta; t_i + \Delta]$, con Δ el ancho de la columna ($\Delta = 0,5 \text{ ms}$, de modo que el ancho total de la columna centrada en t_i sea de 1 ms). La forma que presenta este histograma está relacionado con las características temporales de disparo del tren de espigas asociado a un grupo. De esta manera, si la neurona analizada presenta características de disparo tipo fásico (baja tasa de actividad espontánea, alta tasa de disparo en eventos codificados), el autocorrelograma presenta un pico para algún t_i (típicamente $t_i < 10 \text{ ms}$), pero decae a tiempos largos (decenas de milisegundos). En cambio, si el tren de espigas analizado corresponde a la actividad de una neurona que presenta disparo tónico (alta tasa de disparo espontánea), entonces la probabilidad de encontrar pares de espigas a un Δt dado no decae a tiempos largos, sino que tiende a un valor sostenido. En estos casos, el autocorrelograma presenta un perfil creciente hacia un valor asintótico (relacionado con la tasa de disparo basal de la neurona).

El autocorrelograma, a su vez, representa una medida de calidad de separación del grupo de espigas analizado, debido a que un grupo correctamente separado presenta cuentas nulas en la cercanía de $t_i = 0 \text{ ms}$. Este fenómeno se debe al período refractario neuronal. La violación del periodo refractario (tomado como la presencia de eventos alrededor del origen) indica que el grupo analizado no está correctamente aislado, y por lo tanto no representa la actividad de una única neurona (para una descripción detallada de los autocorrelogramas, correlogramas cruzados y su evaluación en la calidad de separación de un grupo neuronal, ver (Harris et al., 2000)). En Figura 5.2 se muestra un ejemplo de un grupo bien separado (captura de pantalla del programa con el que se realiza la supervisión manual). En (a) se tiene la lista de grupos encontrados y en (d) el autocorrelograma del grupo seleccionado. En (b) y (e) se puede explorar la proyección en los espacios de las componentes principales y la presencia de las espigas del grupo a lo largo de las señales medidas, respectivamente. Finalmente, en (c) se analizan las

formas de las espigas del grupo seleccionado. Los canales de máxima amplitud (en celeste) muestran la forma de las espigas que conforman el grupo seleccionado (notar cómo, incluso para canales vecinos, las espigas varían en forma y amplitud). Una superposición de espigas limpia, separación respecto de otros grupos en las proyecciones de las PCA y un autocorrelograma sin contaminación en el período refractario permiten aseverar la calidad del grupo. En el caso de que un grupo esté bien aislado (como el mostrado en la figura), se considera que la actividad de ese grupo corresponde a la actividad de una única neurona.

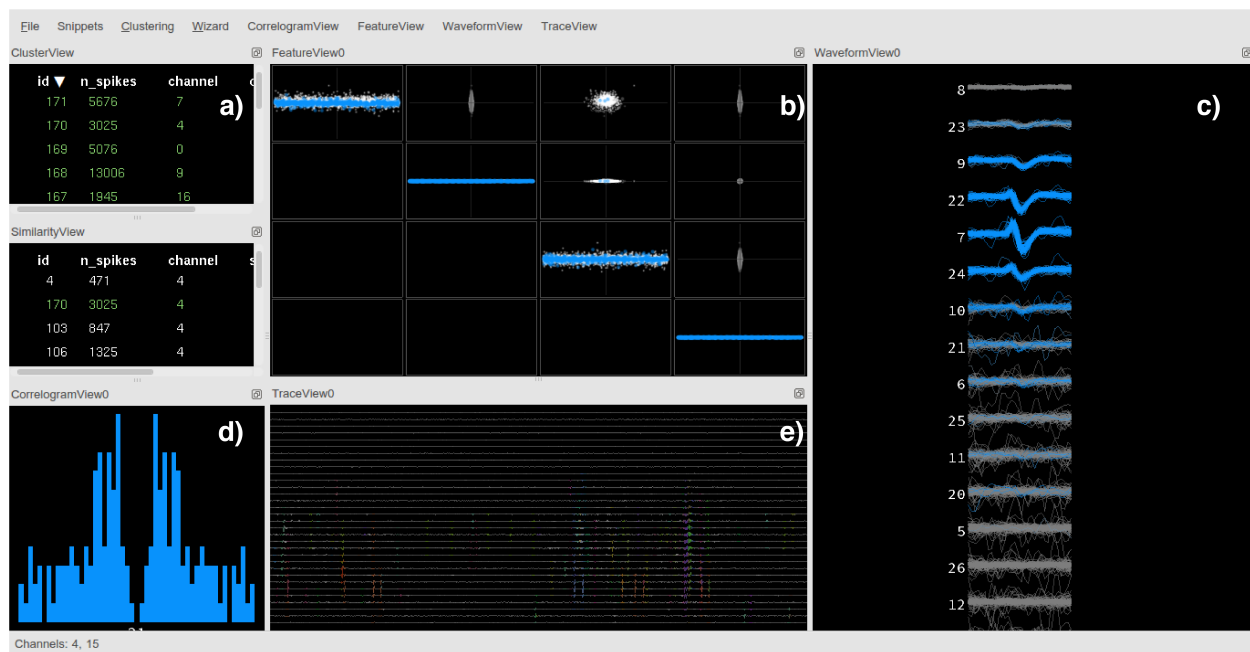


Figura 5.2: Ejemplo de separación de un grupo neuronal en la actividad neuronal. Captura de pantalla del programa que se utiliza para realizar la separación de los grupos de neuronas de cada registro. (a) Listas de grupos detectados por el programa, (b) proyecciones en el espacio PCA de las características de las espigas del grupo seleccionado y (e) trazas temporales de las señales medidas. (c) forma de las espigas del grupo en los distintos canales de la sonda. (d) Autocorrelograma del grupo seleccionado, mostrando que el grupo seleccionado presenta una buena separación (cuentas nulas en la cercanía de $t_i = 0$ ms. Notar que existe un leve nivel de contaminación a para $t_i \approx 0$ ms que no pudo eliminarse. En este caso, el nivel de contaminación es pequeño, por lo cual aún así puede interpretarse la actividad como proveniente de una única neurona (Harris et al., 2000).

En el proceso de supervisión del desempeño del algoritmo, se deben evaluar tanto las características antedichas como la posible unión de múltiples grupos que fueron separados por un sobreajuste en la clasificación automática. Una unión de grupos se consideró plausible cuando las formas de espiga, el autocorrelograma y la presencia en canales de la sonda eran similares entre sí. Para cada uno de los protocolos, el proceso automático llevó entre 15–34 horas de cómputo. Típicamente, para registros de esta magnitud, el número de grupos de espigas a la

salida de la clasificación automática fue del orden de 100–200 grupos y la supervisión humana llevó un mínimo de 2 días de análisis para evaluar la separación de los grupos de mejor calidad en cada protocolo. **Al finalizar la sesión manual, se obtiene una lista de tiempos en los que ocurrió una espiga y a qué grupo pertenecen.** Con esta información, se pueden realizar análisis similares a los efectuados para el perfil MUA, pero esta vez sobre señales provenientes de la actividad de neuronas individuales. Esto es de interés al estudiar qué características del canto a nivel del núcleo HVC son codificadas por las neuronas individuales. Más aún, la separación de neuronas individuales permite estudiar cómo se relaciona esta actividad con respecto a medidas a mayor escala (MUA y LFP). Para esto, en particular **para sílabas del tipo P0, también se computó el promedio de la actividad de las neuronas respecto del inicio de cada sílaba, dado que conforman el marco de mayor contraste entre los roles propuestos para la codificación del canto a nivel de HVC.**

5.3. Resultados

5.3.A. La respuesta conjunta de múltiples neuronas

Como en el caso de las señales analizadas en Capítulo 4, en los perfiles MUA se evidencian instancias marcadas de actividad neuronal en respuesta al canto. En Figura 5.3 se muestra el proceso de cómputo del perfil MUA sobre un segmento de registro, utilizando el procedimiento descrito en *Actividad de múltiples neuronas* (Subsección 5.2.A). En esta figura se muestra la señal de sonido de una sílaba del tipo P0 (a), segmentos de trazas correspondientes a 10 ensayos de un protocolo y dos ampliaciones para ayudar la visualización (datos de un canal, (b)) y el perfil MUA para ese segmento obtenido a partir de la detección de las espigas en todo el protocolo. En (b) puede apreciarse que la traza de actividad medida presenta espigas de distinta amplitud y que la mayor cantidad de instancias de disparo se agrupan en la región 11.1 s - 11.2 s para los segmentos de señal mostrados. Notar, especialmente, el bajo nivel de actividad espontánea tanto a la izquierda como a la derecha de este rango. En las ampliaciones se aprecian en mayor detalle las espigas de menor tamaño, así como el nivel de umbral determinado para este canal. En este caso, el perfil MUA presenta dos picos bien definidos (ver (c)). **El primer pico de actividad se corresponde con disparos precisos y altamente sincronizados a lo largo de las repeticiones.** El segundo pico, sin embargo, se compone de actividad que presenta mayor nivel de variación, pero aún así presenta una actividad concentrada en una instancia temporal (ver las trazas individuales en (b) para la región 11.15 s- 11.20 s). Esto, además, queda representado en los anchos relativos entre ambos picos en el perfil MUA. Notar, tanto en las trazas individuales como en el perfil de actividad cómo la mayor parte de los disparos están concentrados en una región de unos 100 ms respecto del inicio silábico.

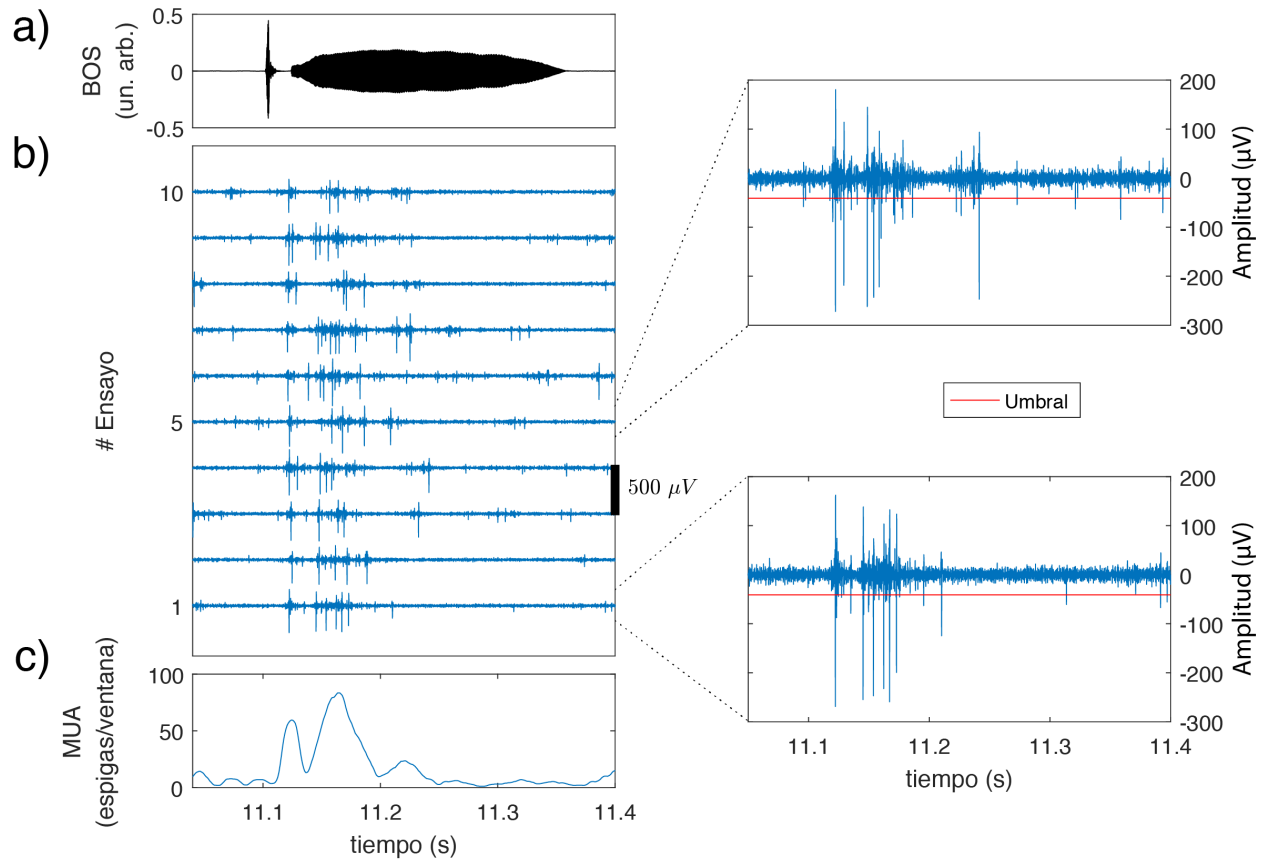


Figura 5.3: Actividad neuronal en los datos y perfil MUA en la respuesta al canto propio (BOS). (a) Señal de canto para una sílaba P0. (b) Segmentos de trazas registradas en respuesta a 10 presentaciones de BOS. Notar que la mayor cantidad de espigas se encuentran en la región 11.1 s - 11.2 s para todos los ensayos. Estas ráfagas de actividad están precedidas y seguidas por zonas de inhibición neuronal (ausencia de espigas). (c) Perfil de actividad conjunta de múltiples unidades (MUA), obtenido a partir de sumar la cantidad de eventos que ocurren entre todos los ensayos de un protocolo en ventanas deslizantes de 15 ms (deslizantes cada 1 ms). A la derecha se muestran ampliaciones para 2 ensayos de los 10 mostrados, donde también se señala el nivel de umbral utilizado para detectar eventos (espigas neuronales). Como el análisis a partir de la detección de eventos que superan un umbral captura la actividad de espigas de distinta amplitud y forma, se está computando la respuesta conjunta de las neuronas registradas en simultáneo.

De esta manera, el análisis de datos introducido en Figura 5.3 fue utilizado en la cuantificación de la actividad conjunta de múltiples neuronas durante un protocolo. **La posibilidad de cuantificar la respuesta de múltiples neuronas en conjunto permite abarcar la pregunta sobre si existe una correlación entre el tipo de respuesta encontrada en los LFP_{avg} en Capítulo 4 y la actividad de las neuronas en HVC.** Las siguientes secciones harán uso del perfil MUA para estudiar esta relación en detalle.

5.3.B. Extensión y correlación espacial

Los registros de actividad en los múltiples sitios de la sonda presentan variaciones espaciales en la actividad registrada a lo largo de los 32 canales, tanto para el LFP como para la actividad neuronal dada por el perfil MUA. Como se presentó en *Extensión de la actividad en la sonda* (Subsección 5.2.B), una primera caracterización de la relación entre las señales de LFP y MUA consistió en estudiar la relación entre las variaciones en las amplitudes de las señales en la sonda. Un ejemplo de estas variaciones para todos los canales de la sonda se muestra en Figura 5.4, donde puede observarse actividad correlacionada espacialmente y localizada en un subconjunto de canales en la sonda para los dos tipos de señales. En esta figura, se muestran los perfiles MUA (a) y los LFP_{avg} (b) para los 32 canales de la sonda. Las señales mostradas corresponden al promedio en 20 ensayos de la respuesta al canto propio. En el ejemplo mostrado (datos de los cuales se mostró un segmento en Figura 5.3), los canales superiores de la sonda no tienen un nivel de actividad apreciable. Para MUA, los canales inferiores tampoco presentan actividad significativa. Sin embargo, para los LFP_{avg} los canales inferiores siguen mostrando una señal apreciable. **Esta observación indica que los LFP, aunque representan una actividad acotada espacialmente, abarcan una mayor extensión en la sonda que la actividad de las neuronas presentes en el registro.** Notar cómo los LFP_{avg} también presentan modulaciones marcadas de amplitud a lo largo de la sonda. El canal del cual se mostraron los datos en Figura 5.3 ha sido remarcado con un recuadro rojo. Adicionalmente, en una comparación cualitativa entre las señales correspondientes a MUA (izquierda) y el LFP (derecha) se observa la presencia de picos en instancias que podrían ser equivalentes. El análisis de esta correspondencia será retomado en Subsección 5.3.C.

Los perfiles de actividad MUA mostrados en Figura 5.4 representan una región con límites bien definidos dentro de la sonda. La cobertura en canales de la señal MUA es de aproximadamente 15 canales, con amplitud despreciable hacia ambos límites. Sin embargo, los LFP_{avg} mostrados en la figura presentan amplitud despreciable sólo hacia uno de los límites de la sonda (el superior). Al estudiar los datos de todos los protocolos analizados, se encuentra que típicamente esto ocurre de la misma manera: el perfil MUA presenta extremos definidos, pero el LFP no decae por completo hacia los extremos de la sonda. Sin embargo, para el 86 % de los casos, las señales de los LFP_{avg} dejan de ser apreciables en amplitud en al menos uno de los dos extremos,

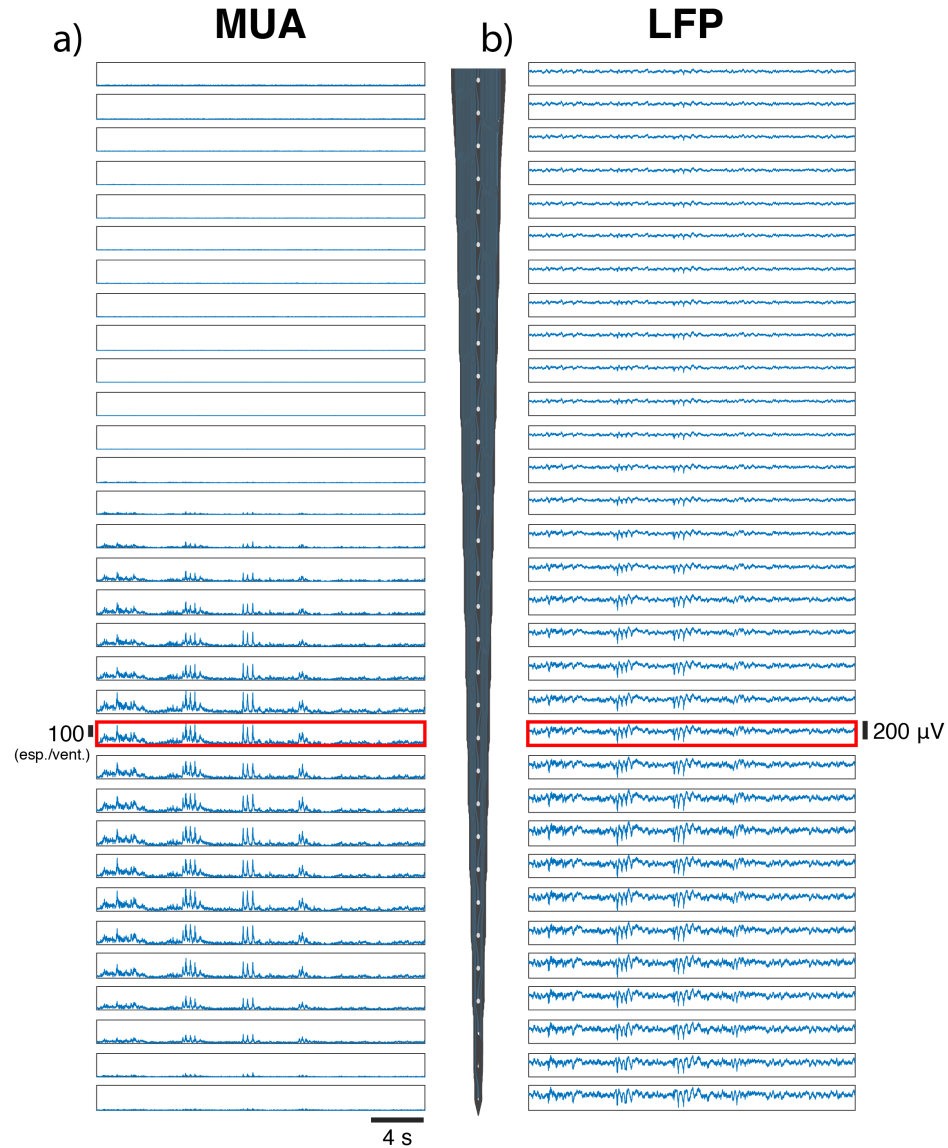


Figura 5.4: Perfiles MUA y señales LFP_{avg} para los 32 canales de la sonda Neuronexus (datos de respuesta a canto propio durante un protocolo). (A) Perfiles MUA para los 32 canales de la sonda de registro. Se observa que el perfil MUA está presente en una región acotada de canales y que la actividad está correlacionada entre canales vecinos (observar la aparición de picos de actividad similares en los distintos canales). (b) Potenciales de campo local (LFP_{avg}) para cada canal de la sonda. Similar a lo observado en (a) y mostrado en Figura 4.10, la actividad está extendida en los canales de la sonda, también mostrando correlación espacial de la actividad. Adicionalmente, se observa que la extensión en canales de los LFP_{avg} es mayor que la de los perfiles MUA. El recuadro de color indica el canal de los registros mostrados en Figura 5.3.

y lo mismo ocurre con los perfiles de actividad MUA (93 %), mostrando que la actividad está acotada a un conjunto de canales en la sonda. En particular, en el 60 % de los casos se tiene que la actividad MUA decae completamente hacia los dos extremos y pueden definirse límites a ambos lados. **En ningún caso se registraron perfiles de actividad MUA que estuvieran extendidos a lo largo de los 32 canales.**

A partir de la observación de que existe actividad correlacionada para cada señal a lo largo de múltiples canales en la sonda, para cada protocolo se computó la matriz de correlación pesada $Corr(x_i, x_j)$ planteada en Subsección 5.2.B. En Figura 5.5 se muestra un ejemplo para uno de los 16 protocolos analizados. En (a) se muestran las trazas de amplitud RMS para los LFP_{avg} en los distintos canales (rojo) y para los perfiles de actividad MUA (azul). Con (*) se marca el canal de máxima amplitud para el perfil MUA. Para este canal se muestran en (b) las señales correspondientes al LFP_{avg} y al perfil MUA. De las señales mostradas en (b) puede apreciarse la presencia de picos de actividad en el perfil multiunidad que también ocurren en el LFP_{avg} . En (c) y (d) se muestran las matrices $Corr(LFP_i, LFP_j)$ y $(Corr(MUA_i, MUA_j))$, respectivamente. Para cada par de valores (i, j) , se representó el valor de $Corr(x_i, x_j)$ con una escala de colores (mostrada en la parte inferior de la figura). El efecto discutido de que la actividad MUA tiene límites mejores definidos que los LFP_{avg} queda representado en estas figuras por una rápida caída de la actividad para MUA en las zonas cercanas a los extremos. Para definir un parámetro relacionado con la extensión espacial, se utilizaron para cada señal por separado el subconjunto de protocolos que tuviera límites bien definidos, como el caso mostrado en Figura 5.5. **Para estos casos, se definió el área de actividad correlacionada a partir de la cantidad de canales que delimitaron la zona de $Corr(x_i, x_j) > 0,6$.** De esta manera, para el ejemplo mostrado en la figura se obtiene una extensión de 12 canales $300 \mu m$ para MUA y de 17 canales ($425 \mu m$) para LFP_{avg} .

De los 14 protocolos originalmente analizados (sonda Neuronexus A1x32), 8 presentaron una actividad MUA con límites definidos a ambos extremos de la sonda, mientras que sólo 5 de esos 8 presentaron límites bien definidos para los LFP_{avg} (es decir, regiones con valores de $Corr(x_i, x_j) > 0,6$ y límites de la sonda con valores $Corr(x_i, x_j) < 0,6$). En Figura 5.6 se muestra un ejemplo que no presenta límites bien definidos en una de las dos cantidades. Observar que $Corr_{LFP_i, LFP_j}$ presenta valores $> 0,6$ en el límite inferior de la sonda, por lo cual no existe una región definida de modo que por fuera los valores sean $< 0,6$. En este caso, no puede definirse una longitud de correlación. Sin embargo, notar que incluso cuando ocurre esto para el LFP_{avg} , se tiene que para $Corr_{MUA_i, MUA_j}$ sí puede definirse una longitud de correlación, debido a que la región con valores $> 0,6$ está bien delimitada dentro de la sonda. Los resultados hallados para la longitud de correlación medida a partir de los LFP_{avg} y el perfil MUA se muestran en Tabla 5.1.

En promedio, la actividad medida a partir de los perfiles MUA presenta una correlación espacial de $285 \pm 50 \mu m$, mientras que para los LFP_{avg} , la longitud de correlación presentó un valor medio de $385 \pm 125 \mu m$. Con los datos obtenidos a partir de esta cantidad de protocolos, los

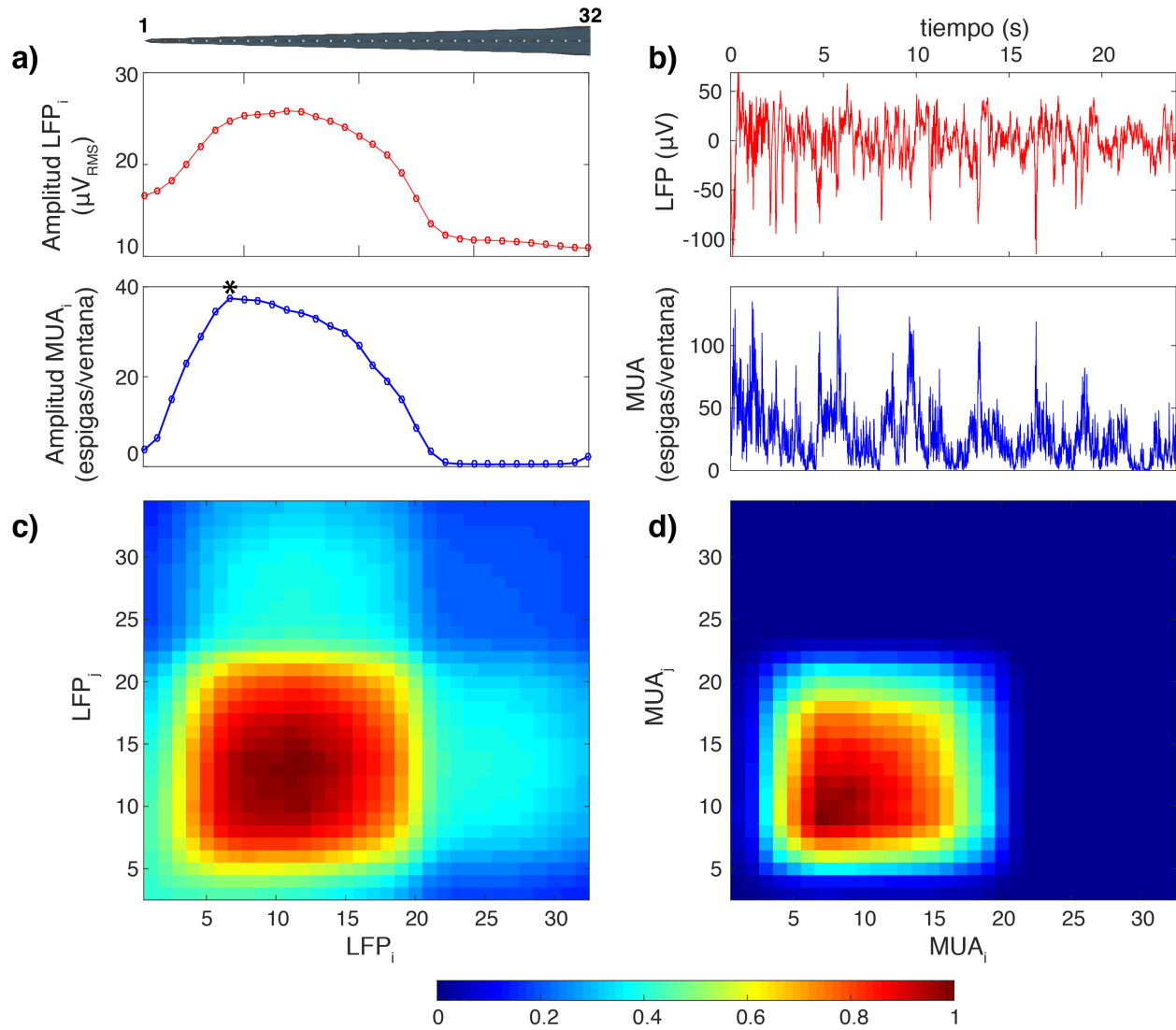


Figura 5.5: Perfiles de amplitud RMS y matrices de correlación pesada para un protocolo con extremos bien definidos. (a) Perfiles de amplitud RMS para los LFP_{avg} (rojo) y perfiles MUA (azul) para los 32 canales de la sonda Neuronexus durante un protocolo de un ave (Csb253-AzuAma). Con (*) se marca el canal de perfil de actividad MUA que presenta amplitud máxima. (b) Potencial de campo local y perfil de actividad MUA para el canal seleccionado en (a). (c) y (d): matrices de correlación pesada por el perfil de amplitudes para los LFP_{avg} y perfiles MUA, respectivamente (para más detalle, ver texto). Barra inferior: escala de colores para los valores de correlación representados en la figura. En este caso, tanto la matriz de correlaciones para los LFP_{avg} y los perfiles MUA presentan límites bien definidos, con valores $Corr(x_i, x_j) < 0,6$ hacia los extremos. Definiendo la longitud de correlación como la cantidad de canales que delimitan la zona de $Corr(x_i, x_j) > 0,6$ se obtiene para los LFP_{avg} una longitud de correlación de 425 μm , y de 300 μm para los perfiles MUA.

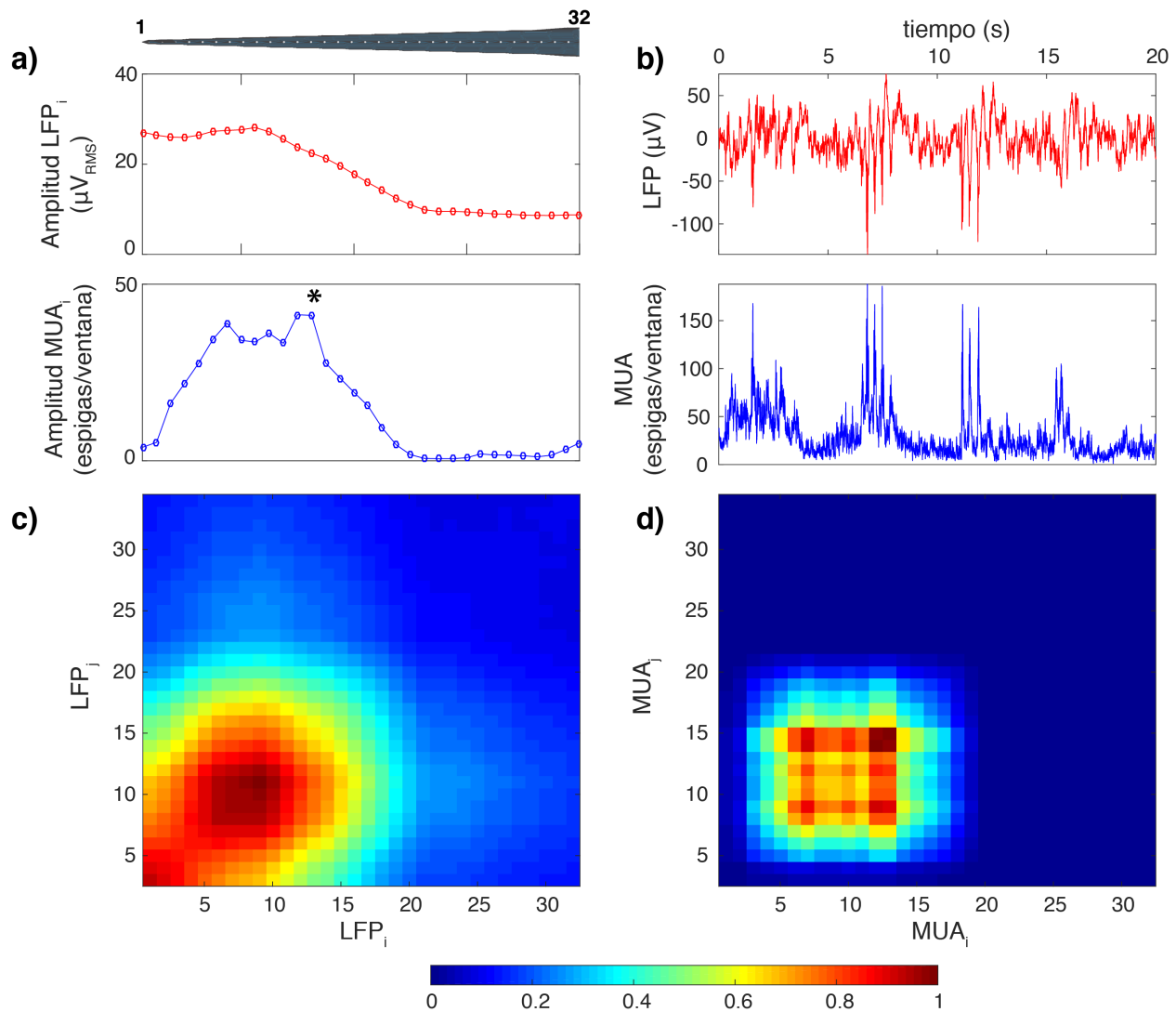


Figura 5.6: Perfiles de amplitud RMS y matrices de correlación para un protocolo con extremos no definidos. Figura equivalente a Figura 5.5, pero mostrando las matrices de correlación para un protocolo en el que no se tienen completamente definidos los extremos de la actividad. El perfil de amplitudes de los LFP_{avg} disminuye en amplitud sólo hacia un extremo de la sonda. Los perfiles MUA, sin embargo, siguen mostrando límites bien definidos hacia ambos extremos, así como una longitud de correlación similar al caso mostrado en Figura 5.5, de 250 μm .

Longitud de correlación	LFP_{avg}	MUA
Mínimo (μm)	175	225
Máximo (μm)	500	350
Promedio $\pm$ SD (μm)	385 ± 125	285 ± 50
	N = 5	N = 8

Tabla 5.1: Valores de distancia de correlación (en μm) a partir del análisis detallado en esta sección. Notar que, como se observó en los ejemplos mostrados, el LFP_{avg} presenta una mayor extensión espacial que la actividad dada por el perfil MUA. La diferencia en cantidad de protocolos (N) se debe a que existe mayor cantidad de casos donde los perfiles MUA presentaron una zona de valores de $Corr_{x_i, x_j} > 0,6$ delimitada por valores $< 0,6$ para poder realizar la cuantificación.

intervalos obtenidos para la longitud de correlación de los perfiles MUA y de los LFP se solapan entre sí, aunque la diferencia de valores medios es del orden de los $100 \mu m$, indicando un efecto en el cual el LFP, aunque acotado espacialmente, es una señal más extendida espacialmente que el perfil de actividad MUA. **El hecho de que la actividad medida en el LFP esté acotada en el espacio y co-localizada con la actividad de los perfiles MUA es un indicio de que los LFP están asociados a la actividad neuronal del núcleo HVC.**

Como comparación de la escala de correlación hallada, en un estudio previo se reportó que para el caso de diamantes mandarines, la banda de frecuencias predominante del LFP en HVC presenta correlaciones en una escala de $108 \mu m - 125 \mu m$ (Markowitz et al., 2015). En el mismo estudio también se reportó que las señales de calcio de neuronas marcadas en HVC presentan una escala de correlación del mismo orden $119 \mu m - 183 \mu m$. Otros estudios en diamantes mandarines anestesiados establecieron que, al menos para una subpoblación de neuronas en HVC, las señales de calcio presentan correlaciones en una escala de $263 \mu m$ (Graber et al., 2013). Este último valor está incluido en el intervalo aquí reportado para la escala de correlación medida a partir del perfil MUA. Los valores encontrados para el LFP, si bien mayores en promedio, también contienen a este valor previamente reportado. El estudio de la correlación espacial con sondas separadas entre sí por $25 \mu m$ presentó la dificultad asociada que para un extremo de la sonda, la actividad no presenta límites bien definidos. Una posibilidad a futuro sería realizar el mismo tipo de estudio pero con sondas de mayor extensión espacial o mayor separación entre canales. Adicionalmente, queda abierta la pregunta si, en el caso de canarios comportándose, la extensión de la actividad correlacionada disminuye respecto de lo aquí reportado, como fue encontrado previamente para diamantes mandarines.

Dado que el potencial de campo local en HVC no ha sido descripto anteriormente en canarios, además de poder caracterizar la correlación espacial de cada señal, resulta de sumo interés el estudiar la relación entre la respuesta dada por el LFP y la respuesta dada por la actividad neuronal. Espacialmente, a partir de los ejemplos mostrados en Figura 5.5 y Figura 5.6 puede verse que las señales presentan un buen grado de co-localización en la sonda. Para estudiar esta

relación espacial entre las señales, se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson (r) de los perfiles de amplitud de las señales a lo largo de la sonda. De los 14 protocolos para los cuales se analizó la espacialidad, sólo 3 presentaron un valor de $r < 0,7$ para los perfiles de amplitud entre LFP y MUA. Los 11 protocolos restantes mostraron coeficientes de correlación promedio de $r = 0,78 \pm 0,15$. **Este resultado indica que las variaciones espaciales de ambas señales está altamente correlacionada en los distintos sitios de medición, como se vio en Figura 5.4.** Para algunos de los protocolos, sin embargo, se encontró que la variación espacial de los perfiles de amplitud de las señales presenta mayor correlación para algún corrimiento entre los sitios de medición. De los 14 protocolos, 9 presentaron un valor máximo de correlación cruzada para un desplazamiento nulo, indicando que el coeficiente r de Pearson capta la máxima correlación entre los perfiles. Sin embargo, los 5 protocolos restantes presentaron un valor máximo de correlación cruzada para un corrimiento de ± 2 canales en la sonda. En promedio, los valores de máxima correlación cruzada para los perfiles de amplitud de los 14 protocolos fue de ($r_{x,y} = 0,83 \pm 0,13$, con valor mínimo de 0,67 y máximo de 0,98). **Este resultado, aunque comparable con el resultado previo muestra que puede existir un corrimiento de hasta $50 \mu m$ que maximice la relación espacial entre MUA y LFP.**

5.3.C. Relación MUA-LFP

Como se introdujo en la sección de métodos de este capítulo (*Relación entre las señales de actividad neuronal* (Subsección 5.2.C)), se realizaron distintas cuantificaciones para evaluar la similitud de la respuesta marcada en el LFP y en el perfil de actividad MUA. En esta sección se tratará cada una de ellas, yendo en un creciente nivel de detalle. En Subsección 5.3.A y Subsección 5.3.B se determinó la extensión espacial de la actividad en HVC y se observó que existen múltiples canales correlacionados para los potenciales de campo local LFP_{avg} y para los perfiles de actividad conjunta de múltiples neuronas (perfiles MUA). Adicionalmente, en Subsección 5.3.B también se cuantificó la correlación entre los perfiles de amplitud de ambas señales a lo largo de los canales en la sonda, encontrando que existía un alto grado de correlación. En esta sección se busca establecer la existencia de una relación en la estructura temporal de las respuestas dadas por ambas señales. En particular, una primer hipótesis que se quiere poner a prueba es si los mínimos prominentes caracterizados en los LFP_{avg} en *El LFP indica transiciones entre frases de canto* (Subsección 4.3.C) se corresponden con los picos de actividad de los perfiles MUA durante la respuesta al estímulo.

Correlación temporal de las señales

Como medida global de similitud entre las señales, se computó la máxima correlación cruzada entre los LFP_{avg} y los perfiles MUA durante la presentación del estímulo. El LFP_{avg} utilizado

en esta comparación es el perteneciente al canal de máxima amplitud RMS, que fue el analizado en Capítulo 4. Para la elección del perfil MUA a analizar, se utilizó el resultado mostrado en Subsección 5.3.B: para la mayoría de los protocolos, se utilizó el perfil MUA del mismo canal que LFP_{avg} . Para los protocolos que presentaran una correlación máxima de los perfiles de amplitud con un corrimiento de ± 2 canales, se tomó entre ellos el perfil MUA que maximizara la correlación temporal global con el LFP_{avg} . A nivel global (durante todo el tiempo de presentación del estímulo), la correlación cruzada promedio es de $\bar{r}_{LFP,MUA} = 0,37 \pm 0,13$, con un valor mínimo de 0.15 y un valor máximo de 0.63 para los 16 protocolos analizados. A una escala más localizada, sin embargo, los valores máximos de correlación cruzada aumentan. Como se mostró en Sección 4.2.B y en Subsección 4.3.C, la duración promedio de las frases de los cantos analizados es de $1,18 \pm 0,61s$. Por este motivo, se buscaron instancias correlacionadas en una escala comparable a la duración de las frases. Se tomaron ventanas de 1 s de duración y se midió en esas ventanas la correlación cruzada entre las señales. Barriando la duración del canto cada 250 ms, se obtuvo un perfil de los valores de la máxima correlación cruzada en cada ventana para cada par de señales analizadas. **Esto permitió evaluar que existen instancias en las cuales ambas señales presentan un alto grado de correlación.** Tomando para cada par de señales el máximo valor de correlación hallado en estas ventanas temporales, se encuentra que la máxima correlación promedio es $\bar{r}_{LFP,MUA}(M) = 0,81 \pm 0,06$, donde M indica que se tomó el valor máximo para cada par de señales. Dentro de los máximos de correlación encontrados para los 16 pares, el mínimo valor resultó ser de $r(M)_{LFP,MUA} = 0,72$ y el máximo $r(M)_{LFP,MUA} = 0,91$.

Estos resultados demuestran que, si bien a nivel global las señales no presentan un alto grado de correlación, a nivel de la escala característica de la duración de las frases de canto aparecen instancias donde las señales sí están correlacionadas $r > 0,7$, (mediana = 3 segmentos/protocolo separados al menos 1 s entre sí). En este análisis se utilizó la correlación cruzada, permitiendo un desplazamiento de hasta $\pm 25ms$ entre las señales de cada ventana temporal para encontrar el máximo valor de correlación. Para cada ventana analizada se encontró que el LFP_{avg} está levemente atrasado respecto de la actividad en el perfil MUA (en el 88 % de las ventanas analizadas el LFP presentó un retraso positivo, en promedio $\Delta t_{LFP-MUA} = 7 \pm 6 ms$, mediana = 5 ms).

Determinación de instancias prominentes

Para estudiar en detalle la presencia de instancias compartidas en la respuesta, se buscó una medida que fuera sensible a la presencia de períodos de excitación marcada, a partir de determinar picos prominentes en cada señal para luego evaluar el grado de acuerdo entre los conjuntos de picos encontrados (como se mencionó en *Relación entre las señales de actividad neuronal* (Subsección 5.2.C)). En Figura 5.7 se muestran los resultados de esta caracterización para los protocolos

analizados. En (a) se muestran las posiciones de los picos prominentes encontrados para los perfiles MUA (líneas sólidas de color rojo) y para los LFP_{avg} (líneas negras con símbolo en el centro). Estas instancias fueron detectadas a lo largo de la respuesta al canto, y se presentan agrupadas en la figura como pares de conjuntos de instancias, de manera alternada. Las líneas horizontales negras dividen los protocolos en grupos provenientes de distintos animales (cuya denominación se encuentra a la izquierda). **Notar que existe un gran número de instancias de picos de activación en MUA o mínimos prominentes en LFP que coinciden entre sí** (las flechas en (a) son una ayuda visual hacia instancias particulares donde existe un buen acuerdo entre los picos de ambas señales). En (c) se muestran segmentos de un ejemplo de LFP_{avg} (arriba) y de perfil MUA (abajo) luego del pre-filtrado para la detección de mínimos y máximos, respectivamente (ver Subsección 5.2.C). Con líneas verticales se indican las instancias detectadas en cada caso. Notar cómo para el segmento mostrado los umbrales de detección elegidos logran capturar las instancias prominentes. **Notar también la similitud en los tiempos de detección de eventos para cada señal, indicando la presencia de instancias de respuesta compartida entre las señales.**

En (b) se muestra la cuantificación realizada sobre los datos. Para los picos detectados en MUA, se computó la menor distancia Δt a los picos detectados en el LFP_{avg} . Se consideró como instancias concordantes a aquellas que estuvieran a una distancia menor a 50 ms entre sí. En (b) se muestra el histograma de las distancias de los eventos que cumplen esta condición (34 % de los eventos en MUA, 88 puntos/258 puntos en total). A pesar de que esta cuantificación subestima el grado de similitud entre las señales, cuando se considera a la inversa (cantidad de picos de LFP que tienen un pico de MUA asociado), esta relación es del 65 %, con 98/150 eventos correspondientes. La distribución de distancias Δt resultante entre los eventos coincidentes no puede ser distinguida de una distribución normal (prueba de Shapiro-Wilk, $p = 0.31$) y no presenta un valor medio significativamente distinto de 0 (prueba t de una muestra, $p = 0.11$; $\overline{\Delta t} = -3 \pm 18$ ms).

Estos resultados muestran que existe una correspondencia - al menos parcial - de instancias prominentes en ambas señales. El siguiente nivel de análisis consiste en estudiar en una escala localizada la presencia de respuestas en MUA comparables a las obtenidas para sílabas del tipo P0 y P1 en el LFP.

Ejemplos de respuesta a P1 y P0

Usando la información de las instancias de respuesta robusta en el LFP ya analizadas en Capítulo 4, se estudió la respuesta en términos de la actividad MUA. Para esto, en las frases ya analizadas para el LFP se buscaron picos de excitación en MUA. Con este análisis se quiere poner a prueba la relación a nivel de la estructura de la respuesta en la escala de las frases del canto, profundizando el análisis realizado sobre el LFP en el capítulo anterior.

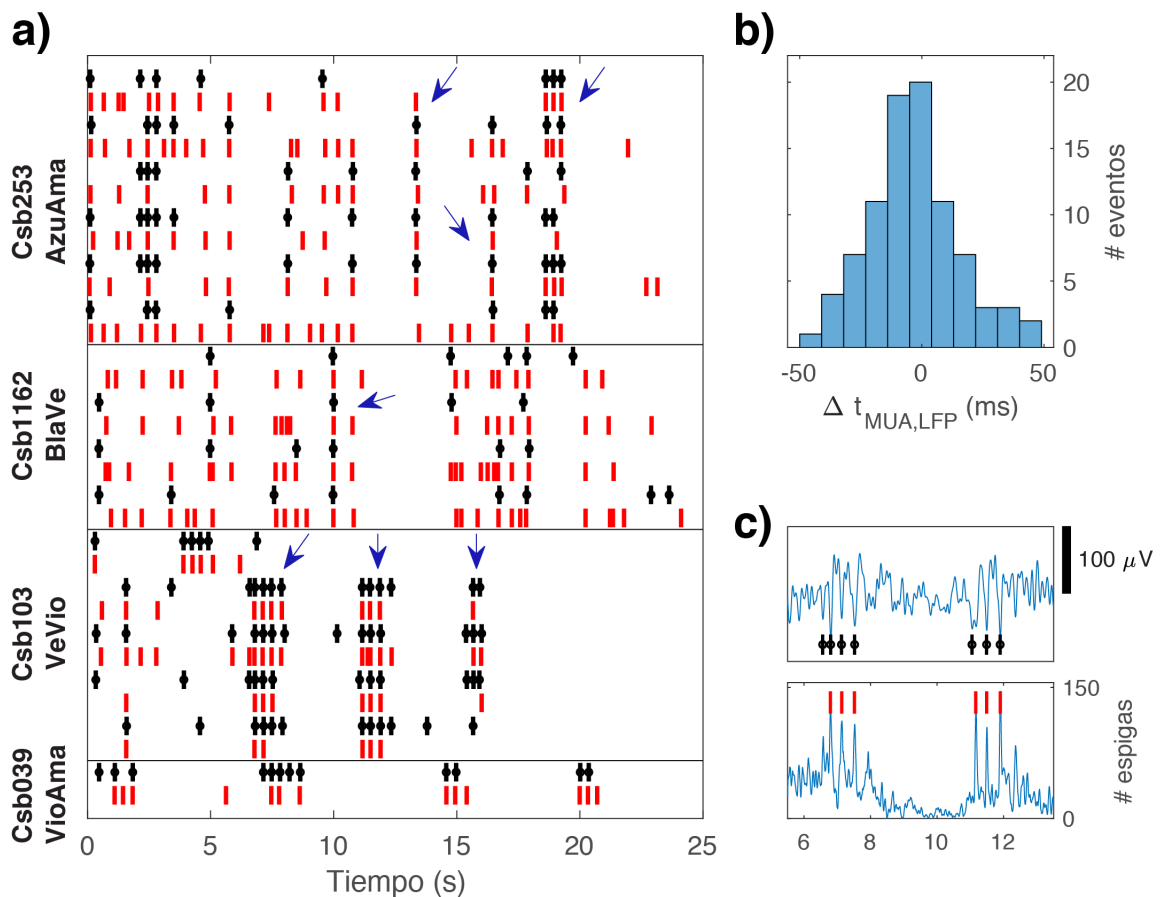


Figura 5.7: Correspondencia en la detección de picos en perfiles MUA y LFP_{avg} . (a) Eventos detectados en los perfiles MUA (líneas verticales rojas) y en los LFP_{avg} de cada protocolo (líneas negras con un símbolo central). El eje horizontal representa el tiempo, mientras que los resultados de distintos protocolos se representan en distintos valores en el eje vertical. Para un protocolo se corresponden dos tiras de eventos (una correspondiente a los picos detectados en el perfil MUA, otra correspondiente a los mínimos detectados en el LFP). Finalmente, las líneas horizontales separan los datos obtenidos para distintos animales. Notar que existe un gran número de eventos que coinciden entre ambas señales (las flechas sirven como guía visual hacia algunas instancias especialmente prominentes). (b) Distancia entre los eventos de los dos tipos de señales en el rango ± 50 ms, correspondiente a los eventos de MUA que tuvieron su coincidencia en el LFP. Estas distancias siguen una distribución normal, con valor medio $\Delta t = -3 \pm 18$ ms (para más detalles, ver el texto)). (c) Ejemplo de segmentos de señales analizadas; los perfiles MUA (panel inferior) y LFP (panel superior) presentan instancias compatibles entre sí. Las líneas verticales indican eventos detectados en cada señal.

La respuesta proveniente de este análisis está ejemplificada para una sílaba del tipo P1 en Figura 5.8. En el panel superior de (a) se muestra el sonograma del segmento del canto. En los paneles inferiores se muestran los LFP_{avg} (verde) y los perfiles MUA (azul) de los protocolos de un ave (Csb1162-BlaVe). Cada par de paneles LFP-MUA corresponde a un segmento de datos de un protocolo. Con líneas verticales negras o rojas se marcan las instancias detectadas en el LFP o el perfil MUA, respectivamente. En el panel inferior de esta figura se agruparon las instancias, codificadas por color de la misma manera. **Como se describió en *El LFP presenta sincronización en frecuencia a segmentos de canto* (Subsección 4.3.D) para el LFP, la actividad conjunta de múltiples neuronas presenta el mismo tipo de oscilaciones, formando un patrón de activación durante la presentación del canto** para la frase mostrada. Como se discutió en Figura 5.7, existe una correspondencia entre las instancias detectadas en ambas señales. En (b) se muestra el histograma de distancias entre cada pico detectado al inicio silábico previo (para MUA en rojo, y LFP, en negro). Notar que, como en los ejemplos mostrados en Subsección 4.3.G, **los picos detectados se agrupan en términos de instancias específicas**. Más aún, el histograma en (c) corresponde a las distancias entre los eventos detectados en MUA y en el LFP, indicando, como se discutió antes, que las instancias coinciden.

Así como la respuesta en MUA es equivalente a lo encontrado en el LFP para casos de sílabas P1, **esto también ocurre para el caso de frases del tipo P0**. En este caso, los picos de actividad son de mayor amplitud que los mostrados en Figura 5.8. En Figura 5.9 se muestra en detalle un ejemplo para una frase de sílabas del tipo P0 (la figura está organizada de la misma forma que Figura 5.8. Notar la presencia de picos robustos en MUA en respuesta a las sílabas de tipo P0, como se ven también en los LFP. En (b) se muestran los histogramas, donde puede verse que las instancias no están uniformemente distribuidas, y que las instancias detectadas en ambas señales son compatibles. Los datos mostrados en (c) presentan un valor medio de $\overline{\Delta t}_{LFP,MUA} = -0,8 \pm 11,2 \text{ ms}$) indicando, como en Figura 5.8, que **la actividad MUA y el LFP están codificando las mismas instancias**.

Los ejemplos mostrados en esta sección son sólo parte de la respuesta a sílabas del tipo P0 y P1 registradas en todos los protocolos. En las caracterizaciones hasta ahora, se midió el grado de correlación entre MUA y LFP y se mostraron algunos ejemplos particulares de respuesta en los cuales **los resultados obtenidos a partir del análisis del LFP en Capítulo 4 y la actividad detectada en el perfil MUA son compatibles**.

Promediado en eventos

Para caracterizar en mayor profundidad la relación entre el LFP y la actividad multiunidad, se realizó un análisis promediando sobre todas las instancias de respuesta. La medida más directa de esta relación viene dada por el promediado de las trazas de perfiles MUA y LFP para cada

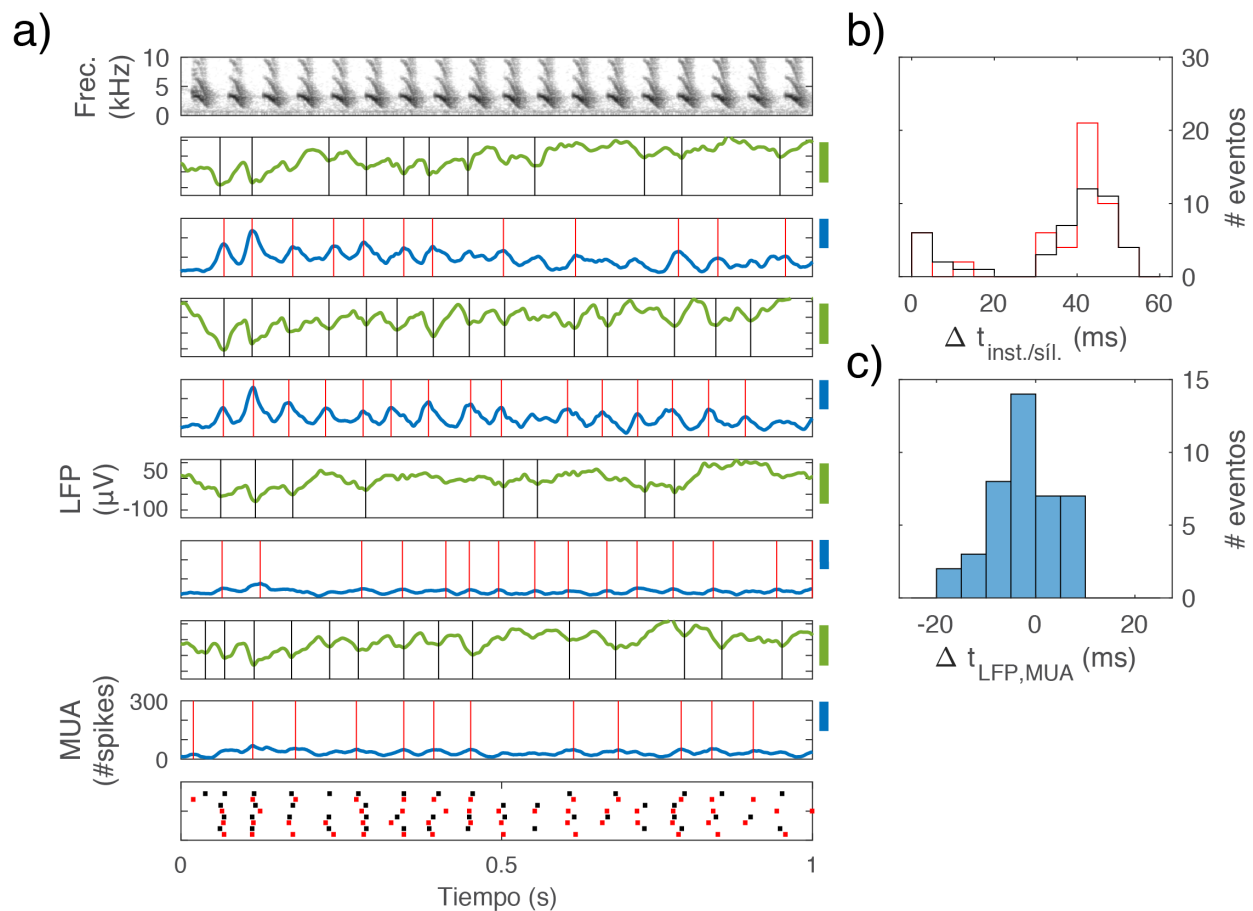


Figura 5.8: Ejemplo de correspondencia entre la actividad conjunta de múltiples neuronas (MUA) y el potencial de campo local (LFP) para una frase de sílabas de tipo P1 en datos de un ave (Csb1162-BlaVe). (a) Panel superior: sonograma de la frase correspondiente (P1); paneles intermedios: perfil MUA (azul) y LFP (verde). Cada par MUA-LFP corresponde a los datos de un protocolo. Las señales presentan en ambos casos oscilaciones que ocurren con una frecuencia equivalente a la tasa silábica de la frase presentada (como se observó en Subsección 4.3.D para el LFP). Las líneas verticales marcan las instancias detectadas por un umbral de amplitud relativa sobre cada señal (ver Subsección 5.2.C); panel inferior: instancias detectadas representadas en conjunto, con los mismos colores que en los paneles de arriba. Como se discutió en Figura 5.7, existe una relación entre ambas señales. (b) histogramas de retraso respecto al inicio silábico previo, para el LFP (negro) y MUA (rojo). Notar la similitud entre ambas distribuciones. (c) La distribución de las distancias entre las instancias de los eventos detectados en el LFP_{avg} y el perfil MUA presentan un valor medio de $\Delta t = -3 \pm 7 \text{ ms}$.

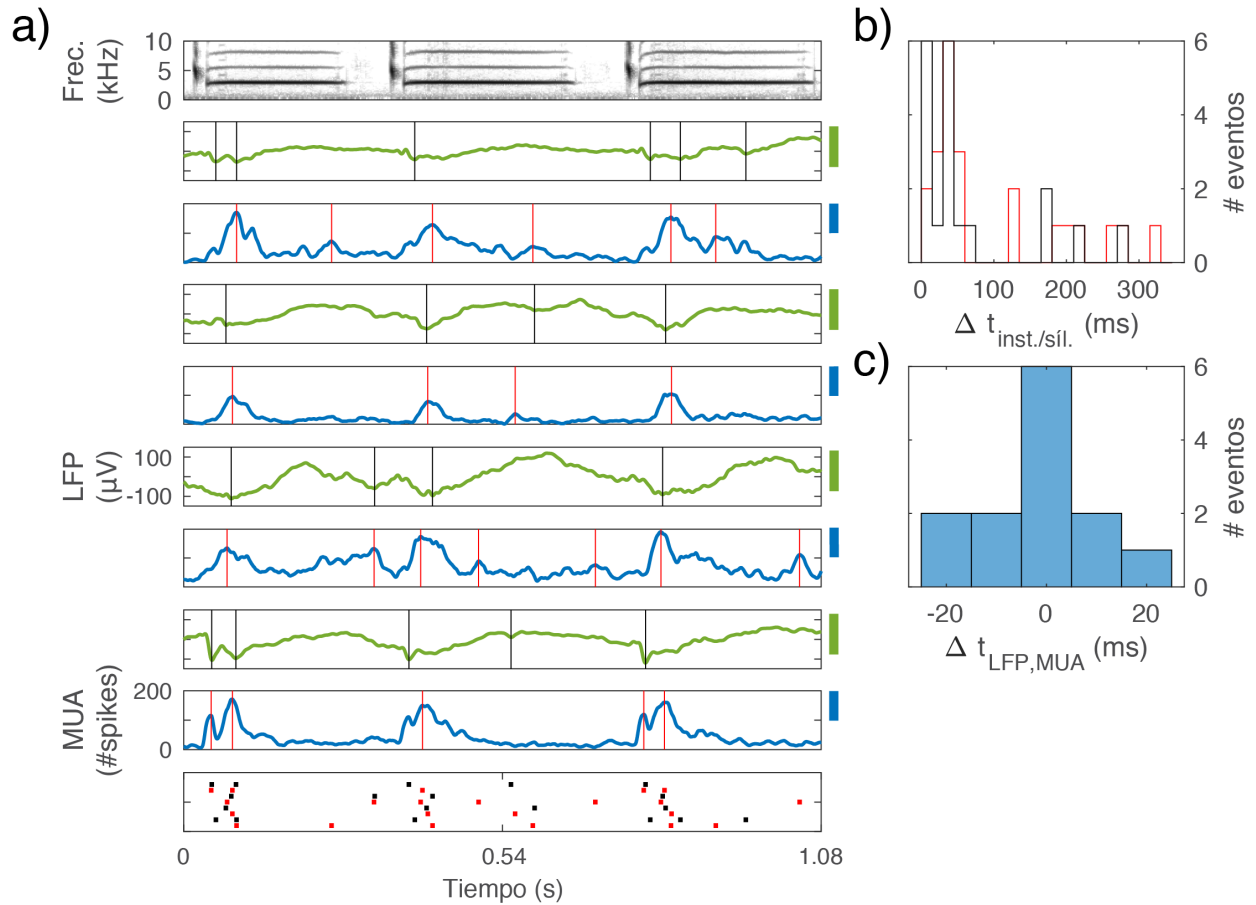


Figura 5.9: Ejemplo de correspondencia entre la actividad conjunta de múltiples neuronas (MUA) y el potencial de campo local (LFP) para una frase de sílabas de tipo P0. Panel superior: sonograma de la frase correspondiente (tipo P0); paneles intermedios: perfil MUA (azul) y LFP (verde). Cada par MUA-LFP corresponde a los datos de un protocolo para un ave (Csb103-VeVio). La figura está organizada como Figura 5.8. Notar que en este caso, las instancias de activación se dan en la cercanía del inicio de las sílabas, dejando largos períodos de actividad a nivel basal, como puede verse en (b). Las distancias entre los picos detectados en ambas señales están cerca de 0 ms, con un valor medio y desviación estándar de $\Delta t_{\text{LFP,MUA}} = -0,8 \pm 11,2 \text{ ms}$. Estos resultados indican que existe una correspondencia entre las instancias medidas en ambas señales.

instancia de respuesta. **En este análisis, una instancia está dada por la respuesta a cada sílaba individual.** Adicionalmente, haciendo provecho de los ejemplos mostrados en Sección 5.3.C, se detectaron picos de actividad para cada segmento individual y, como antes, **se realizaron histogramas de distancia respecto al inicio silábico para todas las instancias detectadas en todos los protocolos.** De esta manera, con los histogramas y las trazas promediadas se termina de plantear la evaluación de la similitud entre las señales.

En Figura 5.10 se muestran los resultados de esta cuantificación. La figura está dividida en dos, una parte dedicada a sílabas del tipo P0 (izquierda) y otra para sílabas del tipo P1 (derecha). Cada sección de la figura, a su vez, presenta distintos paneles. En (a) se muestran superpuestas las señales de sonido correspondientes a las sílabas del tipo P0 y P1, normalizadas por el valor máximo. Superpuesta y desplazada verticalmente se muestra la envolvente promedio de las señales, también normalizada. En (b) se muestra el promediado en eventos de cada instancia de respuesta. Para las sílabas del tipo P0, se promediaron 58 instancias de respuesta, repartidas entre 9 frases de sílabas de este tipo para los protocolos correspondientes a 3 aves distintas, con datos de los núcleos HVC de ambos hemisferios. Las trazas promediadas corresponden al segmento del LFP que comienza con la presentación de una sílaba del tipo P0 y se extiende hasta el comienzo de la sílaba siguiente. Los segmentos tomados de esta manera no presentan una longitud uniforme (los períodos intersilábicos varían en las distintas frases P0); para los datos correspondientes a las 3 aves representadas en estos datos (Csb039-VioAma, Csb103-VeVio, Csb253-AzuAma), los períodos intersilábicos varían entre 310 ms y 400 ms. Por este motivo, para las sílabas del tipo P0, en la región $t > 300$ ms, el promedio entre trazas es realizado con una cantidad progresivamente decreciente de señales (notar las pequeñas discontinuidades en el promedio).

Para sílabas del tipo P1, se promediaron 1157 segmentos (de los cuales se muestran superpuestos una muestra de 500 sílabas tomadas al azar en (a)), con datos que representan 11 frases entre las 4 aves analizadas. Dado que estas sílabas pueden presentar períodos intersilábicos tan cortos como 40 ms, para poder realizar el mismo procesamiento se tomó una ventana por exceso de 15 ms respecto del período intersilábico, para evitar tener discontinuidades en la región en la cual se agrupan los eventos detectados. Las áreas coloreadas corresponden a la barra de error asociada a los promedios obtenidos, determinada como $\pm SD$. En (c) el procesamiento es análogo al realizado en (b) para el LFP, sólo que para los perfiles de actividad MUA. Previo al promediado, cada traza de perfil MUA fue normalizada a la amplitud del máximo pico en el segmento, por lo cual el promedio mostrado conforma una medida normalizada de la actividad en respuesta a cada tipo silábico.

Por último, en (d) y (e) se muestran los histogramas de las distancias de los picos detectados en cada una de las señales respecto al inicio silábico correspondiente. Los histogramas del LFP ya fueron presentados en Capítulo 4. Los eventos en MUA fueron detectados como en *Ejemplos*

de respuesta a P1 y P0 (Sección 5.3.C). Tanto en (d) como en (e) los histogramas han sido normalizados de forma que la suma de todas las cuentas en todas las columnas sumen 1, por lo cual representan la probabilidad de encontrar eventos agrupados en cada instancia de tiempo.

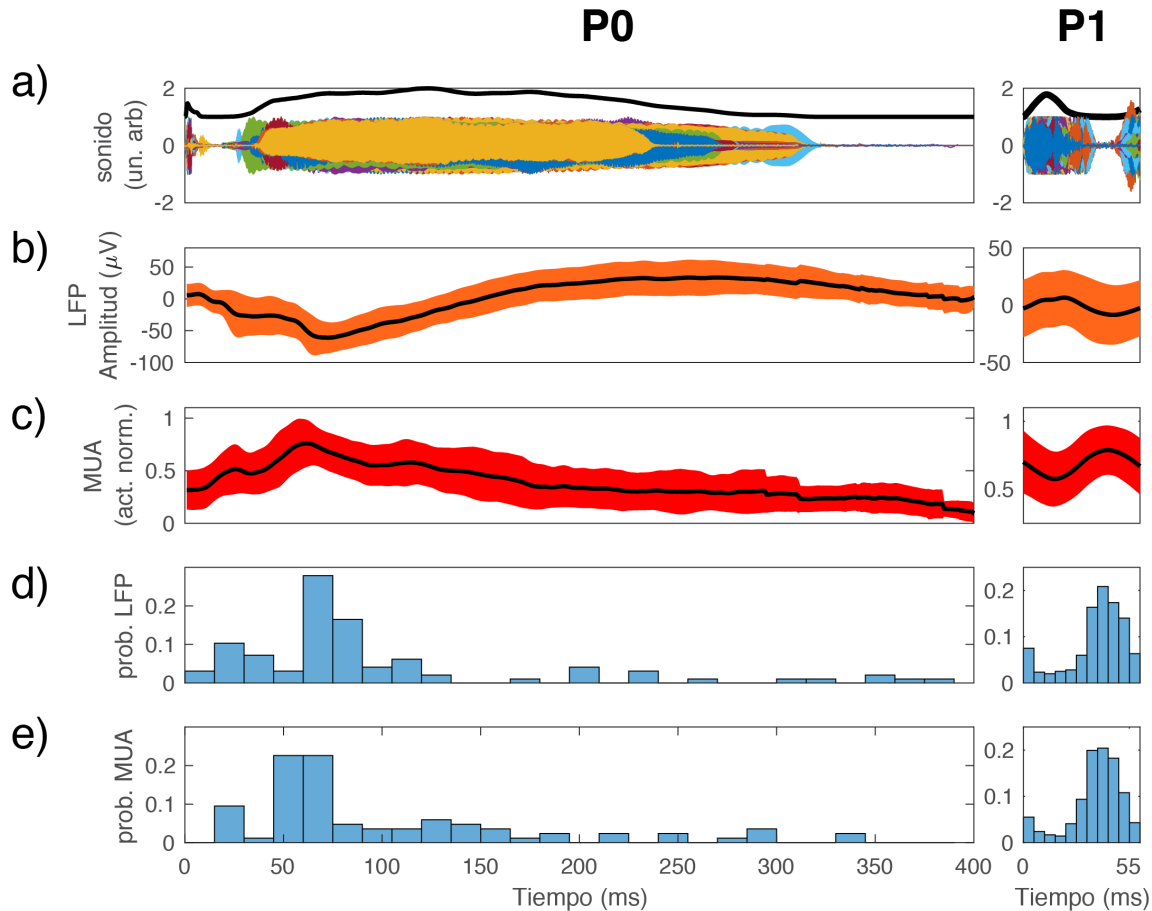


Figura 5.10: Promedios en eventos para sílabas del tipo P0 (izquierda) y tipo P1 (derecha). (a) Superposición de las señales de sonido normalizadas y envolventes promedio normalizadas (línea sólida superpuesta y desplazada verticalmente), mostrando los segmentos de canto correspondientes a cada respuesta considerada. (b) Promedio en ensayos de las trazas del LFP en respuesta al estímulo (P0, $n = 58$ trazas promediadas; P1, $m = 1157$ trazas promediadas). Las respuestas están alineadas al inicio silábico. La línea sólida representa el promedio y las áreas coloreadas las barras de error, tomadas punto a punto como $\pm$ SD. (c) ídem (b) pero para los perfiles de actividad MUA, previamente normalizados a la amplitud del máximo pico en el segmento. (d) y (e), histogramas de eventos detectados a partir de un umbral para los LFP y perfiles MUA considerados, respectivamente. Las señales promediadas dan cuenta de la respuesta observada para estos dos tipos silábicos tanto en LFP como en MUA. Este análisis muestra que existe una relación muy notable de la actividad conjunta de múltiples neuronas en el núcleo HVC con el potencial de campo local. Este resultado resalta la importancia del LFP como medida de actividad en este núcleo neuronal.

Notar que el promediado en ensayos, tanto para el LFP como para los perfiles MUA, captura características previamente discutidas en las respuestas: la presencia de un doble pico de

actividad en las sílabas del tipo P0 y una oscilación lenta (dada por la cola de la señal), mientras que en las sílabas P1 se tiene un mínimo que podría estar asociado al final de las sílabas o al comienzo de la siguiente, formando un refuerzo periódico de la actividad. Por otro lado, la sorprendente relación entre el LFP y MUA se hace de manifiesto al comparar las trazas promediadas en eventos. A nivel de correlación temporal, estas señales presentan un coeficiente de correlación de Pearson (tomando la señal del LFP en valor absoluto) $r_{P0} = 0,72$ y $r_{P1} = 0,68$, respectivamente. En el caso de las sílabas tipo P0, la correlación cruzada resulta máxima para un corrimiento de 0 ms (por lo cual la máxima correlación es equivalente a r_{P0}). Para sílabas del tipo P1, en cambio, la correlación se maximiza para un corrimiento de 4 ms en favor de la actividad neuronal adelantada al LFP (dando un valor máximo de $r_{P1,\Delta t} = 0,78$).

Para las sílabas del tipo P0, el primer pico es de baja amplitud (de aproximadamente la mitad que el pico más prominente). El primer mínimo está ubicado en 33 ± 20 ms para el LFP y en 26 ± 20 ms para el perfil MUA promediado. El segundo pico, en cambio, se encuentra en 75 ± 15 ms para el LFP y en 65 ± 20 ms para el perfil MUA. Los valores se solapan entre sí al compararlos y el análisis de correlación cruzada dio un valor máximo para un corrimiento nulo, notar que los valores medios están adelantados en MUA respecto del LFP. Adicionalmente, para las sílabas del tipo P1 los valores también coinciden entre sí. El pico (mínimo o máximo) de la señal promediada se encuentra en 40 ± 15 ms en ambos casos.

Estos valores dan cuenta de la variación encontrada en los eventos individuales (histogramas en (d) y (e)). En el caso del LFP, para las sílabas P0 y P1 los histogramas son los ya introducidos en Capítulo 4. Estos histogramas representan un total de 97 eventos detectados en los LFP, para las mismas frases y los mismos protocolos a los que corresponde el análisis de las señales promediadas. En estos histogramas, el primer pico de respuesta en las sílabas P0 se encuentra en los 30 ± 15 ms, mientras que el segundo se encuentra en 75 ± 15 ms. La distribución de datos presenta un valor medio de 100 ms y una desviación estándar de 94 ms, dada en particular por la presencia algunos valores distribuidos durante el periodo intersilábico. La mediana de los valores se encuentra en 73 ms, en acuerdo con la presencia del pico del histograma.

El histograma de los picos de actividad detectados en MUA, en cambio, corresponden a 84 eventos también detectados en los mismos protocolos. El primer pico detectado se encuentra más concentrado que su contraparte en el LFP, en $22,5 \pm 7,5$ ms. El segundo pico se encuentra en 60 ± 15 ms. Como para el LFP, la detección de eventos por umbral detecta algunos eventos distribuidos en el periodo intersilábico, por lo cual el valor medio de la distribución es de 103 ms, con una desviación estándar de 78 ms. La mediana, en cambio, se sitúa en 68 ms, también en acuerdo con la presencia del pico del histograma. Una prueba de Kolmogorov-Smirnov de dos muestras no puede rechazar la hipótesis nula de que las distribuciones de instancias en LFP y MUA provengan de una misma distribución ($p = 0,11$). En adición, los picos detectados en eventos individuales muestran una distribución que no presentan diferencias significativas con

los valores de los picos reportados por el promediado en eventos. Para sílabas P1, el histograma de los eventos detectados en el LFP corresponden a 597 eventos, con un pico en 40 ± 10 ms. En MUA, en cambio, los eventos detectados descienden a 414, pero presentan un pico en la misma ubicación que el histograma del LFP. La muestra de datos correspondiente al LFP presenta un valor medio de 34 ± 14 ms, con una mediana de 38 ms. La muestra de valores detectados en MUA se agrupan alrededor de 34 ± 13 ms, con una mediana de 37 ms. Por lo tanto, las distribuciones tampoco pueden ser discriminadas con una prueba de Kolmogorov-Smirnov de dos muestras ($p = 0,19$). Adicionalmente, la ocurrencia de este pico coincide con el pico en las señales promediadas.

Estos resultados terminan por establecer la correspondencia entre los LFP medidos en HVC y la actividad neuronal en el núcleo, dado que reportan instancias equivalentes en la respuesta. Para que esto suceda, el perfil de actividad debe contener la actividad sincronizada de múltiples neuronas que generen estos patrones de respuesta. Es notable que la respuesta emerja de manera tan clara a partir del promediado, incluso al tratarse de sílabas que pueden variar en su duración (ver, por ejemplo, la dispersión en términos de la ubicación del pico máximo en las señales de sonido, o la dispersión de tiempos de finalizado de sílaba en las sílabas del tipo P0 superpuestas). **Lo que es interesante, adicionalmente, es que tanto para el caso de sílabas P0 como P1 las instancias se agrupan tan claramente en algunas instancias específicas, incluso cuando los datos provienen de distintas aves, distintos sitios en HVC y hasta de distintos hemisferios cerebrales.** De esta manera, estos datos están mostrando evidencia indirecta de las instancias motoras propuestas para la producción de estas sílabas por el modelo circular.

Dada la dispersión de los datos y el corto intervalo intersilábico para sílabas del tipo P1, no es del todo claro si la respuesta está agrupada en un entorno del final de las sílabas, los silencios intersilábicos, o el comienzo de la siguiente sílaba. Sí es claro, sin embargo, que **esta oscilación mantiene una fase definida** en cada caso, y que **en los datos explorados hasta ahora no se encontró que esa fase cayera en alguna instancia en el medio de la sílaba P1**. Dada la correspondencia entre el LFP y la actividad conjunta de múltiples neuronas, es de esperar que neuronas individuales en HVC sigan este mismo comportamiento.

Para las sílabas P0, las instancias están más concentradas en la cercanía del inicio de la sílaba, habiendo una probabilidad casi nula de ocurrencia en la segunda mitad de la sílaba (lo que corresponde a unos 150 ms). La presencia de un doble pico en la actividad cuya distancia es del orden del intervalo que existe entre el comienzo del primer pulso de alta frecuencia y la parte tonal de la sílaba es sugerente de que se podrían estar codificando estas dos instancias en la respuesta. Adicionalmente, normalizar los tiempos de los eventos detectados resulta en una mayor dispersión en los histogramas de eventos. Al normalizar los tiempos de esta manera, sin embargo, también se añade mayor dispersión al intervalo entre la primer nota y el comienzo de la segunda parte de la sílaba, lo cual puede estar indicando que la preservación de esos tiempos

es importante en la codificación de la sílaba. En efecto, se mostró que, desde la perspectiva del modelado, la disrupción de los tiempos asociados con el pulso de actividad en HVC resulta en el rompimiento silábico en la región del gesto motor correspondiente al silencio entre la primer y segunda nota de la sílaba del tipo P0 (Alonso et al., 2015).

5.3.D. Sincronización de múltiples unidades en HVC

Para finalizar la caracterización de la respuesta obtenida y proporcionar evidencia adicional de que el potencial de campo está relacionado con la actividad de neuronas en instancias específicas en la codificación del canto en HVC, en esta última parte se muestran los resultados obtenidos hasta el momento para la actividad de neuronas individuales aisladas en los registros.

En el procedimiento de clasificación de espigas, para cada protocolo se obtuvieron múltiples grupos neuronales, de lo cual se muestra un ejemplo en el que se logró aislar un gran número de grupos (29 grupos, putativamente correspondientes a unidades distintas) en Figura 5.11. Para los protocolos que se logró obtener grupos bien separados, sólo un porcentaje presentaron respuesta al canto propio. Como medida estimativa, sobre un conjunto reducido de protocolos en los cuales se pudieron aislar neuronas de manera satisfactoria y con respuesta al estímulo, se tiene que **aproximadamente el 5%–10% de los grupos detectados inicialmente presentan respuesta al canto** (por ejemplo para los grupos mostrados en Figura 5.11, se tuvo que sólo 3 de ellos presentaron respuesta al canto propio).

Para las sílabas del tipo P0, se lograron aislar múltiples grupos en los distintos protocolos medidos. El primer ejemplo de esto corresponde a un protocolo en el cual se pudieron separar satisfactoriamente seis grupos. En Figura 5.12 pueden verse los resultados agrupados. En (a), el panel superior es la señal del canto presentado durante el protocolo experimental al animal anestesiado. El panel siguiente corresponde al LFP_{avg} para ese protocolo. En los paneles intermedios, los histogramas de actividad dependientes del tiempo promediados en ensayos corresponden al análisis de la actividad de cada uno de los grupos neuronales mostrados a la derecha en (b), con el mismo código de colores. **Notar la presencia de una gran excitación en el comienzo del canto, seguida de un patrón de actividad particularmente marcado en respuesta a sílabas del tipo P0** (como en los resultados mostrados en *Resultados agrupados* (Subsección 4.3.G)). El histograma de color negro (marcado como “SUMA”) es la actividad sumada de todos los grupos neuronales, mostrando que las instancias robustas de activación en el histograma de actividad sumada son similares a las encontradas para cada grupo individual. Notar, adicionalmente, que existe distinto nivel de actividad basal en los distintos grupos, y que el primer grupo (en celeste) presenta disparos selectivos en sólo una frase de sílabas P0. La amplitud máxima mostrada en cada panel fue ajustada para mostrar el perfil de cada respuesta en detalle.

En el panel inferior se muestra el perfil de actividad MUA que fue objeto de análisis durante

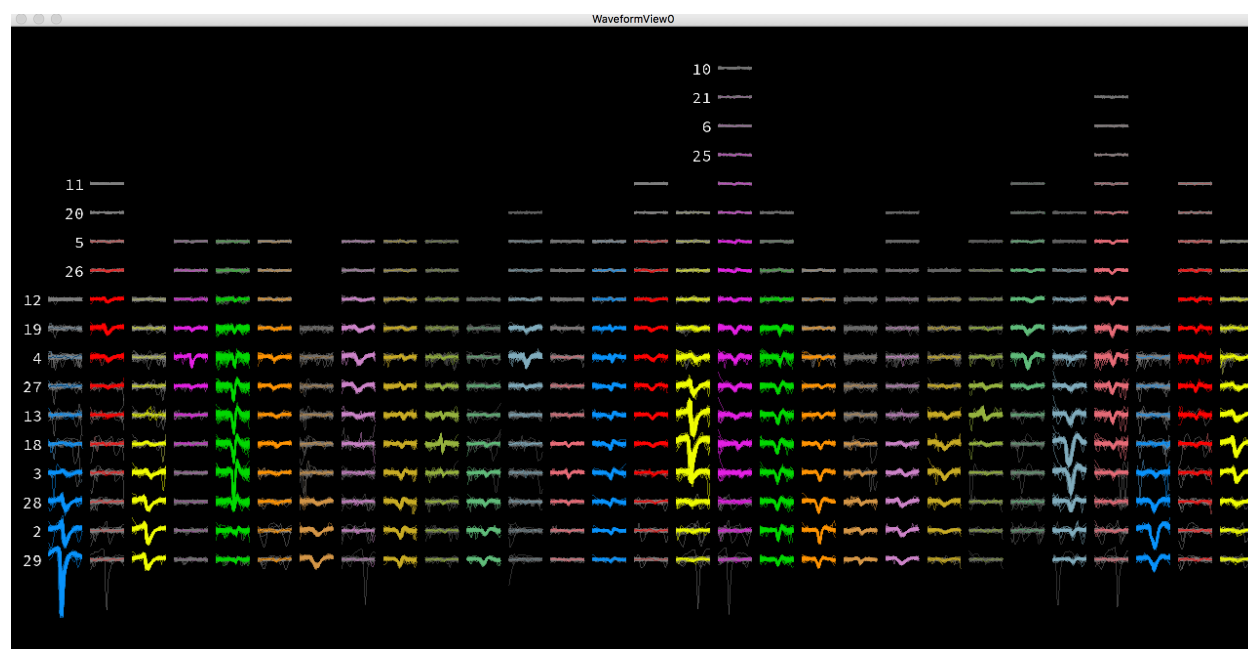


Figura 5.11: Determinación de múltiples grupos en un registro. Captura de pantalla del resultado de un proceso de agrupamiento de espigas, luego de la etapa automática y supervisión manual. Cada espiga de forma y amplitud distinta se considera putativamente una neurona distinta luego de analizar los autocorrelogramas y correlogramas cruzados entre los grupos. Como punto de partida, espigas de amplitud y forma distinta en distintos canales de la sonda indican un alto grado de probabilidad de que las espigas correspondan a potenciales de acción emitidos por distintas neuronas. Notar que los grupos de espigas están presentes en distinto número de canales y cubren una amplia zona de la sonda (17 canales).

este capítulo. **Observar la presencia de las instancias robustas de activación en MUA y SUMA.** Ambos perfiles de actividad están reportando las mismas características en la respuesta. Notar, adicionalmente, la presencia de un pico de actividad en la transición entre 2 frases cerca del comienzo del canto. En (b) se muestra una superposición de una muestra tomada al azar para cada grupo de las espigas que lo componen (se muestra sólo la forma de la espiga en el canal de máxima amplitud para cada grupo). La lista de números a la derecha indican la presencia de ese grupo en el canal de registro en la sonda (ver esquema a la derecha). **Para uno de los grupos, se muestra cómo cambia la forma de la espiga en los distintos canales en la sonda.** Una cuantificación de la robustez de las instancias observadas en MUA y a nivel de la actividad de neuronas individuales, así como los resultados encontrados hasta el momento para los distintos tipos silábicos se detalla en la siguiente sección.

5.3.E. Actividad de neuronas únicas

En la sección anterior se mostró la sincronización en la respuesta de distintas neuronas en un mismo protocolo. **En esta sección se muestran resultados de distintos protocolos que re-**

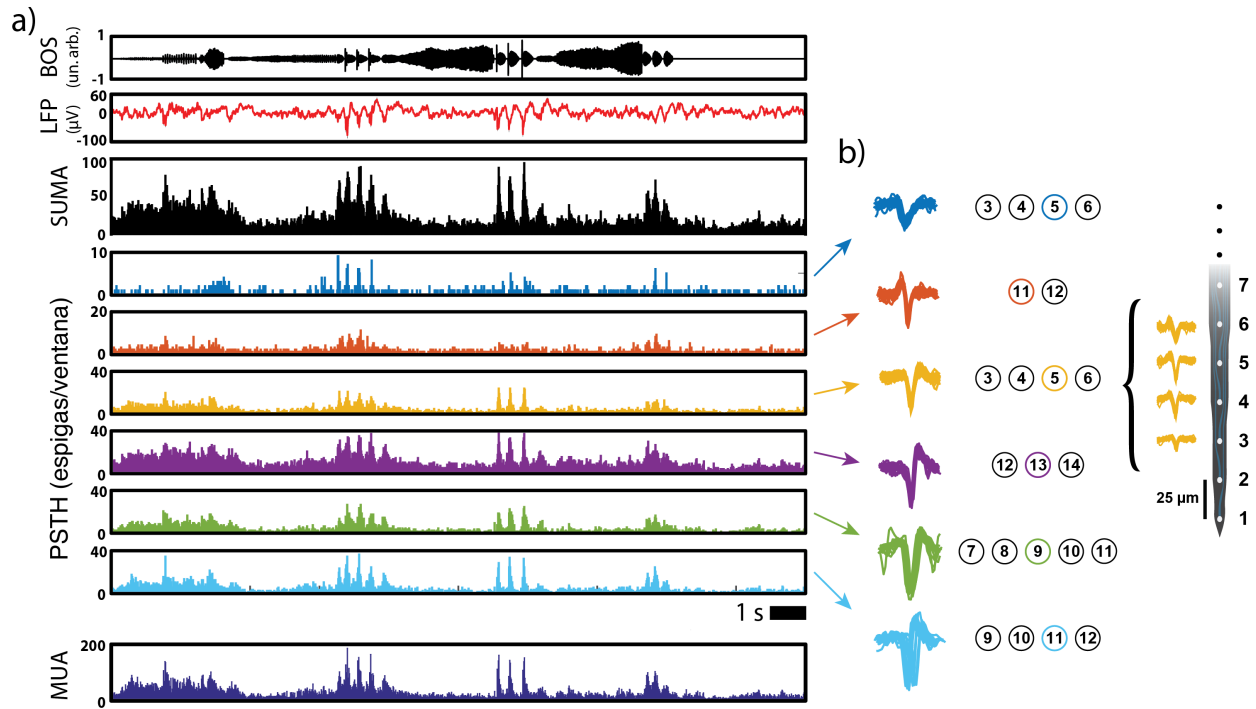


Figura 5.12: Grupos detectados para un protocolo y su perfil de actividad. (a) Panel superior: señal correspondiente al canto del ave. Paneles intermedios: histogramas de actividad promediados en ensayos para los grupos neuronales mostrados a la derecha (codificados por color). El perfil “SUMA” corresponde a la suma de los histogramas de los grupos analizados, mientras que el perfil “MUA” (panel inferior) corresponde al perfil de la actividad conjunta de todos los eventos neuronales que superaron un umbral (y fue el objeto principal de estudio en este capítulo). Notar la similitud entre los perfiles de actividad de las distintas neuronas, y entre SUMA y MUA (para más detalle, ver texto). (b) Superposición de espigas de cada grupo. Las espigas mostradas fueron extraídas de los canales de máxima amplitud para cada grupo; para uno de ellos se muestra el detalle de la variación espacial en la sonda. La lista de números a la derecha de cada grupo indica el canal en el que los eventos fueron detectados, dando una medida de la extensión de cada grupo en la sonda. Como puede verse a partir de las posiciones de los distintos picos de los histogramas en cada caso, la actividad neuronal está sincronizada temporalmente (disparando en instancias específicas del canto) y espacialmente (neuronas en distintos lugares de la columna muestreada en el núcleo HVC).

cuperan, a nivel individual, características de las respuestas medidas a nivel del LFP y de la actividad conjunta de múltiples unidades ya analizados, proveyendo evidencia adicional de la relación entre el LFP y la actividad de neuronas individuales en HVC. Aunque un análisis robusto de estas predicciones requiere de la actividad de un mayor número de neuronas, los ejemplos particulares que se muestran en las siguientes sub-secciones corresponden a la evidencia experimental hallada hasta el momento. El análisis se focalizó en sílabas del tipo P0, ya que como se vio hasta el momento, estas sílabas maximizan las diferencias entre las predicciones de la “hipótesis del reloj” y el modelo circular.

Pulsátiles (P1b)

- La existencia de ráfagas breves de actividad al comienzo de un pulso espiratorio del tipo pulsátil.

Esta fue una de las predicciones del modelo mostradas en la introducción. En Figura 5.13 se muestran los resultados obtenidos para un grupo bien separado en un protocolo analizado (Csb039-VioAma). Para las subfiguras (a-c), la organización es la siguiente: panel superior, sonograma del estímulo presentado; panel medio: histograma de la respuesta para los 20 ensayos de presentación del estímulo, tamaño de columnas temporales: 25 ms; panel inferior: los eventos detectados en la respuesta para este grupo luego del proceso de clasificación de espigas. En este último panel, cada línea vertical roja corresponde a la ocurrencia de una espiga (potencial de acción medido de manera extracelular). El eje vertical representa el número de ensayo, y el eje horizontal el tiempo. En (a) se muestra la respuesta al canto propio del ave. **Notar que existen instancias marcadas de excitación** (los 3 picos en el histograma de actividad), que surgen de eventos de disparo alineados para distintos ensayos. Durante el resto del tiempo, esta neurona presenta una baja tasa de actividad basal. **Cada uno de los picos de excitación ocurre en la cercanía del comienzo de una frase de sílabas pulsátiles.** Los asteriscos coloreados marcan estas instancias, cuyo detalle puede verse en (f). Notar adicionalmente que esta neurona presenta una respuesta selectiva, dado que no presenta instancias de disparo similares durante presentaciones del canto de un macho adulto conespecífico (b, CON) o el canto propio en reversa (c, REV). En (d) se muestran superpuestas y alineadas al evento central 500 espigas tomadas al azar entre las espigas del grupo. Las espigas mostradas corresponden a los canales de mayor amplitud en los que se detectaron eventos de este grupo. Para cada canal, la línea naranja muestra la forma promedio de espiga y las líneas grises muestran la banda de $\pm SD$. El número de sitio mostrado a la izquierda está medido desde la punta de la sonda multielectrodo (sitio # 1 corresponde al sitio más profundo). En (e) se muestra el autocorrelograma normalizado del grupo, mostrando una buena separación (cuentas nulas cerca del origen significa que no hay contaminación de más de una neurona en el grupo debido a que no se viola el período refractario). Adicionalmente,

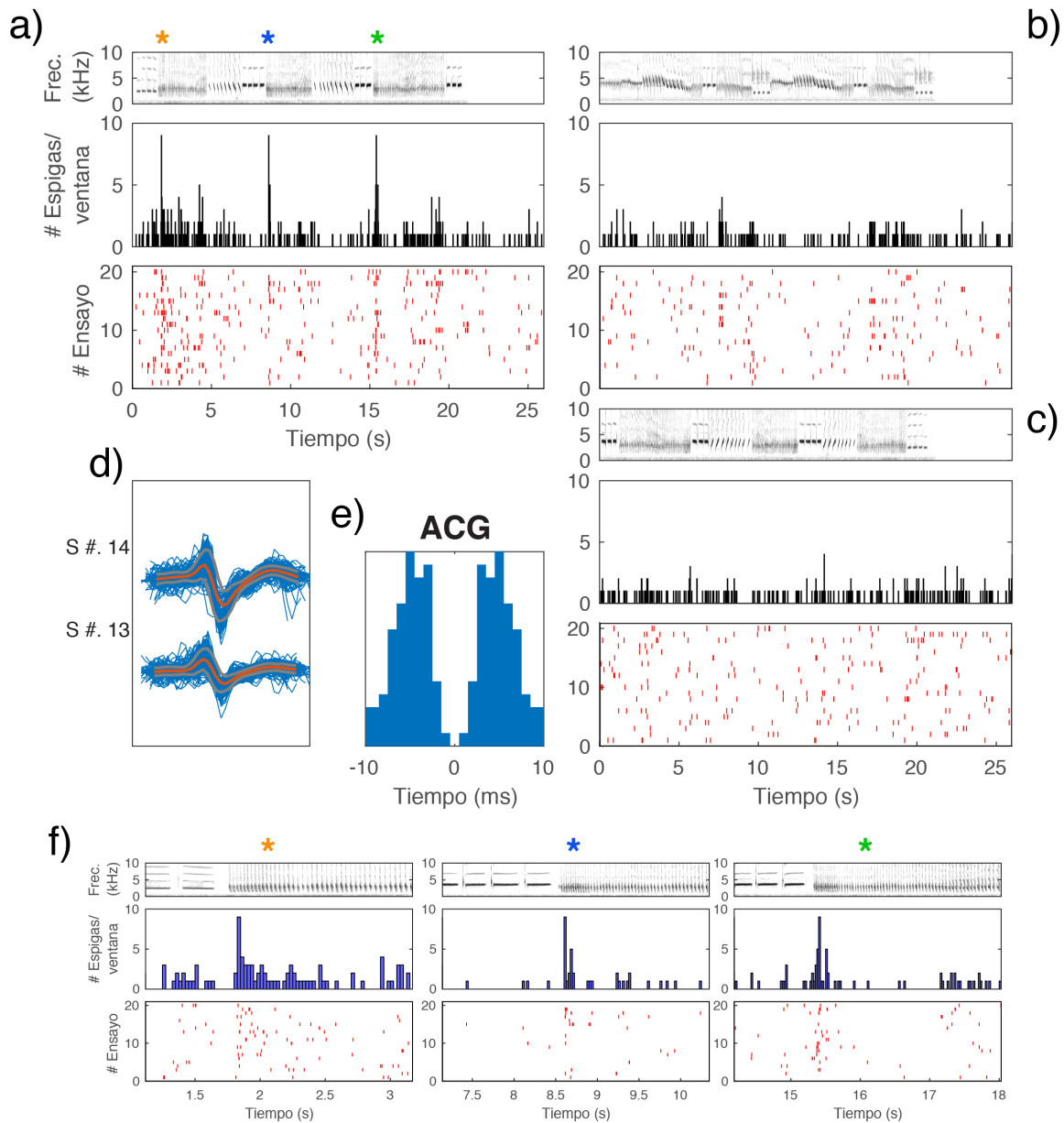


Figura 5.13: Disparo en los comienzos de una frase del tipo pulsátil (P1b). Ejemplo de la actividad de una neurona aislada de un registro correspondiente a Csb039-VioAma. (a-c) Estudio de la respuesta ante los estímulos presentados. La organización para las 3 subfiguras es la siguiente: panel superior, sonograma del estímulo presentado; panel medio: histograma de 25 ms de la respuesta para los 20 ensayos; panel inferior: eventos de disparo de la neurona clasificada; eje vertical: número de ensayo, eje horizontal: tiempo. Notar la respuesta selectiva al canto propio, dada por los picos de actividad presentes en el histograma. Los asteriscos marcan las 3 instancias de disparo de esta neurona durante el canto, detalladas en (f). d) Superposición de una muestra al azar de 500 espigas del grupo (alineadas al evento central). Línea sólida: valor medio de las espigas del grupo; líneas grises, $\pm SD$. Se muestran los sitios de mayor amplitud para el grupo, y el número de sitio en la sonda se indica a la izquierda (sitio # 1 es el sitio más profundo).

después de un período de aproximadamente 7 ms, el autocorrelograma disminuye, indicando una baja actividad basal, como se ve de las respuestas analizadas en (a-c). Por último, en (f) se muestran ampliaciones de las instancias de disparo marcadas en (a). **La neurona analizada presenta especificidad de la instancia reportada** (los comienzos de frases pulsátiles en el canto). Para sílabas del tipo pulsátil, se tiene un ejemplo adicional de una neurona individual con instancias de activación en respuesta a estas sílabas. Por este motivo, no se realizó un análisis agrupado. Sin embargo, entre los resultados discutidos en *El LFP indica transiciones entre frases de canto* (Subsección 4.3.C) y los ejemplos encontrados en neuronas individuales se tienen indicios de que el comienzo de estas frases podrían, en efecto, estar siendo codificadas por las neuronas de HVC.

Oscilaciones (P1)

- Para las sílabas del tipo pulsátil y P1, puede existir un refuerzo periódico de la actividad en HVC con cada sílaba de la frase, además del pulso inicial.

Para sílabas del tipo P1, las oscilaciones fueron descritas a nivel del LFP en Capítulo 4 y a nivel de la actividad multiunidad. **En Figura 5.14 se muestran los datos de una neurona individual que presenta oscilaciones.** La figura está organizada como Figura 5.13, salvo que en este caso se tiene una sola ampliación de la actividad en f), correspondiente a la frase P1 a la cual responde esta neurona. Como en el caso anterior, la respuesta es selectiva al canto propio y el grupo está bien aislado observando el autocorrelograma. En la ampliación en (f) puede verse la naturaleza oscilatoria de la respuesta (patrón marcado de excitación-inhibición, sincronizado en fase con las sílabas P1). Las líneas punteadas marcan el fin de la inhibición, y **puede observarse que la fase en la cual ocurren estos picos respecto del comienzo de la sílaba es aproximadamente constante durante la duración de la frase.** Adicionalmente, notar tanto en (a) como en (f) la inhibición post-respuesta que presenta la neurona. Como en el caso de las pulsátiles, no se realizó un análisis agrupado de respuesta debido a que no se lograron aislar hasta el momento neuronas adicionales que respondan ante sílabas P1.

Oscilaciones (P2)

- La existencia de ráfagas de actividad sincronizada bilateralmente, ocurriendo con un retraso de unas pocas decenas de milisegundos respecto del inicio de cada sílaba P2.

En las sílabas del tipo P2 también existen oscilaciones a la frecuencia silábica, como pudo verse en Figura 4.19 en *Resultados agrupados* (Subsección 4.3.G). Sin embargo, no se realizó un análisis de datos agrupados para estas sílabas, debido a que los ejemplos de LFP encontrados con respuesta robusta corresponden a frases P2 de un solo ave y, entre las sílabas analizadas

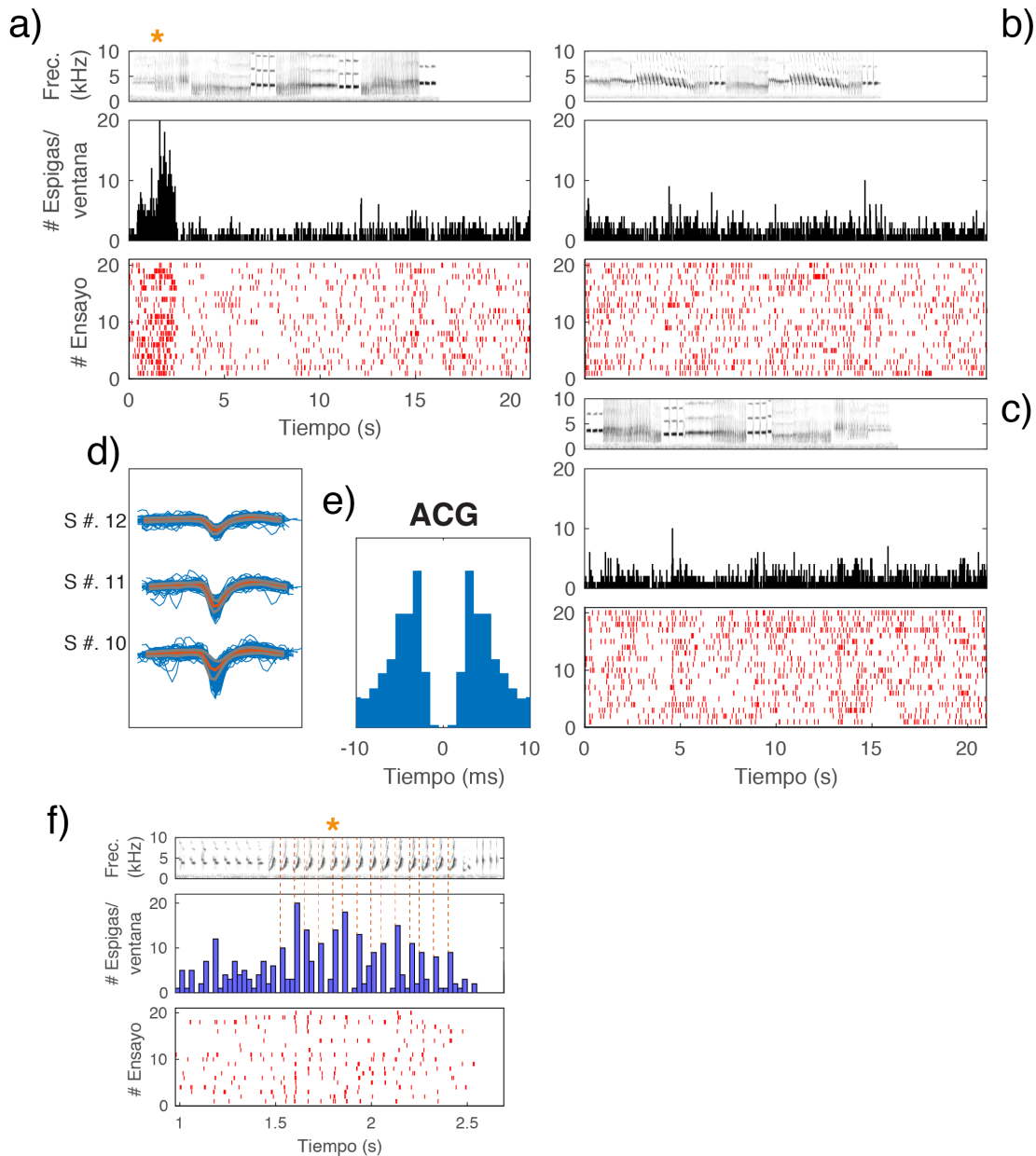


Figura 5.14: Disparo periódico en respuesta a una frase de sílabas del tipo P1. Ejemplo de la actividad de una neurona aislada de un registro correspondiente a Csb103-VeVio. (a-c) Estudio de la respuesta ante los estímulos presentados. La organización para las 3 subfiguras es la siguiente: panel superior, sonograma del estímulo presentado; panel medio: histograma de 25 ms de la respuesta para los 20 ensayos; panel inferior: eventos de disparo de la neurona clasificada; eje vertical: número de ensayo, eje horizontal: tiempo. Notar la respuesta selectiva al canto propio, dada por los picos de actividad presentes en el histograma. Los asteriscos marcan las 3 instancias de disparo de esta neurona durante el canto, detalladas en (f). d) Superposición de una muestra al azar de 500 espigas del grupo (alineadas al evento central). Línea sólida: valor medio de las espigas del grupo; líneas grises, $\pm SD$. Se muestran los sitios de mayor amplitud para el grupo, y el número de sitio en la sonda se indica a la izquierda (sitio # 1 es el sitio más profundo).

son las que presentan mayor variación en términos de la estructura interna de cada sílaba. En la respuesta a nivel de neuronas únicas también se observan este tipo de oscilaciones sincronizadas en fase con la presentación del canto. Un ejemplo aislado puede verse en Figura 5.15, con datos correspondientes a un protocolo de un ave (Caa483-AmAm), para la cual no se tienen datos medidos del LFP. La figura está organizada de la misma manera que Figura 5.13 y Figura 5.14. La neurona aislada es selectiva a presentaciones del canto propio y muestra respuesta sólo durante una de las frases del canto, correspondiente a una frase de sílabas del tipo P2. Como puede apreciarse, esta neurona también presenta una baja tasa de actividad basal y una respuesta del tipo fásica, mostrando un patrón de excitación bien marcado. En la ampliación en (f) puede apreciarse la presencia de un pico de actividad por cada sílaba de la frase, retrasado respecto del inicio de la sílaba.

Sílabas tipo P0

- La existencia de ráfagas de actividad sincronizada bilateralmente, ocurriendo con un retraso de unas pocas decenas de milisegundos respecto del inicio de cada sílaba P0.

Las sílabas del tipo P0 presentan características altamente estereotipadas entre los cantos de distintos individuos. **Para este tipo de sílabas, además, se obtuvieron las respuestas de mayor magnitud en el potencial de campo local**, dada por los mínimos de mayor prominencia en la señal (Capítulo 4). **Adicionalmente, esto se reflejó en el disparo de potenciales de acción de múltiples neuronas para cada protocolo (Capítulo 5)**, y en Subsección 5.3.D se mostraron las respuestas al canto propio de múltiples neuronas aisladas para un protocolo, en las cuales puede verse que la actividad está altamente sincronizada para ciertas instancias significativas en el registro. En Figura 5.16 se muestra un ejemplo de la actividad de una neurona bien aislada por el algoritmo de clasificación de espigas. Estos datos corresponden a Csb039-VioAma, un animal distinto a los registros mostrados en Subsección 5.3.D. En Figura 5.16 existe una leve respuesta a sílabas del tipo P0 del canto conespecífico, pero esta respuesta es de menor amplitud que para el canto propio. Adicionalmente de la baja tasa de disparo espontánea y la buena separación mostrada en los autocorrelogramas, prestar atención a los detalles en (f), donde puede verse que **existe una instancia de activación marcada cerca del comienzo de la sílaba**, pero luego la actividad de la neurona es inhibida o regresa a la actividad basal antes de presentar otro pico de activación al comienzo de la siguiente sílaba P0.

En las sílabas tipo P0 es donde mayor número de unidades pudo aislarse correctamente (10 neuronas para los datos correspondientes a los animales cuyos protocolos fueron analizados en Capítulo 4 y en este capítulo). Para el conjunto de neuronas aisladas (correspondientes a datos de Csb103-VeVio y Csb039-VioAma), **se realizó un análisis agrupado de la respuesta**, como se

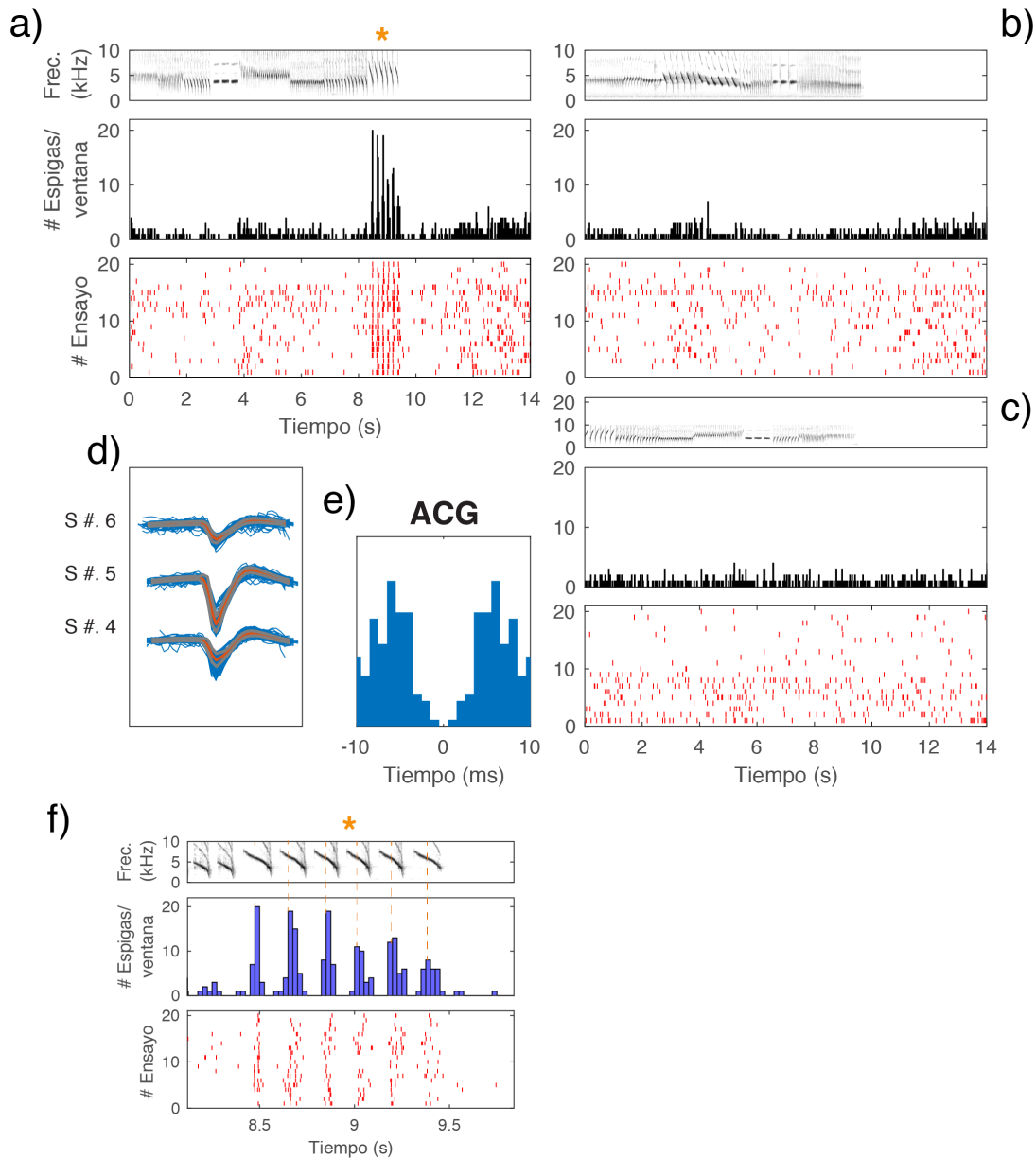


Figura 5.15: Disparo periódico en respuesta a una frase de sílabas del tipo P2. Ejemplo de la actividad de una neurona aislada de un registro correspondiente a Caa483-AmAm (animal para el cual no se tienen datos del LFP). (a-c) Estudio de la respuesta ante los estímulos presentados. La organización para las 3 sub-figuras es la siguiente: panel superior, sonograma del estímulo presentado; panel medio: histograma de 25 ms de la respuesta para los 20 ensayos; panel inferior: eventos de disparo de la neurona clasificada; eje vertical: número de ensayo, eje horizontal: tiempo. Notar la respuesta selectiva al canto propio, dada por los picos de actividad presentes en el histograma. Los asteriscos marcan la instancia de respuesta, detallada en (f). d) Superposición de una muestra al azar de 500 espigas del grupo (alineadas al evento central). Línea sólida: valor medio de las espigas del grupo; líneas grises, $\pm SD$. Se muestran los sitios de mayor amplitud para el grupo, y el número de sitio en la sonda se indica a la izquierda (sitio # 1 es el sitio más profundo).

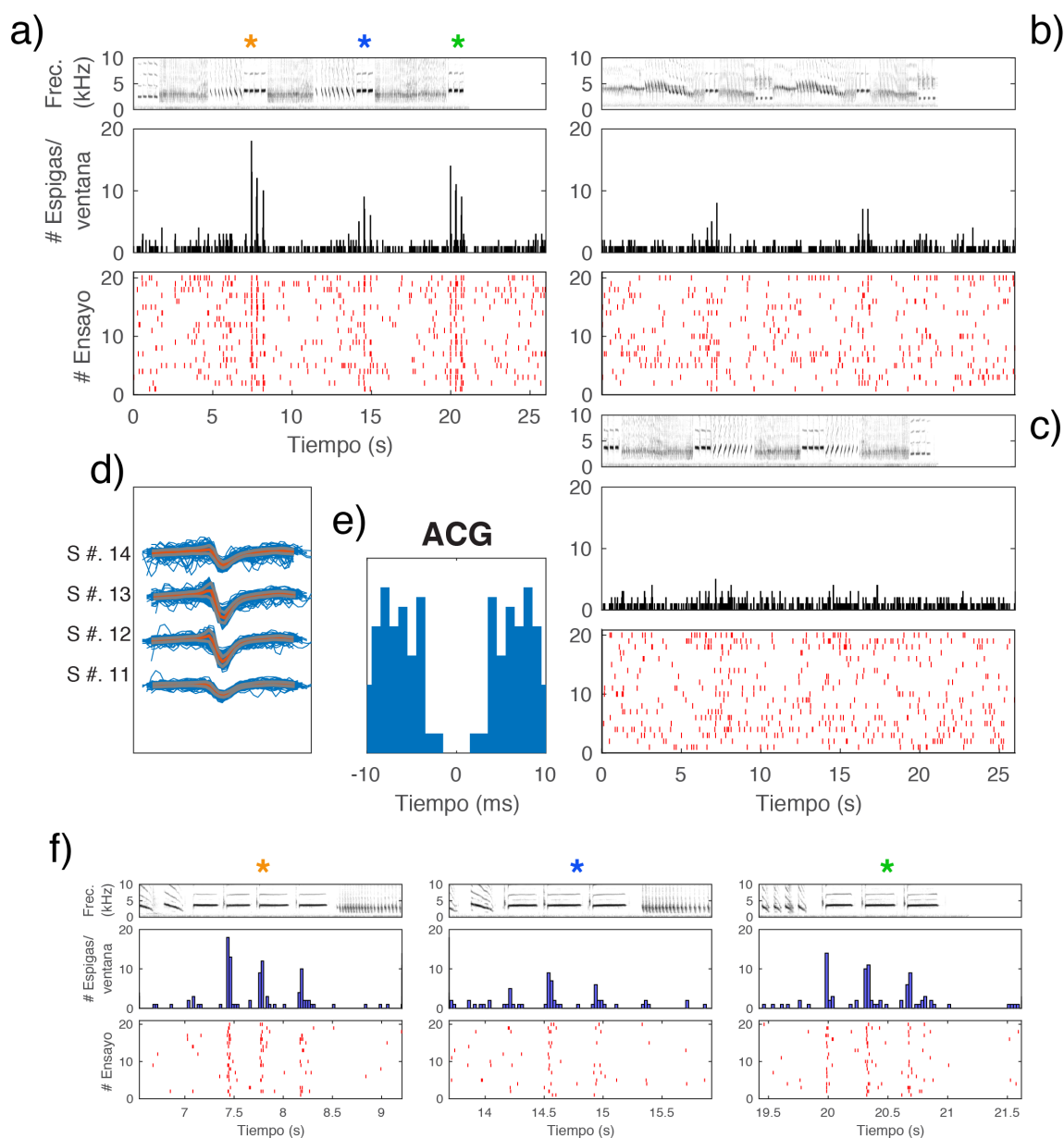


Figura 5.16: Disparo periódico en respuesta a una frase de sílabas del tipo P0. Ejemplo de la actividad de una neurona aislada de un registro correspondiente a Csb039-VioAma. (a-c) Estudio de la respuesta ante los estímulos presentados. La organización para las 3 sub-figuras es la siguiente: panel superior, sonograma del estímulo presentado; panel medio: histograma de 25 ms de la respuesta para los 20 ensayos; panel inferior: eventos de disparo de la neurona clasificada; eje vertical: número de ensayo, eje horizontal: tiempo. Notar la respuesta selectiva al canto propio, dada por los picos de actividad presentes en el histograma. Los asteriscos marcan las 3 instancias de disparo a frases del tipo P0 de esta neurona durante el canto, detalladas en (f). d) Superposición de una muestra al azar de 500 espigas del grupo (alineadas al evento central). Línea sólida: valor medio de las espigas del grupo; líneas grises, $\pm SD$. Se muestran los sitios de mayor amplitud para el grupo, y el número de sitio en la sonda se indica a la izquierda (sitio # 1 es el sitio más profundo).

muestra en Figura 5.17. Para representar la actividad promedio de cada neurona, se construyeron histogramas de actividad y se alineó la respuesta respecto al inicio de cada sílaba de la frase.

La respuesta a cada frase fue normalizada por la cantidad de cuentas en el histograma, de modo que la respuesta queda representada por la probabilidad de disparo de la neurona a lo largo de las sílabas en la frase. Por último, **se calculó la probabilidad promediada entre todas las respuestas de todas las neuronas a partir de promediar estos histogramas**. En Figura 5.17(a) se muestran las señales de sonido normalizadas y superpuestas de las sílabas P0 correspondientes a las frases en las que las neuronas aisladas presentaron respuesta. La línea sólida negra es la envolvente promedio de las señales de sonido, también normalizada y verticalmente desplazada. En (b) se muestra la probabilidad de disparo conjunta entre las 10 neuronas aisladas, construida a partir del promedio de las probabilidades para cada caso individual, mostrado en (c). **Cada línea en (c) corresponde al histograma de respuesta promediado para cada frase**, y a la izquierda la etiqueta que indica el ave y el grupo neuronal que se está analizando. Una etiqueta con doble número (p. ej., Csb039 - 123 365) indica la unión de dos grupos neuronales tras la etapa de supervisión manual en la clasificación de espigas. **Las respuestas, discretizadas en columnas de 15 ms, se presentan con una escala de colores normalizada al pico máximo** (ver escala a la derecha). Notar que existe variación en los tipos de respuesta: algunas neuronas presentan un pico de activación marcado y localizado temporalmente (por ej., Csb039–228), mientras que otras presentan un pico de actividad y un decaimiento más lento, que hace que la actividad sea más dispersa durante la duración de la sílaba (por ej., Csb103–425). **Es notable que los picos de máxima actividad se presentan en instancias comparables para todas las neuronas analizadas**, lo cual resulta en una distribución unimodal de la probabilidad promediada entre todas las actividades.

Notar que ninguna neurona presentó un pico de actividad máximo para valores de tiempo mayores a 100 ms respecto del inicio silábico. En (d) se muestra el histograma representado en (b), donde puede apreciarse un pico de activación en 60 ± 30 ms, con una columna máxima en 45 – 60 ms. La cola de la distribución hace que el valor medio esté corrido de este pico máximo, en 115 ms, con un desvío estándar de 28 ms. La mediana de la distribución, en cambio, es de 83 ms, en mayor acuerdo con la instancia marcada por el pico de actividad. En (e) y (f) se muestran los histogramas de eventos detectados por umbral como un pico máximo en MUA (e) y un mínimo en el LFP (f) (mostrados en *Promediado en eventos* (Sección 5.3.C)). **Notar la similitud entre las distribuciones, en particular para la ocurrencia del pico en los histogramas**. Al comparar los valores medios de las distribuciones con una prueba t de dos muestras, no puede rechazarse la hipótesis nula de que estos valores sean comparables ($p = 0,43$ para la comparación entre (d) y (f) y $p = 0,25$ para la comparación entre (d) y (e)).

Lo que estos resultados muestran, en adición a la actividad neuronal dada por un perfil multiunidad, es que existe una relación entre las instancias robustas medidas en el LFP y

la actividad de neuronas individuales en HVC. Adicionalmente, el perfil de actividad MUA reporta las mismas instancias de activación, lo cual da cuenta de la actividad sincronizada de múltiples neuronas en la respuesta a este tipo de sílabas. El histograma en (d) presenta un pico de actividad en la cercanía del inicio de la sílaba, con un retraso por debajo de los 100 ms. En términos de la envolvente promedio, y de la superposición de sílabas mostrada en (a), estas instancias de activación están en la cercanía del inicio de la segunda parte del gesto motor en P0s.

De las predicciones realizadas por el modelo circular, la realizada sobre sílabas del tipo P0 quizás sea la más fácilmente refutable. Esto se debe a que si la actividad de las neuronas en HVC formaran la cadena de tiempo del canto, debería ser relativamente sencillo obtener ejemplos de instancias de activación marcadas de neuronas de HVC distribuidos durante toda la duración de las sílabas de este tipo, por ser las sílabas más largas del repertorio de los canarios. Mientras que, bajo la hipótesis del modelo circular de que en HVC hay codificada información sobre instancias motoras específicas, la actividad debería estar agrupada en ráfagas de disparo cerca del comienzo de la sílaba. **En los datos registrados y analizados hasta el momento, se observó el disparo sincronizado de múltiples neuronas a nivel individual, MUA y, como medida novedosa, a nivel del LFP en un entorno de instancias motoras relacionadas con el canto.** En otras palabras, no se encontró nada similar a una distribución uniforme en las instancias de respuesta en el núcleo neuronal HVC, en ninguno de los análisis presentes en esta tesis. Esto es así incluso con datos de múltiples sitios en HVC, datos registrados en HVC izquierdo y derecho, y datos de HVC de múltiples aves.

Los resultados dados por las 3 distribuciones muestran que la actividad no está uniformemente distribuida a lo largo de la sílaba (test de Kolmogorov-Smirnov contra una distribución uniforme, $p = 5,4 \times 10^{-22}$ para los datos del LFP, $p = 1,4 \times 10^{-14}$ para los datos de los picos detectados en el perfil MUA y $p = 6,5 \times 10^{-24}$ para los valores medios de la ubicación del máximo de probabilidad de disparo que dan lugar al histograma en (b) y (d)). **Esto está en acuerdo con las predicciones realizadas por el modelo circular, y rechaza la hipótesis del reloj.** La respuesta auditiva en HVC constituye evidencia indirecta respecto de las instancias de actividad en HVC durante la producción motora. Por este motivo, aunque estos resultados sientan una base de resultados compatibles con las predicciones realizadas, una evaluación más profunda de las predicciones necesitará estudiar la actividad mientras el animal está cantando.

En estudios previos (Markowitz et al., 2015), se describió que la presencia de una actividad rítmica en el LFP podría estar siendo generada por el disparo sincrónico de distintas subpoblaciones de neuronas del núcleo. En los resultados aquí mostrados, se encontró la presencia oscilaciones de la actividad e instancias de disparo sincrónico relacionadas con instancias motoras. Sin embargo, el rol de las distintas corrientes sinápticas que generan este comportamiento debe ser aún estudiado para establecer el rol de las distintas subpoblaciones neuronales de HVC.

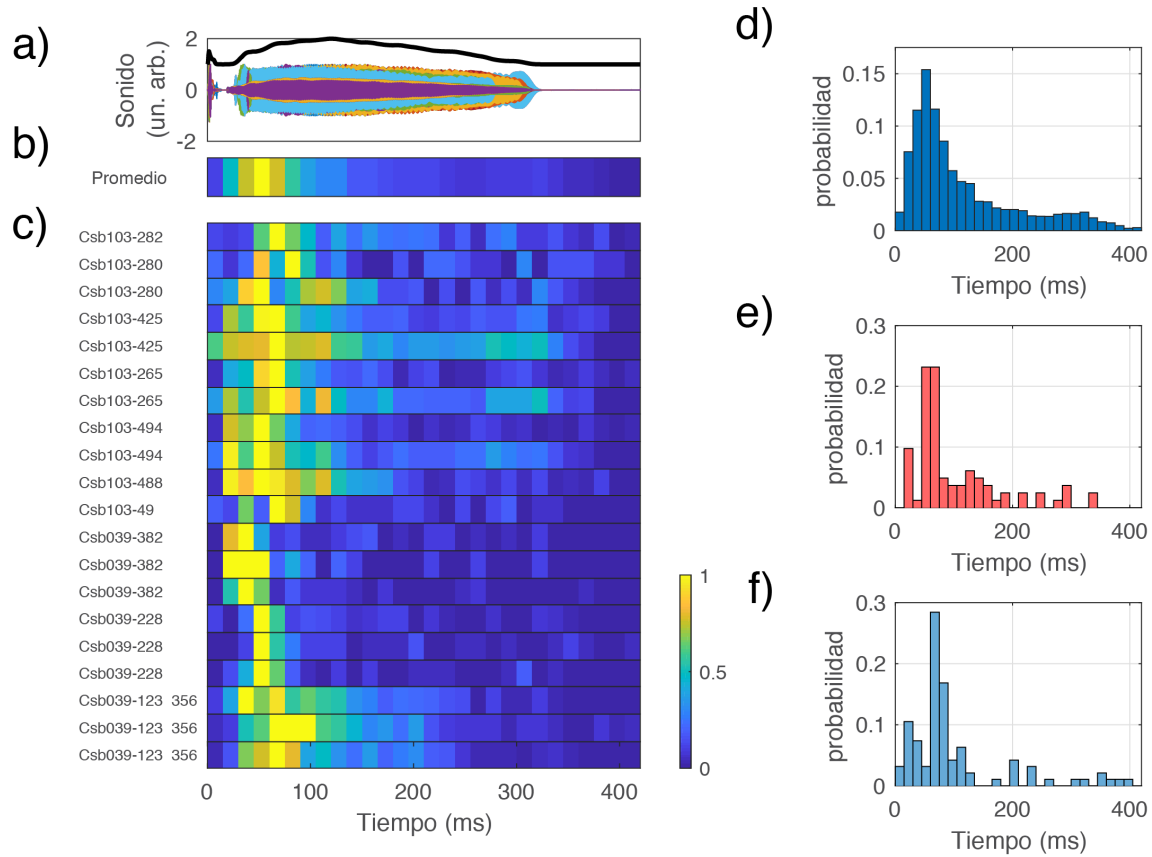


Figura 5.17: Actividad agrupada de 10 neuronas individuales separadas a partir del algoritmo de clasificación de espigas. Datos provenientes de protocolos de 2 aves distintas (Csb039-VioAma) y (Csb103-VeVio), para un total de 20 instancias de respuesta a frases. (a) Señales de sonido superpuestas, correspondientes a las sílabas que generaron respuestas en neuronas de HVC como parte de los cantos presentados. Las señales fueron normalizadas y se calculó la envolvente promedio (línea sólida en negro, desplazada verticalmente). (b) Probabilidad promedio de disparo para todas las neuronas agrupadas, mostrado con una escala de color normalizada al pico máximo (escala mostrada a la derecha). (c) Histogramas de actividad promedio para una frase, mostrados en escala de color. Los histogramas fueron computados con columnas temporales de 15 ms y normalizados por la cantidad de cuentas en cada histograma para poder promediar los datos entre distintas neuronas y generar el histograma de probabilidades mostrado en (b). Cada histograma corresponde a una serie de datos en el eje horizontal. Una misma neurona pudo presentar disparos a distintas frases de P0 en el canto (indicado por dos líneas de datos consecutivas con la misma etiqueta), y en los datos del mismo animal la respuesta de múltiples neuronas puede ocurrir para la misma frase, como mostrado en Subsección 5.3.D. (d) histograma mostrado en (b) con escala de colores. Notar que la probabilidad de disparo promedio presenta un pico marcado por debajo de los 100 ms, y luego un decaimiento progresivo de la actividad durante el resto del período intersilábico. (e) y (f) son los histogramas de eventos detectados por umbral sobre las señales dadas por el perfil de actividad MUA (e) y el LFP (f). Para la cuantificación de la similitud entre las distribuciones, ver texto.

El resultado de que los LFP en HVC capturan la actividad sincronizada de múltiples neuronas permite emplear esta medida de la actividad neuronal como indicadora de instancias robustas de activación en respuesta al canto en HVC. **A futuro, sería de especial interés poder establecer esta misma relación en experimentos con animales comportándose.** Esto, adicionalmente, podría permitir estudiar la actividad en una escala macroscópica en distintos núcleos en simultáneo, y estudiar de esta manera cómo se relaciona la actividad entre las distintas zonas del cerebro a partir de los LFP y no sólo a partir de la actividad de neuronas individuales, como ha sido el foco del campo hasta el momento. Estudiar la información en conjunto de la actividad neuronal y el LFP puede aportar, adicionalmente, nuevas perspectivas respecto del rol de subpoblaciones de neuronas en HVC en la codificación del canto.

5.4. Discusiones

En este capítulo se profundizó el análisis de los experimentos que dieron lugar en Capítulo 4 a la descripción de la respuesta en términos del potencial de campo local o LFP. La motivación central de este capítulo fue estudiar la relación de los LFP en el núcleo HVC con la actividad de las neuronas del núcleo. Al ser señales de mayor amplitud y representar el límite inferior en términos de la banda espectral de los registros, los LFP no se atenúan de manera tan pronunciada en el medio extracelular como los potenciales de acción. Esto se debe a las propiedades de filtrado pasa-bajos del medio extracelular (Bédard et al., 2006; Buzsáki et al., 2012). Por este motivo, la relación con la actividad en el núcleo podría, en principio, no ser ubicua: los LFP podrían representar actividad a gran escala no correlacionada directamente con las neuronas en el mismo volumen, e incluso podría tratarse de una onda viajera de actividad, como ha sido descrito en otros sistemas animales (Lubenov & Siapas, 2009; Zanos et al., 2015).

La caracterización realizada en este capítulo, sin embargo, muestra evidencias de que los LFP analizados en el capítulo anterior **están intrínsecamente relacionados con la actividad de las neuronas en el volumen estudiado.** Establecer esta relación fue crucial para poder interpretar los resultados obtenidos y la relevancia del LFP en la codificación neuronal del canto. En este capítulo, la comparación entre el LFP y la actividad neuronal se estableció a través de distintas etapas de análisis. El primer desafío fue obtener un observable a partir de los registros que permitiera evaluar la actividad de las neuronas en una escala similar a la del el potencial de campo local. Esta medida estuvo dada por el perfil de actividad multiunidad (MUA), recuperado de las señales de datos sin procesar a partir de un filtrado pasa-altos y de la detección de los eventos neuronales en el registro. Como los LFP_{avg} estudiados en Capítulo 4, el perfil MUA también fue una medida promediada en los ensayos de presentación del canto. **De esta manera, ambas medidas recuperan, en distintas componentes de la señal, la respuesta emergente entre todos los ensayos.**

Las primeras cuantificaciones mostradas en este capítulo correspondieron a la evaluación de la extensión y correlación espacial de la actividad entre distintos canales. Como se mostró, la distancia de correlación para el LFP fue mayor que para el caso de la actividad medida a partir de los perfiles MUA, con valor promedio de $385 \pm 125 \mu\text{m}$ para el LFP contra $285 \pm 50 \mu\text{m}$ para la actividad MUA. A pesar de la mayor extensión en el LFP, este análisis mostró que existe una co-localización y co-variación de la amplitud de las señales, **dando así los primeros indicios de que la actividad medida en el LFP tiene su correspondencia con la actividad sincronizada de múltiples neuronas.**

Más aún, el análisis de la actividad neuronal provisto por los perfiles MUA permitió recuperar cada uno de los resultados obtenidos para el LFP en el capítulo anterior. En particular, se vio que existen segmentos en los cuales la correlación temporal entre las señales es significativa. En primer lugar, se mostró que a nivel de la actividad multiunidad también se encuentran instancias correspondientes a las transiciones entre frases. Estas instancias, de gran interés debido a la estructura del canto de los canarios, **surgen entonces de la actividad sincronizada de las neuronas en la región explorada del núcleo HVC.** Adicionalmente, también se recuperaron las oscilaciones observadas en el LFP a partir de los perfiles MUA, con ejemplos para los distintos tipos silábicos del repertorio de cantos de canarios. A pesar de que se ha propuesto que HVC (en diamantes mandarines) no tiene una organización topográfica y que sus neuronas forman redes interconectadas que tienen la representación de múltiples sílabas del canto (Peh et al., 2015), resulta curioso que existen frases de canto para las cuales no se registró respuesta alguna.

Como en el LFP, el perfil MUA también reportó el agrupamiento de instancias marcadas de excitación en un entorno de instancias de codificación motora. En particular, se evaluaron datos agrupados de dos tipos silábicos: las sílabas tipo P1 y las P0, que constituyen el marco de mayor relevancia en términos de estudiar las predicciones del modelo circular. Tanto para ejemplos particulares, como para los datos agrupados de todas las instancias de respuesta observadas para estos dos tipos silábicos, se encontró que el LFP y la actividad MUA presentan las mismas características de codificación en la respuesta. Para sílabas del tipo P1, los picos de activación y los mínimos del LFP coinciden de manera robusta, con una actividad que en términos del modelo circular puede interpretarse como un refuerzo periódico para la generación de los gestos de presión (Alonso et al., 2016).

El resultado más robusto viene de la mano de las sílabas del tipo P0, para las cuales en las respuestas de múltiples animales se observó actividad en la cercanía del inicio silábico, con mínimos del LFP y máximos de la actividad MUA agrupados en las mismas instancias. El agrupamiento de datos provenientes de distintos animales **es un resultado directo de la estrategia del cambio de especie**, debido a que los gestos motores subyacentes para los distintos tipos de sílabas pueden ser clasificados en cuatro grandes familias que comparten características cualitativas.

La relación hallada entre LFP y actividad MUA tiene serias implicancias para el estudio de

la codificación neuronal del canto en el núcleo HVC. En primer lugar, marca la existencia de patrones de actividad con una característica no descrita anteriormente; lo que estos resultados muestran es que a nivel de actividad multiunidad y del LFP existe una actividad periódica para cada sílaba en el interior de una frase. El origen de esta oscilación requiere considerar el tipo de poblaciones neuronales que podrían estar impulsándola. En diamantes mandarines, las oscilaciones a nivel de los LFP medidos en rebanadas *in vitro* está influenciada por la interacción de la actividad de excitación e inhibición (Solis & Perkel, 2005). En este trabajo, los autores reportaron la presencia de patrones fásicos de inhibición a las neuronas excitatorias que, a su vez, generan un patrón de excitación estereotipado. Un estudio *in vivo* mostró que este es el caso para un tipo de oscilaciones observadas, conformadas por la actividad excitadora de neuronas proyectoras (posiblemente a área X) e interneuronas en el núcleo HVC, disparando en distintas fases de un ritmo de 30 Hz (Markowitz et al., 2015). El rol de la interacción balanceada de excitación e inhibición también ha sido propuesto en otros sistemas (Buzsáki et al., 2012). Este estudio previo no discutió respecto de los tiempos de disparo de las neuronas proyectoras al núcleo RA (involucradas en la producción de los comandos motores). En diamantes mandarines, las neuronas proyectoras al núcleo RA disparan una única ráfaga precisa de actividad del motivo del canto, mientras que las neuronas proyectoras a área X pueden mostrar ráfagas en más de una instancia a lo largo del canto (Hahnloser et al., 2002; Mooney, 2000).

La principal diferencia con el caso de canarios es que las múltiples ráfagas que terminan formando una oscilación en la respuesta ocurren de manera rítmica y con una fase específica en el interior de cada frase, donde las unidades del canto (sílabas) comparten similitudes en el gesto motor. Por este motivo, no puede descartarse que el fenómeno observado en diamantes mandarines de una única instancia de disparo por parte de las neuronas proyectoras a RA se vea reflejado como múltiples disparos específicos ante la repetición de sílabas en el caso de los canarios. Por ejemplo, para un caso aislado de respuesta ante sílabas del tipo P1, se encontró que la respuesta de la neurona estuvo confinada **sólo a una frase** del canto, por lo cual es posible que sólo esté involucrada en la codificación de las sílabas de esa frase (una “instancia” dentro del canto). En cambio, si en vez de ser neuronas proyectoras a RA resultara que son las proyectoras a área X las involucradas en estas oscilaciones, entonces el rol de una señal como la medida a nivel del LFP podría, en principio, representar la modulación de la actividad transmitida por el núcleo HVC hacia la vía del prosencéfalo anterior, como parte del procesamiento de la respuesta auditiva (Doupe & Heisenberg, 2000).

A futuro, es necesario poder discernir la identidad de las neuronas que influyen a las oscilaciones en término de sus proyecciones utilizando técnicas de identificación como la estimulación antidrómica. Esta información resulta crucial para poder interpretar con mayor precisión los resultados hallados.

A pesar de esta dificultad, cabe remarcar que **la actividad no está uniformemente distribui-**

da, lo cual desafía enormemente a la clásica hipótesis del reloj, la cual predice que la actividad del núcleo telencefálico HVC consiste en una representación continua, conformando la cadena del tiempo del canto. Para profundizar aún más este resultado, se aislaron de los registros neuronas individuales que presentaron respuesta a sílabas del tipo P0. En las neuronas individuales estudiadas hasta el momento, se observó el mismo fenómeno de agrupamiento en términos de una instancia en la cercanía del comienzo de la sílaba. Este fenómeno resulta sorprendente, dado que si la hipótesis del reloj fuera cierta, debería ser relativamente sencillo encontrar múltiples neuronas cuyos picos de actividad estuvieran distribuidos durante toda la duración de las sílabas, en particular para las P0 que presentan un período silábico de 350–400 ms. Ninguna de las neuronas registradas presentó un pico de actividad más allá de los 100 ms respecto del inicio silábico y, como se vio en la sección anterior, al agrupar los datos de las múltiples neuronas individuales se recupera un resultado compatible con lo observado a gran escala en el LFP y en la actividad MUA.

En conjunto, los resultados de este capítulo y el anterior permiten establecer al LFP en el núcleo HVC como una medida relevante a escala mesoscópica, que reporta la codificación de instancias relacionadas con los disparos de múltiples neuronas de manera sincronizada. Esto abre numerosas posibilidades a futuro. Estudios de los LFP en animales cantando puede proveer mayor intuición respecto de algunas características de la respuesta observada en animales anestesiados. Por ejemplo, si la fase respecto del inicio silábico en que se encuentran los picos de activación se mantiene o si la respuesta auditiva estudiada tiene un retraso adicional. Adicionalmente, los estudios en animales cantando también pueden valerse de la medida del LFP para realizar registros neuronales en múltiples núcleos neuronales en simultáneo. Por último, este tipo de registros, de la mano de modelos de baja dimensión como el modelo circular pueden representar un cambio de paradigma en cómo se aborda el problema de la codificación sensorimotora. Las neurociencias pueden valerse de medidas de actividad a gran escala y del modelado de baja dimensión. Las predicciones realizadas con estos modelos son contrastables, marcando el camino a trazos gruesos que permite luego estudiar la actividad al nivel de detalle de neuronas individuales. El camino inverso, en cambio, ha demostrado ser confuso, haciendo que la discusión sobre el funcionamiento del núcleo esté dada por la extrapolación de la actividad medida de unas pocas neuronas. El LFP, en este caso, puede demostrar ser el eslabón faltante de la cadena entre la visión clásica dada por la descripción de las neuronas individuales y el comportamiento macroscópico (el canto), que requiere de la coordinación de múltiples sistemas sensoriales y motores.

Conclusiones

El trabajo contenido en esta tesis consolida el comienzo de nuevas líneas experimentales en el Laboratorio de Sistemas Dinámicos (DF, FCEyN, UBA). Mi perspectiva en el estudio de la codificación neuronal del canto en aves tiene como objetivo principal dilucidar la relación entre la actividad en distintas zonas del cerebro y las instrucciones motoras que impulsan el comportamiento a nivel de la biomecánica del órgano fonador. En esta dirección, los experimentos de electrofisiología en aves anestesiadas proveen una poderosa herramienta para estudiar la codificación neuronal del canto.

El diamante mandarín es una de las especies más ampliamente utilizada en este tipo de estudios, debido a su canto altamente estereotipado durante la vida adulta y a la facilidad de utilización como animal de estudio, entre otros motivos. En el estudio de la arquitectura conocida como el “sistema neuronal del canto” (conjunto de núcleos dedicados al aprendizaje, producción y mantenimiento del canto adulto), el núcleo neuronal HVC presenta oportunidades únicas para abordar problemáticas de codificación sensorimotora. Esto es debido a que éste es un núcleo neuronal necesario para la producción del canto pero que también recibe entradas auditivas altamente procesadas (ver *Circuito neuronal del canto* (Sección 1.6)).

En los experimentos mostrados en Capítulo 2 y Capítulo 3 se trabajó con diamantes mandarines como modelo animal. En la búsqueda de las estrategias de codificación del comportamiento a nivel del sistema nervioso central (SNC) se planteó un paradigma experimental a partir de estudiar la respuesta relativa en neuronas selectivas de HVC ante variaciones del canto natural del ave. En Capítulo 2, se estudiaron las respuestas de neuronas del núcleo HVC ante presentaciones de canto sintetizado por un modelo de baja dimensión para la producción vocal, mientras que en Capítulo 3 se estudiaron las respuestas a cambios en la envolvente del canto.

En el primer conjunto de experimentos se encontró que una automatización del proceso de ajuste de los parámetros de un modelo de fonación de baja dimensión fue capaz de sintetizar

cantos lo suficientemente realistas como para generar respuesta en las neuronas altamente selectivas de HVC (Boari et al., 2015). Cabe resaltar que este método provee una herramienta para generar de manera automática canto de aves sintético, habiendo probado su relevancia biológica (dada por la respuesta similar de neuronas altamente selectivas al canto propio del ave). Aún así, la amplitud de la respuesta fue menor, indicando que es posible que el modelo no fuera capaz de capturar todas las características acústicas del canto natural. Esto motivó un segundo estudio, en el cual se plantearon modificaciones de manera sistemática a la evolución temporal de la envolvente del canto. Inspirado en las asimetrías marcadas en las envolventes de sílabas en cantos naturales, la hipótesis de este segundo trabajo (Boari & Amador, 2018) fue que esta característica acústica podría ser relevante en la codificación de la identidad del estímulo en el cerebro de las aves (los experimentos en Capítulo 3). En ese trabajo, se encontraron variaciones en la respuesta de las neuronas selectivas al canto propio en HVC. Estas variaciones fueron principalmente en la amplitud de la respuesta, pero manteniendo similitudes con el patrón de actividad respecto del canto propio. Esto se debe, probablemente, a que el canto modificado mantuvo la evolución temporal del espectro, y esto es una propiedad codificada por estas neuronas.

Concurrente con estas líneas de trabajo, se estableció un debate sobre el rol de las neuronas de HVC en la codificación del canto, del cual emergieron dos visiones posibles del sistema motor del canto (ver Capítulo 1). En la visión establecida del funcionamiento del núcleo HVC (la llamada “hipótesis del reloj”) se propone que este núcleo es el responsable de codificar cada detalle de la actividad motora, con neuronas que disparan de manera continua en ráfagas de 10 ms distribuidas de manera uniforme a lo largo del canto. En otras palabras, según esta visión HVC no codifica información motora correlacionada con el comportamiento, sino que sería el responsable de mantener la “cadena de tiempo” del canto (Fee et al., 2004). Por otro lado, en (Amador et al., 2013) se mostró que existen ráfagas de disparo en la actividad de HVC que ocurren con mayor probabilidad en las transiciones de gestos motores, lo cual plantea una diferencia fundamental en la codificación neuronal del canto respecto de la “hipótesis del reloj”. Tras la observación de que la actividad en el núcleo HVC no está distribuida de manera homogénea a lo largo del canto sino en instancias significativas, cobró relevancia la “hipótesis de transición de gestos”, representando así una visión alternativa para el rol de las neuronas del núcleo HVC. Como se discutió en Capítulo 1, la noción de que HVC forma parte de una red distribuida responsable por la codificación temporal del canto también surge de trabajos que retomaron los experimentos de enfriamiento de HVC que dieron soporte a la hipótesis del reloj en primer lugar (Long & Fee, 2008). Tanto en (Goldin et al., 2013) como en (Hamaguchi et al., 2016) se tienen ejemplos de evidencias experimentales que no pueden ser explicadas a partir del modelo “de arriba hacia abajo” planteado por la hipótesis del reloj. Adicionalmente, en (Okubo et al., 2015) se muestra que para diamantes mandarines juveniles, las neuronas disparan al inicio de las proto-sílabas, proveyendo evidencia adicional de la codificación neuronal de gestos.

Desambiguar esta cuestión no es tarea sencilla. Por un lado, el canto del diamante mandarín presenta un motivo de canto corto (del orden de 1.5 s, ver Figura 1.1), así como un gran número de transiciones a lo largo del canto. Por este motivo, el debate entre las visiones dadas por la hipótesis del reloj y por la hipótesis de transición de gestos no está resuelto en la literatura. Aunque evidencias experimentales recientes intentan mostrar que en diamantes mandarines existe una cadena del tiempo en HVC (Lynch et al., 2016; Picardo et al., 2016), los cantos estudiados son tan complejos y con tanta densidad de transiciones de gestos (GTEs), que es imposible desambiguar entre ambos modelos. Adicionalmente, en los cantos más sencillos reportados en esos trabajos se observan heterogeneidades de la actividad de las neuronas proyectoras de HVC en la cercanía de inicios y finales de sílabas, un subconjunto de las transiciones de gestos (GTE) propuestas a partir de los trabajos en (Amador et al., 2013; Boari et al., 2015). Debido a la complejidad de su canto, el diamante mandarín no resulta ser la especie adecuada para resolver este problema.

Por los motivos antedichos, la propuesta en la segunda mitad de la tesis consistió en un cambio de modelo animal. La justificación del cambio hacia los canarios domésticos tiene sus raíces en una perspectiva neuroetológica: el canto en esta especie presenta bondades respecto a los diamantes mandarines para la pregunta que se quiere abordar. En particular, la distribución de transiciones de gestos a lo largo del canto de los canarios presenta una distribución heterogénea que aporta un marco muy claro en el cual poner a prueba las predicciones del modelo circular. Dentro del repertorio del canto de los canarios, existe un tipo silábico que resulta de particular interés en esta línea de pensamiento. Las sílabas del tipo P0, (ver *El canto de los canarios* (Subsección 4.2.A)) son de larga duración (aprox. 350–400 ms) y presentan un reducido número de instancias de transiciones entre gestos. Las instancias relevantes consisten en la articulación de una primer nota de alta frecuencia fundamental y contenido espectral pero de poca duración contra una segunda parte que presenta una frecuencia fundamental estable, representando un sonido tonal en una escala de aprox. 150–200 ms. En estas sílabas de larga duración, el modelo circular predice la presencia de una instancia de activación robusta en la actividad del núcleo HVC (ver Subsección 1.7.A). Por lo tanto, el modelo predice la ausencia de instancias de activación marcada durante el resto de la sílaba. Adicionalmente, la interpretación de los resultados de los estudios de la actividad de neuronas únicas presenta la limitación de inferir el comportamiento poblacional del núcleo a partir de la medición de un subconjunto reducido de neuronas. Para aportar de otra manera al debate entre las visiones propuestas para el rol del núcleo HVC en la codificación del canto, se buscó estudiar la actividad neuronal a mayor escala.

Teniendo este marco, se realizaron registros de actividad neuronal en el núcleo HVC en canarios anestesiados ante presentaciones del canto propio. La técnica de registros, aunque tiene similitudes con lo presentado en Capítulo 2 y Capítulo 3, requirió de la puesta a punto de nuevas tecnologías. En estos registros se utilizaron sondas de sílice con arreglos multielectrodo de 32 canales para medir la actividad del núcleo en múltiples sitios en simultáneo. Para poder realizar

las mediciones, se utilizaron una nueva generación de amplificadores electrónicos conectados a placas de adquisición multicanal. Una de las principales diferencias respecto de registros anteriores fue el énfasis realizado en la búsqueda de medidas de la actividad a nivel poblacional, sin restringirse necesariamente a recuperar las trazas de actividad de neuronas individuales en el núcleo HVC. Por este motivo, se estudió el potencial de campo local dentro de HVC (Capítulo 4), así como su relación con la actividad neuronal en el núcleo (Capítulo 5).

Dados los cambios de especie y en la tecnología de los registros, fue necesario llevar a cabo una caracterización detallada de las mediciones. Por un lado, el registro de actividad multicanal permitió estudiar la distribución espacial de la actividad neuronal. De este análisis se vio que existe una escala de correlación del orden de los cientos de micrones. El alto grado de correlación entre canales vecinos permitió reducir la dimensionalidad del análisis, por lo cual los fenómenos descritos para la respuesta al canto propio en Capítulo 4 y Capítulo 5 provienen del análisis del canal en la sonda que presentó máxima amplitud RMS.

En esta tesis se describió un comportamiento de sumo interés, que fue la presencia de instancias en las que cobraron relevancia bandas de frecuencia en el LFP asociadas a la tasa silábica de distintas frases del canto del ave. Estas oscilaciones no perduraron en toda la presentación del canto, pero fueron un emergente robusto de los ensayos de presentación del estímulo auditivo en múltiples sitios del núcleo HVC y en ambos hemisferios cerebrales. La información respecto del LFP en HVC es escasa. Estudios previos han planteado la presencia de actividad rítmica en el núcleo, a partir de estudios *in vitro* en rebanadas del núcleo (Solis & Perkel, 2005) y en registros *in vivo* en diamantes mandarines (Markowitz et al., 2015). Para esa especie, se encontró que el núcleo HVC presenta un ritmo a 30 Hz. En Nif, un núcleo de procesamiento auditivo que proyecta a HVC, existen oscilaciones en el rango de los 90–150 Hz (Lewandowski & Schmidt, 2011). Aunque no se planteó la relación entre la oscilación a 30 Hz y la producción del canto, cabe notar que más recientemente se ha establecido que la estructura interna del canto de los diamantes mandarines presenta variaciones en la misma escala temporal (Norton & Scharff, 2016), por lo cual las oscilaciones en diamantes mandarines y las descritas en esta tesis pueden ser compatibles con cambios en la estructura temporal del canto en cada especie. La gran ventaja del trabajo contenido en esta tesis es que se eligió trabajar con una especie en la cual el comportamiento es rítmico. De esta manera, al elegir una especie apropiada, las características de la codificación neuronal emergen más claramente.

Para dos tipos silábicos en el repertorio de los canarios (sílabas P0 y P1), se encontró que las instancias de respuesta en los LFP y en los perfiles de actividad conjunta de múltiples unidades están codificando instancias significativas del canto. Para estas sílabas, se mostró que los datos de distintos animales se agrupan marcando una fase específica de disparo respecto al inicio silábico, lo cual puede relacionarse con instancias motoras relevantes. Los resultados hallados a nivel del LFP fueron relacionados con la actividad conjunta de múltiples neuronas en el núcleo HVC

durante Capítulo 5, estableciendo así una relación entre ambas medidas de la actividad electrofisiológica en el núcleo. Adicionalmente, se lograron aislar neuronas individuales de HVC, representando de esta manera 3 escalas distintas en los registros (LFP, actividad MUA y la actividad de unidades individuales). Para el caso de neuronas con respuesta a sílabas del tipo P0 se encontraron ráfagas de potenciales de acción en la cercanía del comienzo silábico, lo cual rechaza la hipótesis del reloj y está en acuerdo con las predicciones planteadas por el modelo circular.

Este resultado es de suma importancia, puesto que permite obtener una medición de la actividad neuronal a gran escala sobre la cual interpretar la actividad de las neuronas del núcleo. De esta manera, el LFP se convierte en el eslabón intermedio entre el detalle obtenido a partir de la actividad de neuronas individuales y la posibilidad de estudiar cómo se conjuga a gran escala la actividad en los múltiples núcleos neuronales responsables de la generación del canto.

En conjunto, estos resultados - aunque proveen evidencia indirecta de la actividad en HVC durante la producción del canto - son compatibles con las predicciones realizadas por el modelo introducido en Capítulo 1. De esta manera, los resultados obtenidos demostraron que el enfoque planteado a partir del cambio de especie fue una herramienta de suma importancia para poder contrastar las predicciones del modelo con datos experimentales. Hemos mostrado a lo largo de Capítulo 4 y Capítulo 5 que en datos de múltiples animales se encuentran patrones de actividad neuronal compatibles con la codificación de instancias significativas del canto, rechazando así la hipótesis del reloj. Para obtener una validación más directa de las predicciones del modelo circular, será necesario el estudio de la actividad en los núcleos, en particular HVC, durante la producción del canto. Estos experimentos están siendo realizados actualmente en el laboratorio, y forman parte del proyecto de doctorado de una compañera de trabajo (Cecilia T. Herbert).

Como nota final, los resultados de estos experimentos muestran que el modelado de baja dimensión y la estrategia neuroetológica aportan un enfoque sinérgico, que permitió realizar predicciones contrastables con la actividad en el núcleo HVC. Para esto, la elección de la especie adecuada para contrastar las predicciones fue un paso crucial. No sólo esto, sino que las medidas de actividad a gran escala como el LFP, altamente subestimada en el campo de aves resultó ser de suma relevancia, al poder relacionarse directamente con la actividad conjunta de múltiples neuronas en la misma región. Por este motivo, el LFP representa un cambio de paradigma para futuros estudios, dado que provee un marco mesoscópico en el cual interpretar la actividad de neuronas individuales. En particular, dado que las instancias reportadas por el LFP resultan estar relacionadas con la sincronización de actividad de múltiples neuronas, esto convierte al LFP en un candidato ideal para estudiar la actividad neuronal global de distintos núcleos en simultáneo, y ayudar así a contrastar con medidas experimentales las predicciones del modelo circular respecto de la actividad de los distintos núcleos neuronales durante el canto. De esta manera, el LFP puede ser una herramienta poderosa que ayude a construir un panorama de la codificación neuronal del canto a nivel macroscópico.

Apéndices

7.1. Sitios de penetración en HVC

En este apéndice se deja registro de los sitios de penetración explorados en HVC y que corresponden a los protocolos analizados en Capítulo 4 y Capítulo 5. En Figura 7.1 se muestra un esquema del campo visual durante la cirugía para cada animal, dando cuenta del marcador anatómico utilizado de referencia para marcar las coordenadas estereotáxicas en HVC. En la figura, cada símbolo corresponde a un animal distinto. Notar que existen animales donde se logró medir actividad en HVC de ambos hemisferios, pero en otras sólo se tiene información de un solo hemisferio.

7.2. Sondas de registro

Como referencia, se dejan las configuraciones de sondas de sílice utilizadas (Neuronexus A1x32) y (Neuronexus A1x32-Poly2). La principal diferencia entre estas sondas es la distribución espacial en los canales. Los datos correspondientes a dos protocolos de un ave (Csb253-AzuAma) fueron registrados con la sonda A1x32-Poly2. Estos protocolos no fueron tenidos en cuenta en el análisis de la distribución espacial desarrollado en Capítulo 5. Sin embargo, como el resto de los análisis se realizaron sobre los canales de máxima amplitud RMS, esos datos sí fueron tenidos en cuenta en el análisis de la respuesta al canto.

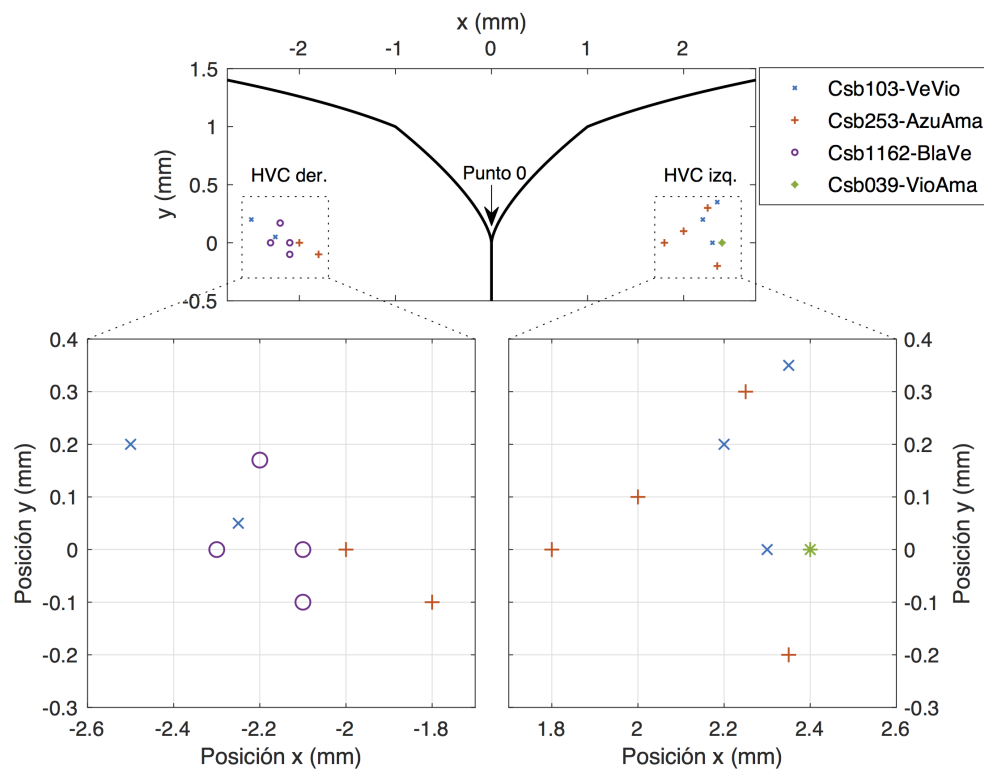


Figura 7.1: Esquema de sitios de penetración en HVC explorados para cada animal. El “Punto Y” es el marcador anatómico utilizado para marcar las coordenadas estereotáxicas de cada penetración en HVC. Cada símbolo corresponde a un ave distinta. En las ampliaciones se detallan las coordenadas exploradas (medidas respecto del “Punto Y”). Notar que existen animales para los que se tienen protocolos medidos en los núcleos HVC de ambos hemisferios, pero para otros se tienen datos sólo de un hemisferio.

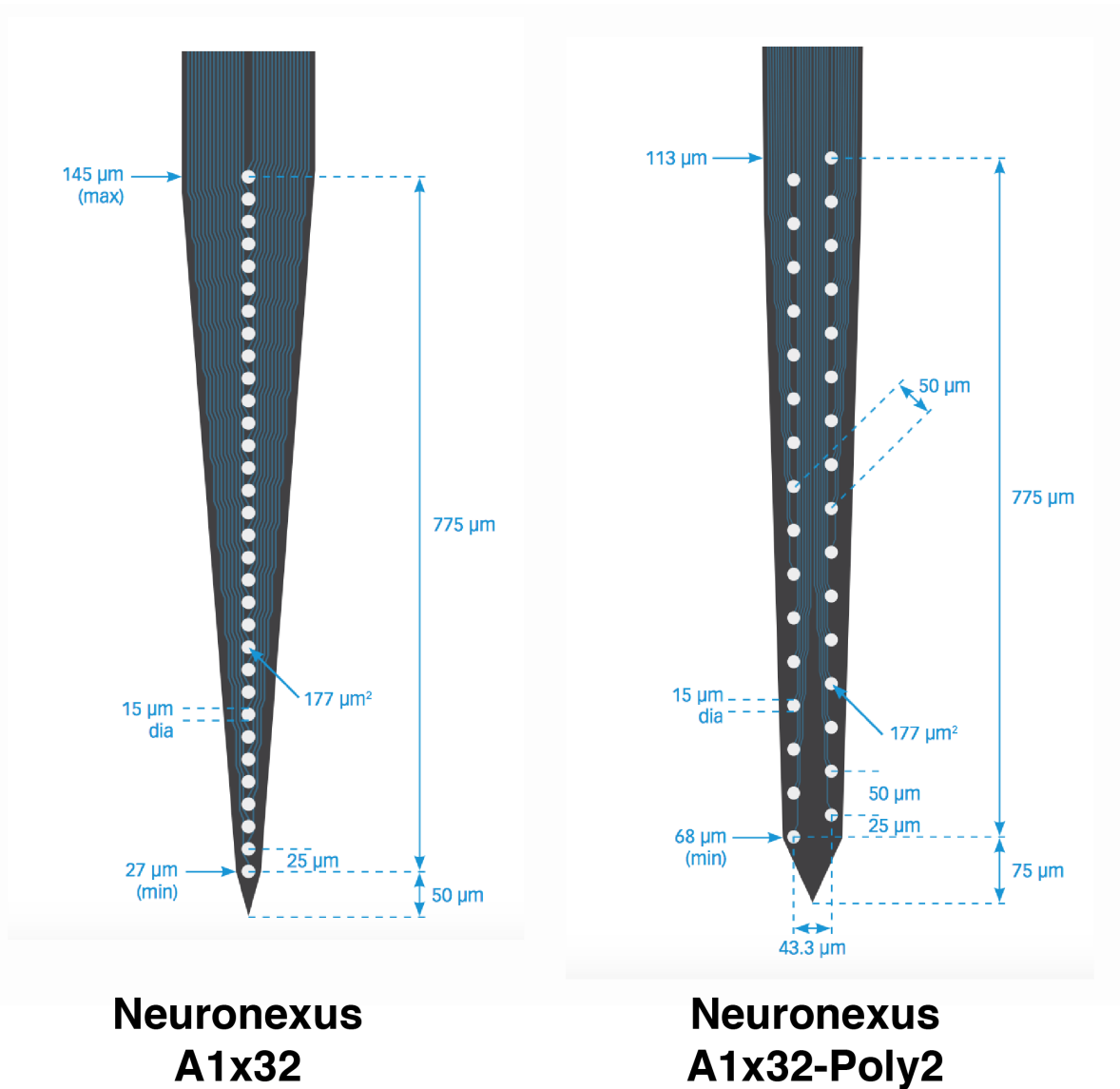


Figura 7.2: Configuraciones de sonda multi-electrodo utilizadas en los experimentos de Capítulo 4 y Capítulo 5. Ambos tipos de sondas son comerciales (Neuronexus) y presentan 32 canales para el registro de la actividad neuronal. Los esquemas de la sonda fueron extraídos del catálogo de la compañía, disponible en www.neuronexus.com.

Bibliografía

- Alliende, J. A., Méndez, J. M., Goller, F., & Mindlin, G. B. Hormonal acceleration of song development illuminates motor control mechanism in canaries. *Dev Neurobiol*, 70(14):943–60, Dec 2010.
- Alonso, L. M., Alliende, J. A., Goller, F., & Mindlin, G. B. Low-dimensional dynamical model for the diversity of pressure patterns used in canary song. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 79(4 Pt 1):041929, Apr 2009.
- Alonso, R., Goller, F., & Mindlin, G. B. Motor control of sound frequency in birdsong involves the interaction between air sac pressure and labial tension. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 89(3):032706, Mar 2014.
- Alonso, R. G., Trevisan, M. A., Amador, A., Goller, F., & Mindlin, G. B. A circular model for song motor control in serinus canaria. *Front Comput Neurosci*, 9:41, 2015.
- Alonso, R. G., Amador, A., & Mindlin, G. B. An integrated model for motor control of song in serinus canaria. *J Physiol Paris*, 110(3 Pt A):127–139, 10 2016.
- Amador, A. & Mindlin, G. B. Beyond harmonic sounds in a simple model for birdsong production. *Chaos*, 18(4):043123, Dec 2008.
- Amador, A. & Mindlin, G. B. Low dimensional dynamics in birdsong production. *The European Physical Journal B*, 87(12):300, 2014.
- Amador, A., Perl, Y. S., Mindlin, G. B., & Margoliash, D. Elemental gesture dynamics are encoded by song premotor cortical neurons. *Nature*, 495(7439):59–64, Mar 2013.
- Amador, A., Boari, S., & Mindlin, G. B. From perception to action in songbird production: dynamics of a whole loop. *Curr Opin Syst Biol*, 3:30–35, Jun 2017.
- Ashmore, R. C., Renk, J. A., & Schmidt, M. F. Bottom-up activation of the vocal motor forebrain by the respiratory brainstem. *J Neurosci*, 28(10):2613–23, Mar 2008.
- Beckers, G. J. L. & Gahr, M. Neural processing of short-term recurrence in songbird vocal communication. *PLoS One*, 5(6):e11129, Jun 2010.
- Beckers, G. J. L. & Rattenborg, N. C. An in depth view of avian sleep. *Neurosci Biobehav Rev*, 50: 120–7, Mar 2015.

- Beckers, G. J. L., van der Meij, J., Lesku, J. A., & Rattenborg, N. C. Plumes of neuronal activity propagate in three dimensions through the nuclear avian brain. *BMC Biol*, 12:16, Feb 2014.
- Bédard, C., Kröger, H., & Destexhe, A. Model of low-pass filtering of local field potentials in brain tissue. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 73(5 Pt 1):051911, May 2006.
- Belitski, A., Gretton, A., Magri, C., Murayama, Y., Montemurro, M. A., Logothetis, N. K., & Panzeri, S. Low-frequency local field potentials and spikes in primary visual cortex convey independent visual information. *Journal of Neuroscience*, 28(22):5696–5709, 2008.
- Belzner, S., Voigt, C., Catchpole, C. K., & Leitner, S. Song learning in domesticated canaries in a restricted acoustic environment. *Proc Biol Sci*, 276(1669):2881–6, Aug 2009.
- Berwick, R. C. & Chomsky, N. *Birdsong, speech, and language: exploring the evolution of mind and brain*. MIT press, 2013.
- Boari, S. & Amador, A. Neural coding of sound envelope structure in songbirds. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, 204(3):285–294, Mar 2018.
- Boari, S., Perl, Y. S., Amador, A., Margoliash, D., & Mindlin, G. B. Automatic reconstruction of physiological gestures used in a model of birdsong production. *J Neurophysiol*, 114(5):2912–22, Nov 2015.
- Boersma, P. & Van Heuven, V. Speak and unspeak with praat. *Glott International*, 5(9-10):341–347, 2001.
- Bolhuis, J. J., Okanoya, K., & Scharff, C. Twitter evolution: converging mechanisms in birdsong and human speech. *Nat Rev Neurosci*, 11(11):747–59, 11 2010.
- Bottjer, S. W., Miesner, E. A., & Arnold, A. P. Forebrain lesions disrupt development but not maintenance of song in passerine birds. *Science*, 224(4651):901–3, May 1984.
- Bottjer, S. W., Miesner, E. A., & Arnold, A. P. Changes in neuronal number, density and size account for increases in volume of song-control nuclei during song development in zebra finches. *Neurosci Lett*, 67(3):263–8, Jun 1986.
- Brainard, M. S. & Doupe, A. J. Interruption of a basal ganglia-forebrain circuit prevents plasticity of learned vocalizations. *Nature*, 404(6779):762–6, Apr 2000.
- Brainard, M. S. & Doupe, A. J. Translating birdsong: songbirds as a model for basic and applied medical research. *Annu Rev Neurosci*, 36:489–517, Jul 2013.
- Bregman, M. R., Patel, A. D., & Gentner, T. Q. Songbirds use spectral shape, not pitch, for sound pattern recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(6):1666–71, Feb 2016.
- Butterworth, S. On the theory of filter amplifiers. *Wireless Engineer*, 7(6):536–541, 1930.
- Buzsáki, G. Large-scale recording of neuronal ensembles. *Nat Neurosci*, 7(5):446–51, May 2004.
- Buzsaki, G. *Rhythms of the Brain*. Oxford University Press, 2006.

- Buzsáki, G. & Draguhn, A. Neuronal oscillations in cortical networks. *Science*, 304(5679):1926–9, Jun 2004.
- Buzsáki, G., Anastassiou, C. A., & Koch, C. The origin of extracellular fields and currents—eeg, ecog, lfp and spikes. *Nat Rev Neurosci*, 13(6):407–20, May 2012.
- Cacclin, A., McAdams, S., Smith, B. K., & Winsberg, S. Acoustic correlates of timbre space dimensions: a confirmatory study using synthetic tones. *J Acoust Soc Am*, 118(1):471–82, Jul 2005.
- Catchpole, C. & Slater, P. *Bird Song: Biological Themes and Variations*. Cambridge University Press, 2008.
- Chung, J. E., Magland, J. F., Barnett, A. H., Tolosa, V. M., Tooker, A. C., Lee, K. Y., Shah, K. G., Felix, S. H., Frank, L. M., & Greengard, L. F. A fully automated approach to spike sorting. *Neuron*, 95(6):1381–1394.e6, Sep 2017.
- Dave, A. S. & Margoliash, D. Song replay during sleep and computational rules for sensorimotor vocal learning. *Science*, 290(5492):812–6, Oct 2000.
- Dayan, P. & Abbott, L. F. *Theoretical neuroscience*, volume 806. Cambridge, MA: MIT Press, 2001.
- Del Negro, C., Lehongre, K., & Edeline, J.-M. Selectivity of canary hvc neurons for the bird's own song: modulation by photoperiodic conditions. *J Neurosci*, 25(20):4952–63, May 2005.
- Destexhe, A., Contreras, D., & Steriade, M. Spatiotemporal analysis of local field potentials and unit discharges in cat cerebral cortex during natural wake and sleep states. *J Neurosci*, 19(11):4595–608, Jun 1999.
- Donoho, D. L. & Johnstone, J. M. Ideal spatial adaptation by wavelet shrinkage. *biometrika*, 81(3):425–455, 1994.
- Dooling, R. J. & Prior, N. H. Do we hear what birds hear in birdsong? *Anim Behav*, 124:283–289, Feb 2017.
- Dooling, R. J., Lohr, B., & Dent, M. L. Hearing in birds and reptiles. In *Comparative hearing: Birds and reptiles*, pages 308–359. Springer, 2000.
- Dooling, R. J., Leek, M. R., Gleich, O., & Dent, M. L. Auditory temporal resolution in birds: discrimination of harmonic complexes. *J Acoust Soc Am*, 112(2):748–59, Aug 2002.
- Doupe, A. J. & Konishi, M. Song-selective auditory circuits in the vocal control system of the zebra finch. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(24):11339–43, Dec 1991.
- Doupe, A. J. & Kuhl, P. K. Birdsong and human speech: common themes and mechanisms. *Annu Rev Neurosci*, 22:567–631, 1999.
- Doupe, A. J. & Solis, M. M. Song- and order-selective neurons develop in the songbird anterior forebrain during vocal learning. *J Neurobiol*, 33(5):694–709, Nov 1997.
- Doupe, A. J. & Heisenberg, M. Neurobiology of behaviour old principles and new approaches.

- Current Opinion in Neurobiology*, 10(6):755 – 756, 2000. ISSN 0959-4388.
- Einevoll, G. T., Kayser, C., Logothetis, N. K., & Panzeri, S. Modelling and analysis of local field potentials for studying the function of cortical circuits. *Nat Rev Neurosci*, 14(11):770–85, Nov 2013.
- Fee, M. S., Shraiman, B., Pesaran, B., & Mitra, P. P. The role of nonlinear dynamics of the syrinx in the vocalizations of a songbird. *Nature*, 395(6697):67–71, Sep 1998.
- Fee, M. S., Kozhevnikov, A. A., & Hahnloser, R. H. R. Neural mechanisms of vocal sequence generation in the songbird. *Ann N Y Acad Sci*, 1016:153–70, Jun 2004.
- Fisher, S. E. & Scharff, C. Foxp2 as a molecular window into speech and language. *Trends Genet*, 25(4):166–77, Apr 2009.
- Franz, M. & Goller, F. Respiratory units of motor production and song imitation in the zebra finch. *J Neurobiol*, 51(2):129–41, May 2002.
- Gabor, D. Theory of communication. part 1: The analysis of information. *Journal of the Institution of Electrical Engineers-Part III: Radio and Communication Engineering*, 93(26):429–441, 1946.
- Gardner, T., Cecchi, G., Magnasco, M., Laje, R., & Mindlin, G. B. Simple motor gestures for birdsongs. *Phys Rev Lett*, 87(20):208101, Nov 2001.
- Girardeau, G., Benchenane, K., Wiener, S. I., Buzsáki, G., & Zugaro, M. B. Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. *Nat Neurosci*, 12(10):1222–3, Oct 2009.
- Gold, C., Henze, D. A., Koch, C., & Buzsáki, G. On the origin of the extracellular action potential waveform: A modeling study. *J Neurophysiol*, 95(5):3113–28, May 2006.
- Goldin, M. A., Alonso, L. M., Allende, J. A., Goller, F., & Mindlin, G. B. Temperature induced syllable breaking unveils nonlinearly interacting timescales in birdsong motor pathway. *PLoS One*, 8(6):e67814, 2013.
- Goldman, S. A. & Nottebohm, F. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(8):2390–4, Apr 1983.
- Goller, F. & Larsen, O. N. New perspectives on mechanisms of sound generation in songbirds. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, 188(11-12):841–50, Dec 2002.
- Goller, F. & Suthers, R. A. Role of syringeal muscles in gating airflow and sound production in singing brown thrashers. *J Neurophysiol*, 75(2):867–76, Feb 1996a.
- Goller, F. & Suthers, R. A. Role of syringeal muscles in controlling the phonology of bird song. *J Neurophysiol*, 76(1):287–300, Jul 1996b.
- Goller, F. & Suthers, R. A. Bilaterally symmetrical respiratory activity during lateralized birdsong. *J Neurobiol*, 41(4):513–23, Dec 1999.

- Goller, F. & Cooper, B. G. Peripheral motor dynamics of song production in the zebra finch. *Ann N Y Acad Sci*, 1016:130–52, Jun 2004.
- Gosselin, B. Recent advances in neural recording microsystems. *Sensors (Basel)*, 11(5):4572–97, 2011.
- Graber, M. H., Helmchen, F., & Hahnloser, R. H. R. Activity in a premotor cortical nucleus of zebra finches is locally organized and exhibits auditory selectivity in neurons but not in glia. *PLoS One*, 8(12):e81177, 2013.
- Grace, J. A., Amin, N., Singh, N. C., & Theunissen, F. E. Selectivity for conspecific song in the zebra finch auditory forebrain. *J Neurophysiol*, 89(1):472–87, Jan 2003.
- Guckenheimer, J. & Holmes, P. *Nonlinear oscillations, dynamical systems, and bifurcations of vector fields*, volume 42. Springer Science & Business Media, 2013.
- Hahnloser, R. H. R. & Fee, M. S. Sleep-related spike bursts in hvc are driven by the nucleus interface of the nidopallium. *J Neurophysiol*, 97(1):423–35, Jan 2007.
- Hahnloser, R. H. R., Kozhevnikov, A. A., & Fee, M. S. An ultra-sparse code underlies the generation of neural sequences in a songbird. *Nature*, 419(6902):65–70, Sep 2002.
- Hall, M. Resolution and uncertainty in spectral decomposition. *First Break*, 24(1102), Dec 2006. ISSN 1365-2397.
- Hamaguchi, K., Tanaka, M., & Mooney, R. A distributed recurrent network contributes to temporally precise vocalizations. *Neuron*, 91(3):680–93, Aug 2016.
- Harris, K. D., Henze, D. A., Csicsvari, J., Hirase, H., & Buzsáki, G. Accuracy of tetrode spike separation as determined by simultaneous intracellular and extracellular measurements. *J Neurophysiol*, 84(1):401–14, Jul 2000.
- Hartley, R. S. & Suthers, R. A. Lateralization of syringeal function during song production in the canary. *J Neurobiol*, 21(8):1236–48, Dec 1990.
- Hartley, R. S. & Suthers, R. A. Airflow and pressure during canary song: direct evidence for mini-breaths. *Journal of Comparative Physiology A*, 165(1):15–26, 1989.
- Hetke, J. F., Kipke, D. R., Pellinen, D. S., & Anderson, D. J. Modular multichannel microelectrode array and methods of making same, May 10 2011. US Patent 7,941,202.
- Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology*, 117(4):500–544, 1952.
- Hoppensteadt, F. C. & Izhikevich, E. M. Synaptic organizations and dynamical properties of weakly connected neural oscillators. i. analysis of a canonical model. *Biol Cybern*, 75(2):117–27, Aug 1996.
- Hoppensteadt, F. C. & Izhikevich, E. M. *Weakly connected neural networks*, volume 126. Springer

- Science & Business Media, 2012.
- Hubel, D. H. Single unit activity in striate cortex of unrestrained cats. *J Physiol*, 147:226–38, Sep 1959.
- Huxter, J., Burgess, N., & O'Keefe, J. Independent rate and temporal coding in hippocampal pyramidal cells. *Nature*, 425(6960):828–32, Oct 2003.
- Iverson, P. & Krumhansl, C. L. Isolating the dynamic attributes of musical timbre. *J Acoust Soc Am*, 94(5):2595–603, Nov 1993.
- Kadir, S. N., Goodman, D. F. M., & Harris, K. D. High-dimensional cluster analysis with the masked em algorithm. *Neural Comput*, 26(11):2379–94, Nov 2014.
- Konishi, M. The role of auditory feedback in the control of vocalization in the white-crowned sparrow. *Z Tierpsychol*, 22(7):770–83, Dec 1965a.
- Konishi, M. Effects of deafening on song development in american robins and black-headed grosbeaks. *Z Tierpsychol*, 22(5):584–99, Aug 1965b.
- Konishi, M. Auditory environment and vocal development in birds. *Perception and Experience*, pages 105–118, 1978.
- Kozhevnikov, A. A. & Fee, M. S. Singing-related activity of identified hvc neurons in the zebra finch. *J Neurophysiol*, 97(6):4271–83, Jun 2007.
- Krimphoff, J., McAdams, S., & Winsberg, S. Caractérisation du timbre des sons complexes. ii. analyses acoustiques et quantification psychophysique. *Le Journal de Physique IV*, 4(C5):C5–625, 1994.
- Kroodsma, D. E. & Pickert, R. Repertoire size, auditory templates, and selective vocal learning in songbirds. *Animal Behaviour*, 32(2):395 – 399, 1984. ISSN 0003-3472.
- Kuhl, P. K. Human speech and birdsong: communication and the social brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(17):9645–6, Aug 2003.
- Laje, R. & Mindlin, G. B. Modeling source-source and source-filter acoustic interaction in bird-song. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 72(3 Pt 2):036218, Sep 2005.
- Laje, R., Gardner, T. J., & Mindlin, G. B. Neuromuscular control of vocalizations in birdsong: a model. *Physical Review E*, 65(5):051921, 2002.
- Larsen, O. N. & Goller, F. Role of syringeal vibrations in bird vocalizations. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 266(1429):1609–1615, Aug 1999. ISSN 1471-2954.
- Lewandowski, B. C. & Schmidt, M. Short bouts of vocalization induce long-lasting fast gamma oscillations in a sensorimotor nucleus. *J Neurosci*, 31(39):13936–48, Sep 2011.
- Lewicki, M. S. A review of methods for spike sorting: the detection and classification of neural action potentials. *Network*, 9(4):R53–78, Nov 1998.

- Long, M. A. & Fee, M. S. Using temperature to analyse temporal dynamics in the songbird motor pathway. *Nature*, 456(7219):189–94, Nov 2008.
- Low, P. S., Shank, S. S., Sejnowski, T. J., & Margoliash, D. Mammalian-like features of sleep structure in zebra finches. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(26):9081–6, Jul 2008.
- Lubenov, E. V. & Siapas, A. G. Hippocampal theta oscillations are travelling waves. *Nature*, 459(7246):534–9, May 2009.
- Lynch, G. F., Okubo, T. S., Hanuschkin, A., Hahnloser, R. H. R., & Fee, M. S. Rhythmic continuous-time coding in the songbird analog of vocal motor cortex. *Neuron*, 90(4):877–92, 05 2016.
- Margoliash, D. Acoustic parameters underlying the responses of song-specific neurons in the white-crowned sparrow. *J Neurosci*, 3(5):1039–57, May 1983.
- Margoliash, D. Preference for autogenous song by auditory neurons in a song system nucleus of the white-crowned sparrow. *J Neurosci*, 6(6):1643–61, Jun 1986.
- Margoliash, D. & Fortune, E. S. Temporal and harmonic combination-sensitive neurons in the zebra finch's hvc. *J Neurosci*, 12(11):4309–26, Nov 1992.
- Margoliash, D. & Konishi, M. Auditory representation of autogenous song in the song system of white-crowned sparrows. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(17):5997–6000, Sep 1985.
- Margoliash, D., Fortune, E. S., Sutter, M. L., Yu, A. C., Wren-Hardin, B. D., & Dave, A. Distributed representation in the song system of oscines: evolutionary implications and functional consequences. *Brain Behav Evol*, 44(4-5):247–64, 1994.
- Markowitz, J. E., Ivie, E., Kligler, L., & Gardner, T. J. Long-range order in canary song. *PLoS Comput Biol*, 9(5):e1003052, 2013.
- Markowitz, J. E., Liberti, 3rd, W. A., Guitchounts, G., Velho, T., Lois, C., & Gardner, T. J. Mesoscopic patterns of neural activity support songbird cortical sequences. *PLoS Biol*, 13(6):e1002158, Jun 2015.
- Marler, P. A comparative approach to vocal learning: song development in white-crowned sparrows. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 71(2p2):1, 1970.
- Marler, P. & Tamura, M. Culturally transmitted patterns of vocal behavior in sparrows. *Science*, 146(3650):1483–1486, 1964.
- Mazzoni, A., Brunel, N., Cavallari, S., Logothetis, N. K., & Panzeri, S. Cortical dynamics during naturalistic sensory stimulations: experiments and models. *J Physiol Paris*, 105(1-3):2–15, 2011.
- McAdams, S., Winsberg, S., Donnadieu, S., De Soete, G., & Krimphoff, J. Perceptual scaling of synthesized musical timbres: common dimensions, specificities, and latent subject classes. *Psychol Res*, 58(3):177–92, 1995.

- McCasland, J. S. & Konishi, M. Interaction between auditory and motor activities in an avian song control nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(12):7815–9, Dec 1981.
- Mindlin, G. B. Nonlinear dynamics in the study of birdsong. *Chaos*, 27(9):092101, Sep 2017.
- Mindlin, G. B. & Laje, R. *The physics of birdsong*. Springer Science & Business Media, 2006.
- Mindlin, G., Gardner, T., Goller, F., & Suthers, R. Experimental support for a model of birdsong production. *Physical Review E*, 68(4):041908, 2003.
- Montemurro, M. A., Rasch, M. J., Murayama, Y., Logothetis, N. K., & Panzeri, S. Phase-of-firing coding of natural visual stimuli in primary visual cortex. *Curr Biol*, 18(5):375–80, Mar 2008.
- Mooney, R. Different subthreshold mechanisms underlie song selectivity in identified hvc neurons of the zebra finch. *J Neurosci*, 20(14):5420–36, Jul 2000.
- Mooney, R. Neural mechanisms for learned birdsong. *Learn Mem*, 16(11):655–69, Nov 2009a.
- Mooney, R. Neurobiology of song learning. *Curr Opin Neurobiol*, 19(6):654–60, Dec 2009b.
- Mooney, R. Auditory-vocal mirroring in songbirds. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369(1644): 20130179, 2014.
- Mountcastle, V. Reflex activity of the spinal cord. *Medical Physiology*, pages 1014–1052, 1956.
- Neher, E., Sakmann, B., & Steinbach, J. H. The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflugers Arch*, 375(2): 219–28, Jul 1978.
- Nick, T. A. & Konishi, M. Neural auditory selectivity develops in parallel with song. *J Neurobiol*, 62(4):469–81, Mar 2005.
- Nicolas-Alonso, L. F. & Gomez-Gil, J. Brain computer interfaces, a review. *Sensors*, 12(2):1211–1279, 2012.
- Norton, P. & Scharff, C. "bird song metronomics": Isochronous organization of zebra finch song rhythm. *Front Neurosci*, 10:309, 2016.
- Nottebohm, F. Testosterone triggers growth of brain vocal control nuclei in adult female canaries. *Brain Res*, 189(2):429–36, May 1980.
- Nottebohm, F., Stokes, T. M., & Leonard, C. M. Central control of song in the canary, *serinus canarius*. *J Comp Neurol*, 165(4):457–86, Feb 1976.
- Nottebohm, F., Nottebohm, M. E., & Crane, L. Developmental and seasonal changes in canary song and their relation to changes in the anatomy of song-control nuclei. *Behav Neural Biol*, 46(3):445–71, Nov 1986.
- Nottebohm, F. Auditory experience and song development in the chaffinch *fringilla coelebs*. *Ibis*, 110(4):549–568, 1968.
- Nottebohm, F. & Nottebohm, M. E. Relationship between song repertoire and age in the canary,

- serinus canarius. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 46(3):298–305, 1978.
- Nowicki, S. & Capranica, R. R. Bilateral syringeal interaction in vocal production of an oscine bird sound. *Science*, 231(4743):1297–9, Mar 1986.
- Obien, M. E. J., Deligkaris, K., Bullmann, T., Bakkum, D. J., & Frey, U. Revealing neuronal function through microelectrode array recordings. *Front Neurosci*, 8:423, 2014.
- Okubo, T. S., Mackevicius, E. L., Payne, H. L., Lynch, G. F., & Fee, M. S. Growth and splitting of neural sequences in songbird vocal development. *Nature*, 528(7582):352–7, Dec 2015.
- Pachitariu, M., Steinmetz, N., Kadir, S., Carandini, M., & Harris, K. D. Kilosort: realtime spike-sorting for extracellular electrophysiology with hundreds of channels. *BioRxiv*, page 061481, 2016.
- Pedreira, C., Martinez, J., Ison, M. J., & Quiñan Quiroga, R. How many neurons can we see with current spike sorting algorithms? *J Neurosci Methods*, 211(1):58–65, Oct 2012.
- Peh, W. Y. X., Roberts, T. F., & Mooney, R. Imaging auditory representations of song and syllables in populations of sensorimotor neurons essential to vocal communication. *J Neurosci*, 35(14): 5589–605, Apr 2015.
- Perl, Y. S., Arneodo, E. M., Amador, A., Goller, F., & Mindlin, G. B. Reconstruction of physiological instructions from zebra finch song. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 84(5 Pt 1): 051909, Nov 2011.
- Picardo, M. A., Merel, J., Katlowitz, K. A., Vallentin, D., Okobi, D. E., Benezra, S. E., Clary, R. C., Pnevmatikakis, E. A., Paninski, L., & Long, M. A. Population-level representation of a temporal sequence underlying song production in the zebra finch. *Neuron*, 90(4):866–76, 05 2016.
- Prather, J. F., Peters, S., Nowicki, S., & Mooney, R. Precise auditory-vocal mirroring in neurons for learned vocal communication. *Nature*, 451(7176):305–10, Jan 2008.
- Priori, A., Foffani, G., Rossi, L., & Marceglia, S. Adaptive deep brain stimulation (adbs) controlled by local field potential oscillations. *Exp Neurol*, 245:77–86, Jul 2013.
- Quiroga, R. Q., Nadasdy, Z., & Ben-Shaul, Y. Unsupervised spike detection and sorting with wavelets and superparamagnetic clustering. *Neural Comput*, 16(8):1661–87, Aug 2004.
- Rey, H. G., Ison, M. J., Pedreira, C., Valentin, A., Alarcon, G., Selway, R., Richardson, M. P., & Quiñan Quiroga, R. Single-cell recordings in the human medial temporal lobe. *Journal of anatomy*, 227(4):394–408, 2015a.
- Rey, H. G., Pedreira, C., & Quiroga, R. Q. Past, present and future of spike sorting techniques. *Brain research bulletin*, 119:106–117, 2015b.
- Riede, T. & Goller, F. Peripheral mechanisms for vocal production in birds - differences and similarities to human speech and singing. *Brain Lang*, 115(1):69–80, Oct 2010.

- Riede, T., Suthers, R. A., Fletcher, N. H., & Blevins, W. E. Songbirds tune their vocal tract to the fundamental frequency of their song. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(14):5543–8, Apr 2006.
- Riede, T., Fisher, J. H., & Goller, F. Sexual dimorphism of the zebra finch syrinx indicates adaptation for high fundamental frequencies in males. *PLoS One*, 5(6):e11368, Jun 2010.
- Ritschard, M. & Brumm, H. Effects of vocal learning, phonetics and inheritance on song amplitude in zebra finches. *Animal behaviour*, 82(6):1415–1422, 2011.
- Rossant, C., Kadir, S. N., Goodman, D. F. M., Schulman, J., Hunter, M. L. D., Saleem, A. B., Grosmark, A., Belluscio, M., Denfield, G. H., Ecker, A. S., Tolias, A. S., Solomon, S., Buzsaki, G., Carandini, M., & Harris, K. D. Spike sorting for large, dense electrode arrays. *Nat Neurosci*, 19(4):634–641, Apr 2016.
- Roulet, J. & Mindlin, G. B. Average activity of excitatory and inhibitory neural populations. *Chaos*, 26(9):093104, Sep 2016.
- Roy, A. & Mooney, R. Auditory plasticity in a basal ganglia-forebrain pathway during decrystallization of adult birdsong. *J Neurosci*, 27(24):6374–87, Jun 2007.
- Scanziani, M. & Häusser, M. Electrophysiology in the age of light. *Nature*, 461(7266):930–9, Oct 2009.
- Schachter, M. J. *Decoding the Rhythms of Avian Auditory LFP*. PhD thesis, UC Berkeley, 2016.
- Scharff, C. & Nottebohm, F. A comparative study of the behavioral deficits following lesions of various parts of the zebra finch song system: implications for vocal learning. *J Neurosci*, 11(9):2896–913, Sep 1991.
- Scherberger, H., Jarvis, M. R., & Andersen, R. A. Cortical local field potential encodes movement intentions in the posterior parietal cortex. *Neuron*, 46(2):347–54, Apr 2005.
- Schmidt, M. F. Pattern of interhemispheric synchronization in hvc during singing correlates with key transitions in the song pattern. *J Neurophysiol*, 90(6):3931–49, Dec 2003.
- Sitt, J. D., Amador, A., Goller, F., & Mindlin, G. B. Dynamical origin of spectrally rich vocalizations in birdsong. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 78(1 Pt 1):011905, Jul 2008.
- Sitt, J. D., Arneodo, E. M., Goller, F., & Mindlin, G. B. Physiologically driven avian vocal synthesizer. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 81(3 Pt 1):031927, Mar 2010.
- Slater, P. J. Bird song: acoustic communication in birds. *Science*, 222(4620):155–6, Oct 1983.
- Sober, S. J., Wohlgemuth, M. J., & Brainard, M. S. Central contributions to acoustic variation in birdsong. *J Neurosci*, 28(41):10370–9, Oct 2008.
- Solis, M. M. & Doupe, A. J. Anterior forebrain neurons develop selectivity by an intermediate stage of birdsong learning. *J Neurosci*, 17(16):6447–62, Aug 1997.
- Solis, M. M. & Doupe, A. J. Contributions of tutor and bird’s own song experience to neural

- selectivity in the songbird anterior forebrain. *J Neurosci*, 19(11):4559–84, Jun 1999.
- Solis, M. M. & Doupe, A. J. Compromised neural selectivity for song in birds with impaired sensorimotor learning. *Neuron*, 25(1):109–21, Jan 2000.
- Solis, M. M. & Perkel, D. J. Rhythmic activity in a forebrain vocal control nucleus in vitro. *J Neurosci*, 25(11):2811–22, Mar 2005.
- Sossinka, R. & Böhner, J. Song types in the zebra finch *poephila guttata castanotis* 1. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 53(2):123–132, 1980.
- Srivastava, K. H., Elemans, C. P. H., & Sober, S. J. Multifunctional and context-dependent control of vocal acoustics by individual muscles. *J Neurosci*, 35(42):14183–94, Oct 2015.
- Stokes, T. M., Leonard, C. M., & Nottebohm, F. The telencephalon, diencephalon, and mesencephalon of the canary, *serinus canaria*, in stereotaxic coordinates. *J Comp Neurol*, 156(3):337–74, Aug 1974.
- Suthers, R. A. Peripheral control and lateralization of birdsong. *J Neurobiol*, 33(5):632–52, Nov 1997.
- Suthers, R. A., Goller, F., & Pytte, C. The neuromuscular control of birdsong. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 354(1385):927–39, May 1999.
- Tchernichovski, Nottebohm, Ho, Pesaran, & Mitra. A procedure for an automated measurement of song similarity. *Anim Behav*, 59(6):1167–1176, Jun 2000.
- Temereanca, S. & Simons, D. J. Local field potentials and the encoding of whisker deflections by population firing synchrony in thalamic barreloids. *J Neurophysiol*, 89(4):2137–45, Apr 2003.
- Theunissen, F. E. & Doupe, A. J. Temporal and spectral sensitivity of complex auditory neurons in the nucleus hvc of male zebra finches. *J Neurosci*, 18(10):3786–802, May 1998.
- Theunissen, F. E., Sen, K., & Doupe, A. J. Spectral-temporal receptive fields of nonlinear auditory neurons obtained using natural sounds. *J Neurosci*, 20(6):2315–31, Mar 2000.
- Theunissen, F. E., Amin, N., Shaevitz, S. S., Woolley, S. M. N., Fremouw, T., & Hauber, M. E. Song selectivity in the song system and in the auditory forebrain. *Ann N Y Acad Sci*, 1016:222–45, Jun 2004.
- Thorpe, W. H. The process of song-learning in the chaffinch as studied by means of the sound spectrograph. *Nature*, 173(4402):465, 1954.
- Thorpe, W. H. The learning of song patterns by birds, with especial reference to the song of the chaffinch *fringilla coelebs*. *Ibis*, 100(4):535–570, 1958.
- Titze, I. R. & Martin, D. W. Principles of voice production, 1998.
- Town, S. M. & Bizley, J. K. Neural and behavioral investigations into timbre perception. *Front Syst Neurosci*, 7:88, Nov 2013.

- Tramontin, A. D., Smith, G. T., Breuner, C. W., & Brenowitz, E. A. Seasonal plasticity and sexual dimorphism in the avian song control system: stereological measurement of neuron density and number. *J Comp Neurol*, 396(2):186–92, Jun 1998.
- Trevisan, M. A., Mindlin, G. B., & Goller, F. Nonlinear model predicts diverse respiratory patterns of birdsong. *Phys Rev Lett*, 96(5):058103, Feb 2006.
- Van Drongelen, W. *Signal processing for neuroscientists*. Academic press, 2018.
- Verkhatsky, A., Krishtal, O. A., & Petersen, O. H. From galvanic to patch clamp: the development of electrophysiology. *Pflugers Arch*, 453(3):233–47, Dec 2006.
- Vu, E. T., Mazurek, M. E., & Kuo, Y. C. Identification of a forebrain motor programming network for the learned song of zebra finches. *J Neurosci*, 14(11 Pt 2):6924–34, Nov 1994.
- Wallisch, P., Lusignan, M. E., Benayoun, M. D., Baker, T. I., Dickey, A. S., & Hatsopoulos, N. G. *MATLAB for neuroscientists: an introduction to scientific computing in MATLAB*. Academic Press, 2014.
- Yanagihara, S. & Hessler, N. A. Phasic basal ganglia activity associated with high-gamma oscillation during sleep in a songbird. *J Neurophysiol*, 107(1):424–32, Jan 2012.
- Yu, A. C. & Margoliash, D. Temporal hierarchical control of singing in birds. *Science*, 273(5283):1871–5, Sep 1996.
- Zanos, T. P., Mineault, P. J., Nasiotis, K. T., Guitton, D., & Pack, C. C. A sensorimotor role for traveling waves in primate visual cortex. *Neuron*, 85(3):615–27, Feb 2015.
- Zysman, D., Méndez, J. M., Pando, B., Aliaga, J., Goller, F., & Mindlin, G. B. Synthesizing bird song. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 72(5 Pt 1):051926, Nov 2005.