



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Codificación neuronal de propiedades biomecánicas del canto en aves oscinas

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área Ciencias Biológicas

Fecha defensa: 14/10/2024

Lic. Javier Nahuel Lassa Ortiz

Directora de tesis: Dra. Ana Amador

Consejero de estudios: Dra. Lidia Szczupak

Lugar de trabajo: Laboratorio de Sistemas Dinámicos, Departamento de Física,
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2023

Resumen

El canto de las aves oscinas constituye un comportamiento aprendido (no innato) de alta complejidad. Durante el canto, el sistema respiratorio y el tracto vocal son controlados por instrucciones neuronales de un conjunto de núcleos dedicados a la producción del canto. Este sistema está establecido como un modelo neuroetológico para comprender una variedad de interrogantes biológicos respecto del comportamiento animal, la percepción y el aprendizaje, además de otros fenómenos de relevancia evolutiva y traslacional.

A lo largo de esta tesis presento una variedad de estudios hechos sobre el núcleo sensorimotor HVC (nombre propio). El mismo es una pieza fundamental en todo lo referido al aprendizaje, mantenimiento y producción del canto. En este núcleo, cuando el ave canta, se registra actividad neuronal correlacionada con el programa motor. Otra característica relevante del mismo es su respuesta selectiva cuando se reproduce una grabación de su propio canto mientras el ave duerme. La respuesta se denomina selectiva ya que no se observa un aumento de la actividad neuronal si se reproduce el canto de un conoespecífico, su propio canto reproducido en reversa u otros sonidos como ruido blanco o tonos. En esta tesis generamos versiones modificadas acústicamente del canto propio y evaluamos la selectividad en la respuesta neuronal que generan los mismos. De esta manera podemos estudiar cómo es la representación del canto en HVC.

En una primera aproximación, evaluamos la selectividad de la respuesta neuronal frente al canto propio y versiones de este con filtros en bandas de frecuencia. Utilizamos filtros pasa-altos y pasa-bajos para estudiar cuales son las frecuencias más relevantes para el núcleo HVC. Teniendo en cuenta los resultados conjuntos de las respuestas generadas por los cantos filtrados, podemos afirmar que el rango de frecuencias más relevante para generar respuesta auditiva en HVC está entre los 1.5 kHz y los 5.5 kHz. Además, se examinó el potencial local de campo (LFP por sus siglas del inglés *Local Field Potential*) durante el feedback auditivo en animales dormidos, revelando que la banda de 30 Hz mostraba un aumento de fuerza durante la presentación del canto propio. Este hallazgo contrasta con estudios previos hechos en aves cantando, sugiriendo posibles diferencias en la actividad neural durante la producción del canto propio y la percepción auditiva del mismo.

Por otro lado, Mindlin y colaboradores desarrollaron previamente un modelo biomecánico de producción vocal que genera canto de aves sintéticos. Este modelo no tiene como única fortaleza su buen desempeño, sino que, a su vez refleja los procesos mecánicos y fisiológicos intervinientes en la producción del canto. Esto es consecuencia directa de su fuerte inspiración en la biofísica de la producción vocal. Por un lado, se modela la siringe, el órgano responsable de la generación del sonido, y por otro, el tracto vocal conformado por la tráquea, glotis, cavidad orofaríngea-esofágica y pico. Cuando el sonido generado por la siringe se propaga por el tracto vocal, el mismo modula su composición espectral. Cada segmento del tracto se comporta como un filtro pasivo con características particulares que dependen directamente de las dimensiones de las cavidades. En el modelo biofísico podemos generar cambios de parámetros relacionados con los tamaños de las distintas componentes del tracto vocal y así generamos cantos sintéticos que reflejan estas modificaciones. Como parte del trabajo de esta tesis, agregamos parámetros de escaleo al modelo. Este nos permite modificar de manera independiente el tamaño del cuello (tráquea) y cabeza (cavidad orofaríngea-esofágica). En consecuencia, podemos hacer que el modelo se transforme en un generador de cantos de aves con variaciones de tamaño determinadas por el investigador.

El escaleo del modelo puede hacerse siguiendo leyes de escala naturales o variando de manera independiente el tamaño de la tráquea y la cavidad orofaríngea-esofágica. Un objetivo de esta tesis fue intentar dilucidar si existe una diferencia en la respuesta neuronal de HVC frente a estímulos sintéticos que siguen las leyes de escala naturales y estímulos que no lo hacen. Los resultados preliminares desarrollados en esta tesis indican que, si los cantos sintéticos respetan las leyes de escala, no hay diferencias significativas con el canto sintético “ideal” (tamaño estándar). En cambio, si el parámetro es distinto para ambas componentes del tracto vocal (no se respetan las leyes de escala), la respuesta neuronal disminuye significativamente.

Podemos concluir que el núcleo HVC posee una representación del canto propio donde las frecuencias relevantes se encuentran entre los 0.3 – 5.5 kHz. Por otro lado, logramos agregar exitosamente parámetros de escala a un modelo biomecánico de producción vocal de cantos de aves previamente desarrollado en el laboratorio por Mindlin y colaboradores. Esto nos permitió generar una batería de estímulos que luego utilizamos para evaluar la respuesta neuronal frente a los mismos. Los resultados preliminares de esos experimentos nos sugieren que HVC codifica leyes de escala y que por eso tiene una respuesta diferencial frente a estímulos que respetan las mismas y los que no lo hacen. Esta tesis es un trabajo

fuertemente interdisciplinario que combina modelado biomecánico con registros neuronales para avanzar en el entendimiento de la codificación neuronal en un núcleo sensorimotor clave para la producción y procesamiento auditivo del canto de aves.

Palabras clave: canto de aves, biomecánica, registros neuronales

Abstract

“Neuronal Encoding of Biomechanical Properties of Song in Oscine Birds”

The songbird's singing is a learned (not innate) complex behavior. During singing, the respiratory system and vocal tract are controlled by neural instructions from a set of nuclei dedicated to song production. This system is established as a neuroethological model to understand various biological questions regarding animal behavior, perception, and learning, as well as other phenomena of evolutionary and translational relevance.

In this thesis, I present a variety of studies on the sensorimotor nucleus HVC (proper name). It is a fundamental piece in everything related to the learning, maintenance, and production of song. In this nucleus, when the bird sings, neural activity correlated with the motor program is recorded. Another relevant feature is its selective response when a recording of its own song is played while the bird sleeps. The response is called selective because there is no increase in neural activity if the song of a conspecific, its own song played in reverse, or other sounds like white noise or tones, is played. In this thesis, we generated acoustically modified versions of the own song and evaluated the selectivity in the neural response they generate. In this way, we can study how the song is represented in HVC.

Initially, we evaluated the selectivity of the neural response to the own song and versions of it with frequency band filters. We used high-pass and low-pass filters to study which frequencies are most relevant for the HVC nucleus. Considering the combined results of the responses generated by the filtered songs, we can affirm that the most relevant frequency range for generating an auditory response in HVC is between 1.5 kHz and 5.5 kHz. Additionally, the local field potential (LFP) was examined during auditory feedback in sleeping animals, revealing that the 30 Hz band showed increased strength during the presentation of the own song. This finding contrasts with previous studies in singing birds, suggesting possible differences in neural activity during song production and auditory perception of the song.

Furthermore, Mindlin and collaborators previously developed a biomechanical model of vocal production that generates synthetic bird songs. This model not only performs well

but also reflects the mechanical and physiological processes involved in song production due to its strong inspiration from the biophysics of vocal production. The syrinx, the organ responsible for sound generation, is modeled, along with the vocal tract comprising the trachea, glottis, oropharyngeal-esophageal cavity, and beak. When the sound generated by the syrinx propagates through the vocal tract, it modulates its spectral composition. Each segment of the tract acts as a passive filter with characteristics directly dependent on the dimensions of the cavities. In the biophysical model, we can generate parameter changes related to the sizes of the various components of the vocal tract, producing synthetic songs reflecting these modifications. As part of this thesis, we added scaling parameters to the model, allowing us to independently modify the neck (trachea) and head (oropharyngeal-esophageal cavity) sizes. Consequently, the model can generate bird songs with size variations determined by the researcher.

The model scaling can follow natural scaling laws or independently vary the trachea and oropharyngeal-esophageal cavity sizes. One objective of this thesis was to investigate whether there is a difference in HVC neural response to synthetic stimuli that follow natural scaling laws versus those that do not. Preliminary results developed in this thesis indicate that if the synthetic songs respect scaling laws, there are no significant differences with the "ideal" synthetic song (standard size). However, if the parameter differs for both vocal tract components (not respecting scaling laws), the neural response significantly decreases.

We can conclude that the HVC nucleus has a representation of the own song where the relevant frequencies are between 0.3 – 5.5 kHz. Additionally, we successfully added scaling parameters to a previously developed biomechanical model of bird song production by Mindlin and collaborators. This allowed us to generate a battery of stimuli used to evaluate the neural response to them. Preliminary results from these experiments suggest that HVC encodes scaling laws, resulting in a differential response to stimuli that respect these laws versus those that do not. This thesis is a highly interdisciplinary work combining biomechanical modeling with neural recordings to advance the understanding of neural coding in a sensorimotor nucleus key to bird song production and auditory processing.

Keywords: bird song, biomechanics, neural recordings

Agradecimientos

A mi familia, por apoyarme, escucharme y entender mi ausencia en estos 6 años.

A Iván, por sostenerme y contenerme siempre, sino, no estaría escribiendo estas líneas.

A la vieja generación, por enseñarme a trabajar en equipo.

A la nueva generación, por la hermosa compañía en el último y más duro tramo.

Al director del laboratorio, Gabriel Mindlin, por tirarme un salvavidas durante la pandemia que resultó ser una pieza clave y esencial de esta tesis.

A la directora de mi doctorado, Ana Amador, por haberme acompañado codo a codo todos estos años.

ÍNDICE

Índice.....	10
1 Introducción	12
1.1 El canto de las aves	12
1.2 Biomecánica del canto de las aves	14
1.3 Modelado biofísico de la producción vocal	16
1.4 Neurobiología del canto de aves	19
1.4.1 Circuito del canto	19
1.4.2 Actividad neuronal en núcleo HVC	22
1.4.3 Potencial de campo local	23
1.5 Procesamiento auditivo en diamantes mandarines	24
1.6 Sobre esta tesis.....	25
2 Métodos Generales	26
2.1 Generalidades	26
2.2 Sujetos experimentales	27
2.3 Grabación del canto y determinación del BOS	27
2.4 Implante del soporte craneal estereotáxico	28
2.5 Registro de actividad neuronal en ave dormida	30
2.6 Herramientas de análisis de datos.....	32
3 Respuesta neuronal a cantos con filtros acústicos	33
3.1 Motivación	33
3.2 Métodos específicos	33
3.3 Resultados.....	35
3.3.1 Respuesta de múltiples unidades neuronales a cantos con filtros acústicos.....	35
3.3.2 Respuesta del potencial de campo local	41
3.4 Conclusiones	46
4 Modelado de cantos variando parámetros biomecánicos	49
4.1 Motivación	49
4.2 Métodos específicos	49
4.3 Resultados.....	50
4.3.1 Modificación de modelo biomecánico considerando leyes de escala	50
4.3.2 Modelado de cantos sintéticos	52

4.4	Conclusiones	57
5	Respuesta neuronal a cantos sintéticos	59
5.1	Motivación	59
5.2	Métodos específicos	59
5.3	Resultados.....	60
5.4	Conclusiones	66
6	Discusión y conclusiones generales	69
7	Apéndice	74
7.1	Grabación del canto y determinación del BOS	74
7.2	Modelado de cantos variando parámetros biomecánicos	75
7.3	Mapa de las exploraciones hechas en HVC	78
7.3.1	Mapas de exploraciones de todos los animales	78
8	Referencias.....	82
9	Tabla figuras	92

1 INTRODUCCIÓN

1.1 EL CANTO DE LAS AVES

El canto de las aves es un fenómeno ampliamente estudiado en la comunidad científica desde múltiples perspectivas. Este comportamiento no logra escapar a ninguna de las cuatro preguntas de Tinbergen, padre de la etología contemporánea (Bateson & Laland, 2013; Tinbergen, 1963). ¿Cuál es su utilidad? ¿Cómo se desarrolla en los individuos? ¿Cómo evolucionó en el árbol de la vida? y ¿Cómo son los mecanismos neuronales y biomecánicos para ejecutarlo? Todas estas son preguntas que la ciencia se hace a diario acerca del canto de las aves. Aunque el interés por este comportamiento se remonta a principios del siglo XX, el estudio del mismo se expandió con la llegada del sonógrafo en la década del 50, cuando lograron generarse los primeros sonogramas o también conocidos como espectrogramas (Amador & Mindlin, 2023). Esta herramienta basada en el teorema de descomposición de Fourier permitió generar imágenes a partir de sonidos, donde se representan las frecuencias que lo componen en función del tiempo. A partir de ese momento y hasta el día de hoy las investigaciones sobre el canto de las aves no se detuvieron, como consecuencia de la enorme riqueza que lo caracteriza. En particular y desde el punto de vista de los mecanismos neuronales y biomecánicos involucrados, es un comportamiento complejo que requiere una profunda interacción entre el sistema nervioso, los sistemas periféricos y el medio ambiente (Chiel & Beer, 1997).

En algunas especies de aves, y al igual que el habla humana, el canto es una conducta aprendida de un tutor y depende enteramente de la experiencia auditiva (Brainard & Doupe, 2013; Doupe & Kuhl, 1999). Cabe destacar que el aprendizaje vocal ocurre muy raramente en el reino animal. En la actualidad se considera que esta habilidad evolucionó de manera independiente en humanos, murciélagos, cetáceos, pinnípedos, elefantes y en tres grupos de aves (loros, colibríes y oscinos) (Janik & Knörnschild, 2021; Jarvis, 2004; Searcy & Nowicki, 2019). La capacidad de las aves de generar vocalizaciones complejas aprendidas y las varias ventajas que poseen como modelo animal experimental (principalmente su pequeño tamaño y, en algunos casos, la posibilidad de criarlos en cautiverio) hicieron de ellas un modelo de estudio ampliamente usado para responder preguntas relacionadas con los mecanismos neuronales y biomecánicos de la producción vocal.

En el desarrollo de esta tesis doctoral usamos como modelo animal a ejemplares macho de “diamante mandarín” (*Taeniopygia guttata*), un ave canora originaria de Australia perteneciente al orden de los oscinos. En esta especie, los individuos viven en bandadas y solo los machos adultos cantan. El canto no es estacional y se mantiene constante a lo largo de la vida del animal. El mismo es utilizado principalmente para cortejar a las hembras y mantener la cohesión social. En diamantes mandarines, las parejas forman lazos monógamos que perduran de por vida (Loning et al., 2023). Esta especie se convirtió en uno de los modelos experimentales más usados en neuroetología (Griffith et al., 2021). Cuando aún son juveniles, los machos aprenden a cantar imitando (aunque sin copiar con exactitud) el canto de algún ejemplar adulto con el que cohabiten, generalmente el del padre (Böhner, 1983; Williams, 1990). A los 80 días de edad cristalizan el canto aprendido y lo mantienen constante el resto de su vida adulta (Slater et al., 1988). Como consecuencia de que cada individuo no copió con exactitud el canto de su tutor, sino que incluyó algunas modificaciones, cada ejemplar adulto tiene un canto único (Böhner, 1983). Tradicionalmente la comunidad hace referencia a esta versión madurada y estable como “canto propio” o BOS por sus siglas del inglés *Bird’s Own Song*.

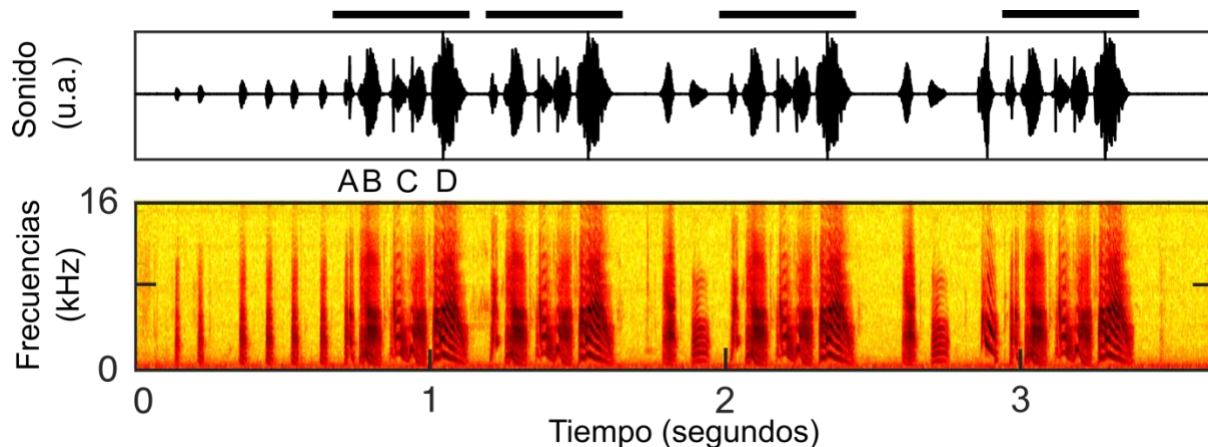


Figura 1. Canto de un diamante mandarín. En el panel de arriba se muestra la señal del sonido y en el panel de abajo su espectrograma (ver texto). Las letras A, B, C y D indican sílabas distintas que juntas conforman un motivo. Cada sílaba se separa de la otra por un breve silencio. Las barras negras señalan un mismo motivo que se repite cuatro veces durante la ejecución de este canto. Las sílabas anteriores al primer motivo se denominan “notas introductorias” y las que se encuentran entre los motivos “sílabas de transición”.

Los cantos de los diamantes mandarines están estructurados de una manera particular donde la sílaba es considerada como la mínima unidad del canto (Brenowitz et al., 1997). Por sílaba se entiende al sonido emitido por un solo pulso espiratorio o una combinación

de sonidos sin silencios entre ellos. Cada tipo de sílaba es una combinación única de frecuencia fundamental y espectros. En esta especie las sílabas tienen una alta riqueza espectral consecuencia de la gran cantidad de armónicos que poseen. El rango de frecuencias en donde podemos encontrar sonido en el canto de los diamantes mandarines abarca desde los 300 Hz, donde se ubican las frecuencias fundamentales más bajas (Goller & Riede, 2013), hasta los 15 kHz, donde los armónicos aún son audibles. En la Figura 1 se muestra el canto propio de un diamante mandarín adulto. Las letras A, B, C y D denotan sílabas distintas. Una secuencia de sílabas que se repite varias veces en un canto se denomina “motivo”. En la Figura 1, indicado con líneas negras, se puede ver un mismo motivo repetido cuatro veces. Estos suelen ser estructuras con muy poca variabilidad, aunque el último motivo que compone el canto puede a veces presentarse incompleto (no se vocalizan algunas de las sílabas finales). Por otro lado, las sílabas anteriores al primer motivo se llaman “notas introductorias”. Se caracterizan por ser sílabas cortas y sencillas que suelen repetirse antes del canto de los diamantes mandarines. Los sonidos que encontramos entre los motivos son sílabas de transición. La poca variabilidad que puede existir en los cantos de un mismo animal está dada por la cantidad de veces que se repiten los motivos y las transiciones que ocurren entre ellos. Aunque encontramos ligeras variaciones a lo largo de un día, siempre hay uno que el ave canta con mayor probabilidad.

1.2 BIOMECÁNICA DEL CANTO DE LAS AVES

Es posible separar el aparato vocal de los oscinos en dos grandes partes según su funcionalidad. Primero tenemos la fuente de generación del sonido conformada por un órgano especializado llamado siringe. Luego, el sonido generado allí viaja por el resto del tracto vocal conformado por la tráquea, cavidad orofaríngea-esofágica (OEC por sus siglas del inglés *oropharyngeal-oesophageal cavity*) y el pico (ver Figura 2). Durante el trayecto por estas cavidades el sonido es filtrado de forma pasiva, modulando su composición espectral.

La siringe es un órgano bipartito ubicado en la parte superior de los bronquios justo antes de la unión con la tráquea (ver Figura 2). En cada bronquio podemos encontrar un par de membranas llamadas “labios” compuestas principalmente por fibras de colágeno (Goller & Riede, 2013). Las aves pueden controlar la tensión de estas membranas con la ayuda

de músculos especializados (conocidos como músculos siríngeos) ubicados por fuera de la tráquea y bronquios (Döppler et al., 2018; Goller & Suthers, 1996).

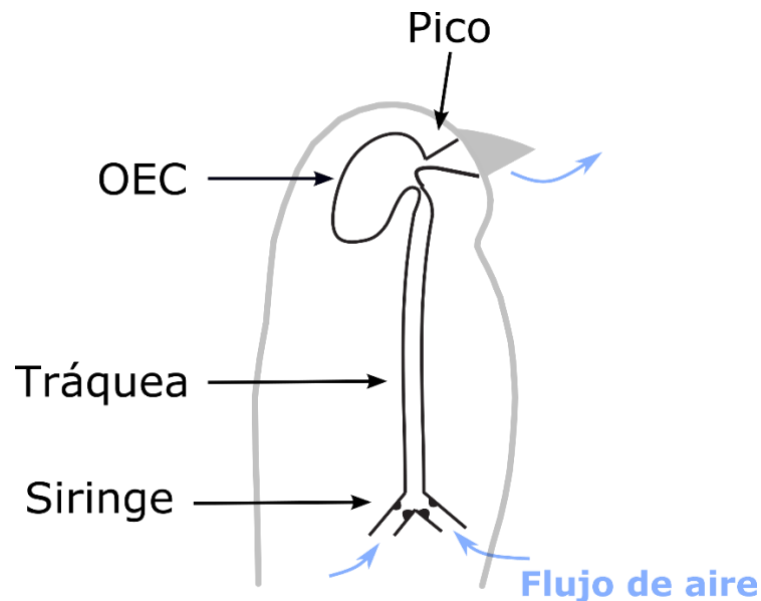


Figura 2. Esquema del aparato fonador de las aves oscinas. Los principales elementos que lo conforman son la siringe (fuente generadora del sonido) y el tracto vocal formado por la tráquea, cavidad orofaríngeo-esofágica y el pico. Figura modificada de (Amador et al., 2013).

El sonido en la siringe se produce mediante oscilaciones autosostenidas del tejido inducidas por el flujo de aire (Elemans et al. 2015; Goller & Larsen, 1997; Jensen et al., 2007; Larsen & Goller, 2002). Se puede asumir que el mecanismo básico para la generación de oscilaciones autosostenidas es similar al de la laringe de humanos ya que consiste en oscilaciones generadas por el mecanismo MEAD (por las siglas en inglés de *myoelastic-aerodynamic mechanism*) (Düring and Elemans 2016; Elemans 2014; Goller & Riede, 2013; Titze, 1988). Este mecanismo de las cuerdas vocales en humanos fue adaptado exitosamente por Mindlin y colaboradores en trabajos teóricos sobre la biofísica de la producción vocal en pájaros cantores (e.g Laje & Mindlin, 2005; Bush et al. 2018; Perl et al., 2011). Más aún, el modelo basado en estos principios, se puso a prueba en trabajos teórico-experimentales (Mindlin et al. 2003; Amador et al., 2013; Amador & Mindlin, 2021) donde se mostró su alta calidad de síntesis (más detalles en Capítulo 1.3).

El flujo del aire está controlado por los músculos inspiratorios y espiratorios. En la obra seminal (Goller y Suthers 1996a) revelaron que la presión del aire establece las condiciones necesarias para la fonación, generando un flujo adecuado a través del lumen

de la siringe. Además, este trabajo y otros más recientes mostraron que, en algunas especies, el control de la frecuencia fundamental está activamente regulado por la actividad de los músculos siríngeos (Döppler et al., 2018; Goller & Suthers, 1996).

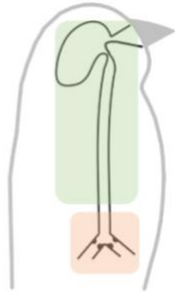
Una vez fuera de la siringe, el sonido atraviesa múltiples cavidades. La acústica del tracto vocal de aves canoras, aunque no se comprende completamente, se sabe que es importante para la comunicación (Dooling, 1992b; Hienz et al., 1981) y para la física de la producción del sonido (Amador et al., 2013; Arneodo et al., 2011; Perl et al., 2011). Las propiedades de resonancia del tracto vocal están determinadas por su geometría y, durante el canto, la mayoría de las aves cambian dinámicamente esta geometría y, por lo tanto, ajustan las propiedades de resonancia (Goller et al., 2004; Hoese et al., 2000; Nowicki, 1987; Riede et al., 2006). Inicialmente, los estudios se centraron en el efecto de los movimientos del pico en la resonancia acústica (Goller et al., 2004; Hoese et al., 2000; Podos et al., 1995; Westneat et al., 1993). Sin embargo, relaciones inconsistentes entre el movimiento del pico y las características acústicas en algunas especies (Fletcher et al., 2006; Goller et al., 2004) concluyeron que la acústica de la apertura del pico tiene un rol menor en el filtrado del sonido (Fletcher et al., 2006). Por otro lado, trabajos de simulación por computadora que incluyen todas las principales cavidades del tracto vocal superior predijeron que la OEC introducen una resonancia principal cuya frecuencia depende del volumen de la misma, mientras que el resto de los picos de resonancia provienen de la cavidad traqueal (Fletcher et al., 2006; Kazemi et al., 2023). En diamantes mandarines, la acústica del tracto vocal es particular. A diferencia de las especies con canciones tonales (pobres en armónicos), el ajuste de las estructuras del tracto vocal en diamantes mandarines está vinculado al énfasis de los armónicos (Ohms et al., 2010; Riede et al., 2013), en lugar de al seguimiento de la frecuencia fundamental de las sílabas de la canción (Goller et al., 2004; Ohms et al., 2010; Williams, 1990).

1.3 MODELADO BIOFÍSICO DE LA PRODUCCIÓN VOCAL

Muchas descripciones de la producción de sonido vocal se basan en el trabajo seminal de (Titze, 1988). Originalmente propuesto como un modelo para explicar el movimiento de las cuerdas vocales en humanos, también resultó adecuado para la producción del canto de las aves. En el trabajo (Goller & Larsen, 1997) quedó demostrado que la fonación se

inicia en la siringe de las aves canoras cuando los labios de la misma vibran dentro del lumen bronquial estimuladas por el flujo de aire.

Desde ese punto de partida, Mindlin y colaboradores desarrollaron y perfeccionaron a lo largo de los años un modelo biofísico diseñado para sintetizar canto de aves (Amador et al., 2013; Amador & Mindlin, 2008; Gardner et al., 2001; Mindlin, 2018; Mindlin et al., 2003; Perl et al., 2012; Sitt et al., 2008, 2010). El mismo incluyó un modelo para la dinámica de la siringe que funciona como fuente de sonido (Figura 3, ecuaciones 1 y 2 en naranja), así como un modelo del tracto vocal superior (Figura 3, ecuaciones 3, 4, 5 y 6 en verde). Además, supone simplificaciones que permiten reducir el número de parámetros inspirados fisiológicamente necesarios para sintetizar el canto.



$$\left[\begin{array}{l} \frac{dx}{dt} = y \quad (1) \\ \frac{dy}{dt} = -\alpha(t)\gamma^2 - \beta(t)\gamma^2x - \gamma^2x^3 - \gamma x^2y + \gamma^2x^2 - \gamma xy \quad (2) \\ \frac{di_1}{dt} = i_2 \quad (3) \\ \frac{di_2}{dt} = \frac{-i_1}{L_g C_h} - R_h \left(\frac{1}{L_b} + \frac{1}{L_g} \right) i_2 + i_3 \left(\frac{1}{L_g C_h} - \frac{R_b R_h}{L_b L_g} \right) + \frac{1}{L_g} \frac{dV_{ext}(t)}{dt} + \frac{R_h V_{ext}(t)}{L_g L_b} \quad (4) \\ \frac{di_3}{dt} = \frac{L_g i_2}{L_b} - \frac{R_b i_3}{L_b} - \frac{V_{ext}(t)}{L_b} \quad (5) \\ V_{ext}(t) = f(L_t, t) \quad (6) \end{array} \right.$$

Figura 3. Modelo dinámico del aparato fonador. Las primeras dos ecuaciones (naranja) describen a la siringe que es la fuente generadora del sonido, donde x representa la posición de los labios sirínges, γ es un parámetro de escala estático y los parámetros adimensionales Alfa (α) y Beta (β) son dependientes del tiempo. Estos últimos correlacionan con la presión del aire que llega a la siringe y la tensión de los labios, respectivamente. El resto del sistema (verde) modela la propagación del sonido a lo largo del tracto vocal. (explicación de los términos de las ecuaciones 3,4,5 y 6 en el texto)

La dinámica de la siringe (fuente de sonido) puede modelarse a partir de las ecuaciones de Newton para cada labio, cada uno de los cuales se piensa como un tejido elástico capaz de desplazarse lateralmente y oscilar de forma autosostenida. Esto permite computar la presión entre los labios, un paso esencial en la derivación de las ecuaciones biomecánicas del movimiento. A su vez, ese sistema de ecuaciones puede ser reducido a un sistema más sencillo llamado “forma normal” (Mindlin, 2018). La forma normal de un sistema

representa el mínimo conjunto de ecuaciones no lineales capaz de reproducir los comportamientos dinámicos encontrados en el sistema original. Las ecuaciones que emergen del modelo simplificado son las que se muestran en la Figura 3 (ecuaciones 1 y 2 en naranja), donde x representa la posición de los labios sirínges y, por lo tanto, describe la dinámica de una fuente de fonación. Gamma (γ) es un parámetro de escala estático y los parámetros adimensionales Alfa (α) y Beta (β) son dependientes del tiempo. Estos últimos correlacionan con la presión del aire que llega a la siringe y la tensión de los labios, respectivamente (Mindlin et al., 2003; Perl et al., 2011). Ambas variables son controladas por el ave durante la ejecución del canto.

A este modelo para la fuente sonora se le agrega el filtrado dado por el tracto vocal superior: la tráquea, la OEC y el pico. En múltiples trabajos teóricos se representó al tracto como una serie de tubos (Fletcher et al., 2006; Gardner et al., 2001; Laje et al., 2002) y en un trabajo seminal de Mindlin y colaboradores modelaron al tracto vocal como un sistema dinámico (Perl et al., 2011). Lo dividieron en tres grandes partes: un tubo abierto en un extremo (representando la tráquea), seguido por un resonador de Helmholtz (representando la OEC), finalmente conectada al pico. Usando las analogías que existen entre los sistemas acústicos y los circuitos eléctricos se llega a modelar al tracto vocal como se muestra en la Figura 3 (ecuaciones 3, 4, 5 y 6, en verde). Las analogías entre la biomecánica y el circuito se esquematizan en la Figura 4, donde: R_b y L_b corresponden a la resistencia e inductancia del circuito que representa al pico (*beak* en inglés), R_h y C_h corresponden a la resistencia y capacitancia del circuito que representa la OEC, modelada como un resonador de *Helmholtz*, L_g corresponde a la inductancia del circuito que representa la *glotis*, i representa la corriente eléctrica teórica y P_s la diferencia de presión entre el aire que ingresa a la glotis y el que sale del pico.

Al utilizar un modelo que simula la tráquea como un tubo cerrado-abierto, se logra explicar la presencia generalizada de frecuencias resaltadas alrededor de 2.5 kHz y 7.5 kHz, típicas de las vocalizaciones de los diamantes mandarines. Por otro lado, la primera resonancia de la OEC también es una frecuencia dominante y su valor depende fuertemente del volumen de la cavidad. Estudios experimentales hechos en animales cantando ubican a la resonancia de la OEC en diamantes mandarines dentro del rango 2.5 kHz a 5.0 kHz (Riede et al., 2013).

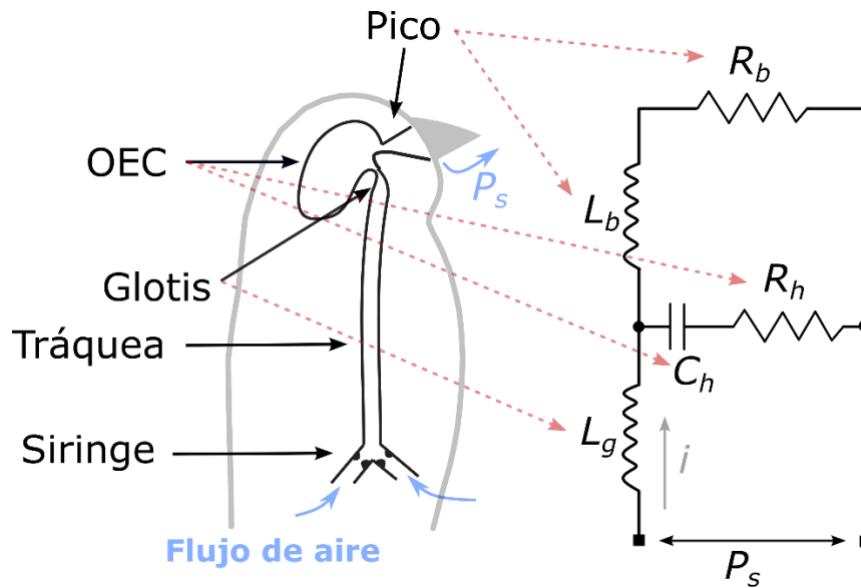


Figura 4. Analogía entre el sistema acústico del tracto vocal y un circuito eléctrico. En este esquema se indican con flechas las equivalencias entre cavidades y elementos eléctricos si se modela al tracto vocal como un circuito. R_b y L_b corresponden a la resistencia e inductancia en el circuito que representa al pico (beak en inglés), R_h y C_h a la resistencia y capacitancia en el circuito que representan la OEC, modelada como un resonador de Helmholtz, L_g a la inductancia en el circuito que representa la glotis, i representa la corriente eléctrica teórica y P_s la diferencia de presión entre el aire que ingresa a la glotis y el que sale del pico.

1.4 NEUROBIOLOGÍA DEL CANTO DE AVES

1.4.1 Circuito del canto

Antes de comenzar con una descripción de la neurobiología de las aves oscinas, es útil comentar algunas de las principales tareas que el cerebro debe llevar a cabo para permitir el aprendizaje vocal. Una es generar comandos motores para la ejecución del canto. Otra es la posibilidad de variar estos comandos motores para que coincidan con el canto del tutor. La coincidencia, que debe ser precisa, depende de la capacidad del cerebro para utilizar la retroalimentación auditiva para comparar el canto ejecutado con el canto memorizado del tutor. Una hipótesis sobre cómo se lleva adelante este proceso es que existe un circuito comparador, cuyas entradas son la señal de retroalimentación auditiva y el canto del tutor memorizado (Mooney, 2009). La naturaleza de este comparador sigue siendo hipotética y no se comprende cómo se representa en el cerebro de las aves la retroalimentación auditiva, el canto memorizado y las instrucciones motoras. En cambio en los últimos años, se investigó con relativo éxito los mecanismos neuronales necesarios para cantar y generar plasticidad en el canto de ejemplares adultos. Dado que la variabilidad en el canto puede ser un ingrediente importante para el aprendizaje, un

objetivo es identificar dónde se originan las señales de variabilidad en el cerebro y cómo estas señales podrían ser afectadas por la retroalimentación auditiva. Por lo tanto, es útil explorar los mecanismos neuronales que permiten la ejecución del canto y considerar cómo esta maquinaria puede ser aprovechada por el sistema auditivo para permitir el aprendizaje del canto.

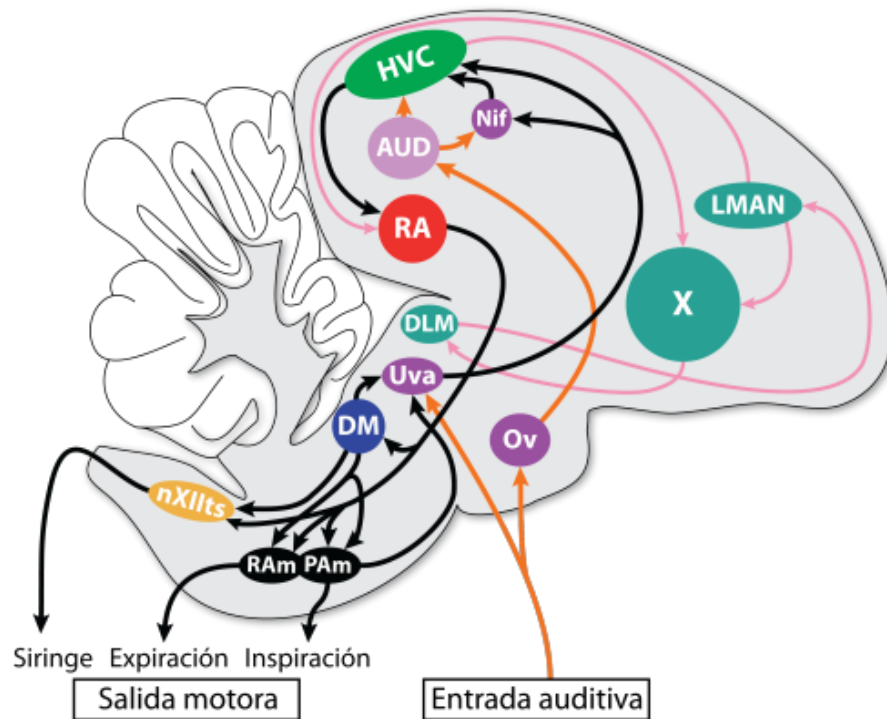


Figura 5. Sistema del canto. Esquema de los núcleos neuronales y las conexiones que forman parte de la vía motora (negro), vía del aprendizaje (rosa) y vía auditiva (naranja). Notar que el núcleo HVC (nombre propio) forma parte de la vía motora y del aprendizaje además de recibir conexiones aferentes de la vía auditiva. “AUD” no representa a un núcleo en particular sino a núcleos altamente interconectados dedicados al procesamiento auditivo (Campo L, CM y NCM). **Abreviaturas:** nXIIIts, porción tráqueo-siríngica del núcleo hipogloso; RA, núcleo robusto del arcopalio; DM, núcleo intercolicular dorso-medial; RAm, núcleo Retroambigualis; PAm, núcleo Parambigualis; Uva, núcleo Uvaeformis; Nif, núcleo interfazial del nidopalio; Ov, núcleo Ovoidalis; LMAN, núcleo lateral magnocelular del nidopalio anterior; DLM, núcleo lateral dorsal del tálamo medial; CM, mesopalio caudal; NCM, nidopalio medial caudal. Figura tomada de (Boari, 2019).

Un circuito especializado en el cerebro llamado “sistema del canto”, esencial para la ejecución y el aprendizaje del mismo, diferencia el cerebro de los pájaros cantores del cerebro de las aves que no aprenden a vocalizar (Kroodsma & Konishi, 1991; Nottebohm et al., 1976, 1982; Wild, 1997b, 1997a, 2004). El sistema de canto (Figura 5) comprende dos vías principales: una vía motora del canto (Figura 5, flechas negras) y una vía del cerebro anterior o “vía del aprendizaje” (Figura 5, en rosa). Ambas reciben información del núcleo telencefálico HVC (nombre propio) (Nottebohm et al., 1976, 1982). En aves

adultas, lesiones en la vía motora afectan gravemente el canto o lo eliminan por completo, lo que indica un papel esencial en la ejecución del mismo (Nottebohm et al., 1976; Simpson & Vicario, 1990). En cambio, lesiones en la vía del cerebro anterior no afectan el canto ya aprendido, pero sí reducen su variabilidad o plasticidad, características fundamentales del aprendizaje sensoriomotor (Bottjer et al., 1984; Ölveczky et al., 2005; Scharff & Nottebohm, 1991; Sohrabji et al., 1990). Neuronas en ambas vías muestran actividad relacionada con el canto (Hahnloser et al., 2002; Hessler & Doupe, 1999; Leonardo, 2004; Leonardo & Fee, 2005; McCasland, 1987; McCasland & Konishi, 1981; Yu & Margoliash, 1996), y muchas de estas neuronas también responden a la estimulación proveniente de la vía auditiva (Figura 5, flechas naranjas) (Doupe & Konishi, 1991; Katz & Gurney, 1981; Margoliash, 1983, 1986; McCasland & Konishi, 1981; Vicario & Yohay, 1993). En su conjunto, el sistema de canto es una red altamente distribuida que abarca gran parte del cerebro y transmite señales motoras, así como flujos de información auditiva y propioceptiva.

En particular, el núcleo HVC es un componente común para la vía motora y la del aprendizaje, al mismo tiempo que sirve como un importante objetivo de las vías auditivas ascendentes y las vías motoras recurrentes. En comparación con el resto de las estructuras del sistema del canto, HVC es relativamente grande (Nottebohm & Arnold, 1976; Vellema et al., 2011). Este núcleo cuenta con dos poblaciones distintas de neuronas de proyección (Dutar et al., 1998; Fortune & Margoliash, 1995; Katz & Gurney, 1981; Kirn et al., 1991; Mooney, 2000). A uno de estos grupos de neuronas se las conoce como HVC_{RA}, ya que inervan el núcleo telencefálico del canto RA, que a su vez envía axones hacia el tronco encefálico, donde terminan en neuronas motoras de la siringe y neuronas premotoras respiratorias (Nottebohm et al., 1976; Wild, 1993). El otro tipo de neuronas proyectoras se llaman HVC_x, ya que inerva el área X, que junto con el núcleo talámico DLM y el núcleo telencefálico anterior LMAN, forma una vía a través del cerebro anterior que conecta indirectamente HVC con RA (Foster & Bottjer, 1998; Luo et al., 2001; Nottebohm et al., 1982; Okuhata & Saito, 1987). Los axones de las neuronas proyectoras de LMAN se bifurcan, una rama forma sinapsis excitatorias en RA (Mooney 1992), mientras que la otra rama termina en el área X, formando un bucle de retroalimentación dentro de la vía del cerebro anterior (Luo et al., 2001; Nixdorf-Bergweiler et al., 1995).

1.4.2 Actividad neuronal en núcleo HVC

Grabaciones electrofisiológicas pioneras en el núcleo HVC de aves cantoras detectaron un aumento de la actividad neuronal durante la ejecución del canto y también, sorprendentemente, detectaron respuesta neuronal cuando se reproducía una grabación del canto propio (BOS), siempre y cuando el animal estuviera dormido o anestesiado (McCasland & Konishi, 1981). Al comparar la respuesta neuronal generada durante la producción vocal con la respuesta durante la reproducción de una grabación del BOS, los investigadores hallaron que los patrones de disparo eran altamente similares.

Otra característica relevante que encontraron estos trabajos seminales fue la selectividad de la respuesta neuronal de HVC frente a los estímulos auditivos. Este núcleo muestra algunas de las respuestas sensoriales más selectivas descritas hasta ahora. Solo se observó respuesta neuronal cuando se reproducía el canto propio del animal (BOS), y no así si se reproducía el canto de otro individuo de la misma especie (conespecífico o CON), su canto propio reproducido en forma reversa (REV) o tonos (Doupe & Konishi, 1991; Margoliash, 1983, 1986; Volman, 1996). La sofisticada selectividad de las neuronas de HVC frente a los estímulos auditivos llamó rápidamente la atención de la comunidad científica.

Estudios subsiguientes, en su mayoría en diamantes mandarines anestesiados o dormidos, detectaron respuestas auditivas (aunque menos selectivas) en todo el sistema del canto (Doupe & Konishi, 1991; Margoliash, 1983, 1986; Williams & Nottebohm, 1985). Diversas investigaciones propusieron al núcleo HVC como la fuente de la respuesta auditiva generalizada dentro del sistema del canto (Doupe & Konishi, 1991; Mooney, 2000; Vicario & Yohay, 1993).

Es importante destacar que, inicialmente, se observó una respuesta neuronal al estímulo auditivo BOS en el núcleo HVC solo cuando el ave estaba dormida o anestesiada. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que, en otras especies de aves, existen neuronas en el núcleo HVC que presentan el mismo patrón de disparo tanto cuando el ave canta como cuando escucha una grabación del BOS, incluso estando despierta (Prather et al., 2008). Esto contrasta con lo que ocurre en los diamantes mandarines, donde la respuesta al estímulo auditivo BOS en el núcleo HVC solo ocurre si el ave se encuentra dormida o anestesiada.

Algunos autores sospechan que las características salientes del BOS que evocan la respuesta auditiva selectiva son las frecuencias fundamentales del canto. En un trabajo relativamente reciente (Fukushima et al., 2015) encontraron que las bajas frecuencias (por debajo de 1.5 kHz) son relevantes para el núcleo HVC pero sin hacer un análisis exhaustivo sobre todo el rango de frecuencias que posee el canto de estos animales.

1.4.3 Potencial de campo local

Un electrodo extracelular colocado en el cerebro mide el potencial de campo medio, compuesto por la actividad eléctrica generada por diversos procesos neuronales alrededor de la punta del electrodo. El rango de las altas frecuencias (a partir de los 500 Hz) está compuesta por la actividad de disparo de neuronas “cercanas” (Gray et al., 1995; Henze et al., 2000; Humphrey & Schmidt, 1990). A esta señal se la suele llamar “actividad de múltiples unidades” (MUA por sus siglas del inglés *Multi Unit Activity*). En contraste, las fluctuaciones de voltaje de baja frecuencia (menores a 500 Hz) reflejan un aspecto diferente. A este tipo de señal se la conoce como potencial de campo local o LFP (por sus siglas del inglés *Local Field Potential*) y se cree que mide principalmente señales sinápticas sincronizadas (Mitzdorf, 1985, 1987), oscilaciones subumbrales de membrana (Kamondi et al., 1998) y potenciales de acción después del disparo (Buzsáki & Kandel, 1998). Un trabajo teórico-experimental del Laboratorio de Sistemas Dinámicos muestra cómo un modelo de la actividad sináptica sincronizada, en ciertas condiciones, puede explicar la actividad del LFP (Boari et al., 2019). La clasificación del LFP se separa tradicionalmente en bandas de frecuencia distinta (Berens, 2008), conocidas como: delta (0-4 Hz), theta (4-10 Hz), alfa (8-12 Hz), beta (15-30 Hz), gamma (30-90 Hz) y gamma-alta (80-200 Hz).

Existen pocas investigaciones sobre el comportamiento del LFP en el sistema del canto. Trabajos anteriores del Laboratorio de Sistemas muestran como esta actividad está sincronizada con la envolvente del canto en canarios (Boari et al., 2022), algo similar a lo que ocurre con algunas sílabas en regiones frontales en humanos (Assaneo et al., 2019; Poeppel & Assaneo, 2020). En diamantes mandarines, los dos trabajos más relevantes en el área reportan un aumento en la fuerza de la banda de 30 Hz y gamma-alta durante la ejecución del canto (Brown et al., 2021; Markowitz et al., 2015). Mas allá de estos trabajos, no hay más investigaciones relevantes en el área.

1.5 PROCESAMIENTO AUDITIVO EN DIAMANTES MANDARINES

En una serie de estudios realizados a fines de los años 80 y principios de los 90, el investigador Robert Dooling encabezó investigaciones sobre la percepción auditiva en diversas especies de aves (Dooling, 1992b, 1992a; Dooling et al., 1992; Okanoya & Dooling, 1987). Estas investigaciones revelaron que los diamantes mandarines poseen rangos de percepción auditiva y curvas de sensibilidad similares a las de los seres humanos, entre los 20 Hz y 20 kHz (Hashino & Okanoya, 1989). En paralelo a estos descubrimientos, hubo un enorme avance en la comprensión de la neurobiología del procesamiento auditivo.

Las entradas sensoriales auditivas muestran una rápida bifurcación al ingresar al sistema nervioso central, teniendo los primeros relevos a nivel del núcleo ovoidalis (Ov) y el núcleo uvaeformis (Uva) (Amador & Margoliash, 2011). Uva, integrante de la vía motora del circuito del canto y en particular de las vías motoras recurrentes, tiene proyecciones hacia el núcleo HVC, proporcionando una entrada indirecta de información auditiva a través de la vía motora. Por otro lado, Ov sirve como una vía de entrada adicional para la información auditiva. Este núcleo establece conexiones con un conjunto de núcleos dedicados al procesamiento auditivo, indicados como "AUD" en la Figura 5. Las estructuras que comprenden "AUD" se conectan de manera directa con HVC o de manera indirecta a través de Nif (núcleo de la vía motora recurrente). En estos núcleos, denominados "AUD", se observa la mayor selectividad neuronal dentro del circuito auditivo. Muchas neuronas responden de manera más pronunciada al canto de conspecíficos, seguido por el canto de heteroespecíficos, mientras que los estímulos auditivos no vinculados al canto, como tonos o ruido blanco, tienen un impacto limitado o nulo (Chew et al., 1996; Mello et al., 1992).

Son pocos los estudios acerca de cuáles son las características meramente acústicas relevantes para el núcleo HVC. En un trabajo liderado por Daniel Margoliash, observaron que cantos modificados enriquecidos en bajas frecuencias (menores a 1.5 kHz) son más relevantes para HVC (Fukushima et al., 2015). Su hipótesis radica en que, aunque la potencia de las bajas frecuencias está relativamente suprimida en las grabaciones de los cantos, los sonidos generados en la siringe tienen una mayor potencia en las bajas frecuencias (Fee et al., 1998; Goller & Daley, 2001; Jensen et al., 2007) y las aves pueden tener acceso a tales a través de la conducción ósea (Fukushima & Margoliash, 2015a). Mas allá de estos hallazgos, no se realizó un análisis exhaustivo sobre la importancia

relativa del resto de las bandas de frecuencia que componen el canto que, como vimos en el Capítulo 1.1, posee una gran riqueza espectral.

1.6 SOBRE ESTA TESIS

En esta tesis presento los tres principales resultados de mi trabajo doctoral. Todos estos consecuencia de una pregunta mayor que actuó de brújula durante mi estadía en el Laboratorio de Sistemas Dinámicos: ¿Cómo está representado el canto dentro del sistema nervioso central de las aves? La totalidad de esta tesis tiene un abordaje fuertemente interdisciplinario, consecuencia directa de la fuerte impronta y cultura que tiene el Laboratorio de Sistemas Dinámicos dirigido por el Dr. Gabriel B. Mindlin.

En el Capítulo 3, “Respuesta neuronal a cantos con filtros acústicos”, hacemos un análisis de cuáles son las frecuencias del canto que son relevantes para el núcleo HVC.

En el Capítulo 4, “Modelado de cantos variando parámetros biomecánicos”, modificamos el modelo biofísico de producción vocal desarrollado previamente por Mindlin y colaboradores, agregando parámetros de escaleo. Esto nos permite modificar de manera independiente el tamaño del cuello (tráquea) y cabeza (cavidad orofaríngea-esofágica) dentro del modelo.

En el Capítulo 5, “Respuesta neuronal a cantos sintéticos”, evaluamos la respuesta neuronal de HVC frente a estímulos sintéticos que siguen las leyes de escala naturales y estímulos que no lo hacen.

2 MÉTODOS GENERALES

2.1 GENERALIDADES

Para esta tesis realicé experimentos donde registraba la actividad neuronal extracelular del núcleo telencefálico HVC en “diamantes mandarines” macho (*Taeniopygia guttata*) dormidos mientras reproducía estímulos auditivos (Figura 6).

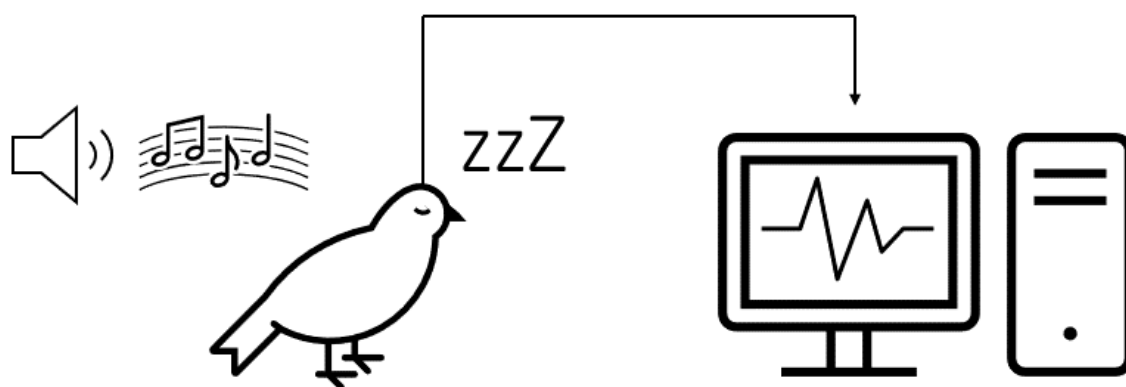


Figura 6. Esquema general del diseño experimental. Realizamos registros de actividad neuronal extracelular mientras se reproducen estímulos auditivos y el ave se encuentra dormida.

Todo el proceso experimental (incluyendo pasos previos y posteriores al día de registro de la actividad neuronal) puede ser dividido en 5 grandes pasos:

1. Ingreso al laboratorio de los sujetos experimentales, cuarentena y cambio del ciclo luz-oscuridad.
2. Grabación del canto, determinación del canto propio (BOS por sus siglas del inglés “Bird’s Own Song”) y generación de los estímulos auditivos.
3. Implante de un soporte craneal estereotáxico.
4. Registro de la actividad neuronal en ave dormida mientras se reproducen estímulos auditivos.
5. Análisis de datos.

Todos los protocolos experimentales realizados en el marco de esta tesis fueron autorizados previamente por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de

Laboratorio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA (CICUAL - FCEN - UBA).

2.2 SUJETOS EXPERIMENTALES

Los experimentos fueron realizados sobre ejemplares machos y adultos de diamantes mandarines (*Taeniopygia guttata*). Todas las aves con las que trabajé se compraron en criaderos locales. Al ingresar al laboratorio, antes de establecer contacto con el resto de los animales de reserva, fueron sometidas a una cuarentena. Todos los protocolos y manuales para el manejo, uso y cuidado de animales de experimentación están recopilados y forman parte de la documentación interna del *Laboratorio de Sistemas Dinámicos*. Los mismos se desarrollaron bajo la supervisión de una médica veterinaria y cuentan con el aval de la CICUAL - FCEN - UBA.

Para trabajar con mayor comodidad decidimos invertir el ciclo de sueño de los animales de manera que durmieran durante nuestro día y estuvieran activos durante la noche. Para ello los almacenamos dentro de cajas insonorizadas en un cuarto oscuro acondicionando especialmente con el objetivo de evitar el ingreso de luz y sonido desde el exterior. De esta manera logramos tener control total del ciclo luz-oscuridad de manera artificial. El horario en que privábamos a los animales de luz (dormían) fue de 9:00h a 17:00h. En 24 horas los animales contaban con un total 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad que se corresponde con la duración del día/noche durante el verano australiano. Nuevamente, cabe destacar que estos animales no poseen un canto estacional. Es decir, cantan a lo largo de todo el año y el mismo no se modifica por cambios en los ciclos de luz o la temperatura del ambiente. La elección del ciclo de luz y oscuridad tiene como único objetivo hacer que el desarrollo de los experimentos sea más sencillo para el investigador. El cambio del ciclo luz-oscuridad se hizo después de la cuarentena y se dejó que los animales se habituaran por al menos 10 días antes de proceder con cualquier tipo de manipulación.

2.3 GRABACIÓN DEL CANTO Y DETERMINACIÓN DEL BOS

Grabamos el canto de cada una de las aves utilizadas en esta tesis de manera individual en cajas insonorizadas usando un micrófono “*Shotgun Condenser Microphone*” de la marca

Takstar®. Los mismos se encontraban conectados a una placa de audio *Behringer*® *UMC1820*. El software que utilizamos para adquirir las grabaciones fue el *Avisoft-RECORDER* de la compañía *Avisoft Bioacoustics*®. Cada animal permaneció en la estación de grabación por al menos 3 días.

En un paso posterior separamos las grabaciones que contuvieran cantos. Como mencionamos en la introducción (ver Capítulo 1.1), el canto propio de estas aves consiste en una secuencia de motivos. Generalmente, para cada individuo, el motivo se mantiene constante y lo que varía es la cantidad de veces que se repite el mismo durante la ejecución de un canto. Para cada animal, evaluamos al menos 100 ejecuciones de cantos y determinamos cuál es la secuencia más probable y a esta la llamamos *canto propio* o BOS por sus siglas del inglés “*Bird’s Own Song*” (mas detalles en Apéndice). Además, en este paso, generamos otros dos estímulos. Por un lado, un “canto reverso” (REV) que es el BOS invertido temporalmente, y por otro, elegimos el canto propio de un conespecífico (CON). Este canto puede ser el de cualquier otro diamante mandarín que haya sido grabado en el laboratorio. Las únicas condiciones es que tenga una duración similar a la del BOS del sujeto experimental y que sus motivos sean cualitativamente distintos a los del sujeto experimental. La motivación de este último requisito es porque estos animales suelen criarse en jaulones donde conviven unas pocas decenas de individuos y muchas veces dos machos aprenden el canto de un mismo tutor. En consecuencia, es posible que cristalicen cantos propios similares que pueden generar respuesta neuronal (aunque leve) en el núcleo HVC del individuo con el que compartieron tutor. Este fenómeno atentaría contra la función del CON dentro del protocolo experimental. Tanto el REV como el CON cumplen la función de “estímulos control” y no se espera que haya respuesta si la actividad neuronal registrada ocurre efectivamente en HVC (ver Capítulo 1.4).

Dependiendo la pregunta que llevamos adelante, generé además otros estímulos auditivos específicos para cada hipótesis (ver métodos específicos en Capítulos 3.2, 4.2 y 5.2).

2.4 IMPLANTE DEL SOPORTE CRANEAL ESTEREOTÁXICO

Usualmente los marcos estereotáxicos utilizan como punto de sostén y referencia al oído externo de los animales y en consecuencia estos quedan ocluidos. En nuestros experimentos es sumamente importante contar con un marco estereotáxico para poder

registrar el núcleo neuronal de interés, como también es importante que el tracto auditivo se encuentre completamente liberado para asegurarnos que ave escuche sin dificultades. Para cumplir con ambos requisitos es que, previo al experimento de registro neuronal, implantamos en el cráneo (región parietal) un soporte metálico que cumple la función del marco estereotáxico sin necesidad de ocluir el oído externo (Figura 7).

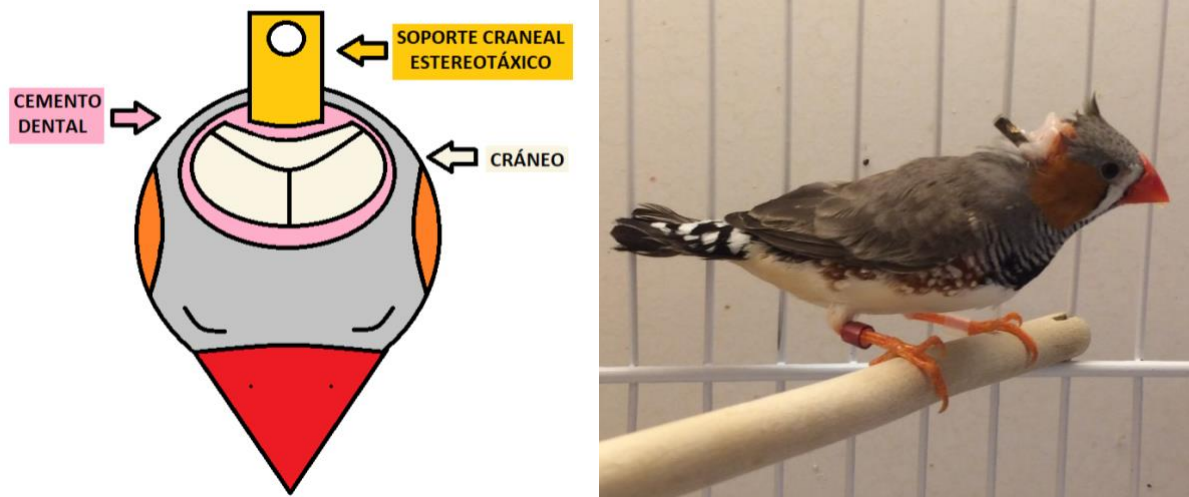


Figura 7. (izquierda) Esquema en vista superior del soporte craneal estereotáxico fijado en la región frontal-parietal del cráneo de un ave. (derecha) Fotografía de un ave con el soporte implantado. Este dispositivo nos permite inmovilizar la cabeza del animal en posición estereotáxica sin necesidad de ocluir el canal auditivo.

La cirugía para el implante del soporte se desarrolla de la siguiente manera. Primero anestesiarnos al animal con isofluorano evaporado con aire medicinal y lo posicionamos en un marco estereotáxico que sostiene el cráneo usando como punto de apoyo el oído externo y el pico. La cabeza queda con una inclinación tal que el pico forma un ángulo de 45 grados respecto a la horizontal. Esta es la posición de referencia de los atlas estereotáxicos. Una vez que el ave se encuentra posicionada desplumamos la región frontal-parietal y aplicamos yodopovidona (desinfectante) junto con lidocaína (anestésico local). Esperamos unos minutos a que el anestésico haga efecto y luego procedemos a abrir la piel para despejar el punto de referencia estereotáxico, ampliamente utilizado en el campo, llamado “punto Y” (por su aspecto similar a la letra “Y”). A una distancia de aproximadamente 1mm caudal del “punto Y” implantamos el soporte metálico al que fijamos con cemento dental y cianocrilato. Finalmente, retiramos al ave del marco y dejamos que se recupere de la anestesia en una jaula individual. De ahora en más, este

soporte nos permitirá fijar la cabeza del animal manteniendo la posición estereotáxica sin necesidad de ocluir el tracto auditivo.

Un instructivo detallado del paso a paso de la cirugía está disponible en el repositorio privado de instructivos y manuales del laboratorio.

2.5 REGISTRO DE ACTIVIDAD NEURONAL EN AVE DORMIDA

Los experimentos de registro de actividad neuronal se realizaron 48 horas después de la cirugía de implante del soporte craneal estereotáxico. El experimento se llevaba adelante en la franja horaria de 10:00h a 17:00h, que coincide con el horario en que los animales dormían.

Como primer paso se anestesió al ave con isofluorano evaporado, se la posicionó dentro de una caja insonorizada y se fijó su cabeza utilizando el soporte craneal estereotáxico. Luego se procedió hacer una craneotomía en las coordenadas donde se encuentra el núcleo HVC. El mismo se ubica en una región superficial del cerebro y aproximadamente a 2.4mm lateral y 0.1mm rostral del punto de referencia estereotáxico (“punto Y”). Retiramos el cráneo y no así la duramadre. Ingresamos al cerebro con un electrodo extracelular de tungsteno (3 MOhm) modelo “MicroElectrodes” del fabricante “MicroProbes” con la ayuda de un micromanipulador hidráulico “Narishigue MO-10”. Una vez posicionado en el núcleo, se suspendió el suministro de anestesia y se aguardó 5 minutos a que la misma sea eliminada del organismo en su totalidad. A continuación, se procede a la grabación de un protocolo experimental que consiste en adquirir la actividad neuronal extracelular mientras se reproducen estímulos auditivos. Los estímulos utilizados dependen de la pregunta que se quiera responder. En esta sección solo desarrollaremos las generalidades de este procedimiento experimental y en cada capítulo comentaremos en la sección de métodos específicos cuales fueron los estímulos utilizados y como se generaron para cada pregunta en particular. En todos los casos, cada estímulo distinto se reproduce 20 veces en orden aleatorio a un volumen de 60dB, dejando 10 segundos de silencio entre cada presentación. Una vez que terminaba un protocolo experimental buscábamos un nuevo sitio de registro, alejado al menos 150um del anterior para asegurarnos de registrar la actividad de neuronas distintas.

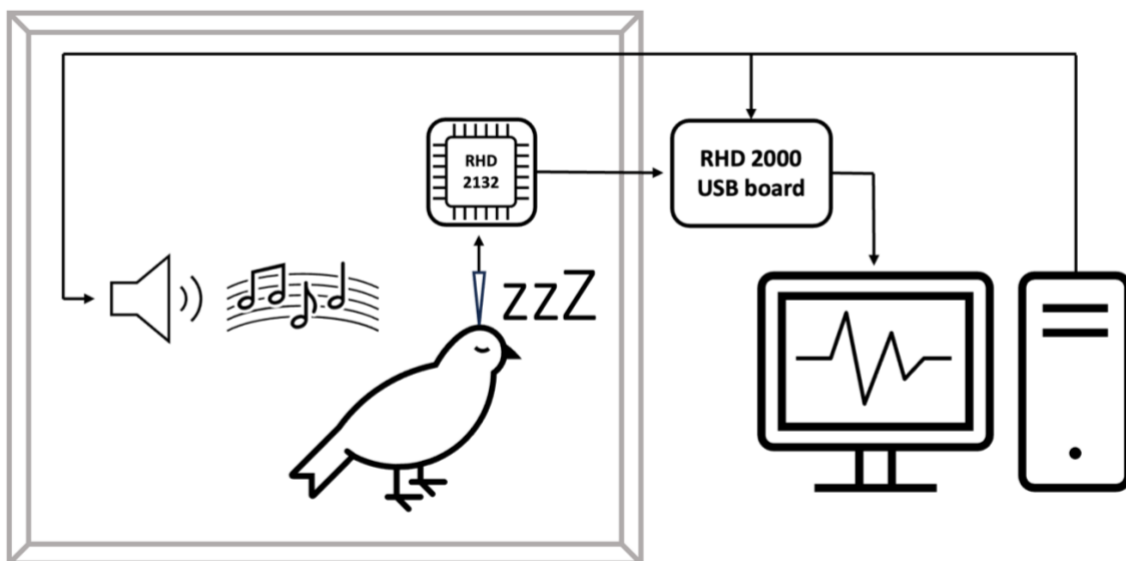


Figura 8. Esquema de la estación de registro electrofisiológico. El marco gris esquematiza una caja insonorizada donde posicionamos al ave y el parlante que reproduce los estímulos auditivos. Para grabar la actividad neuronal utilizamos un sistema de adquisición comercial del fabricante “Intan Technologies”. La señal neuronal extracelular primero es amplificada y digitalizada por un amplificador “RHD 2132” y luego pasa a una interfaz USB “RHD 2000” que comunica con la PC. Los estímulos auditivos se reproducen desde la PC. La señal se bifurca en dos canales, uno llega hasta el parlante dentro de la caja insonorizada y el otro ingresa a una entrada analógica de la placa “RHD 2000”. De esta manera logramos adquirir la actividad neuronal y el audio en simultáneo.

La actividad neuronal extracelular se grabó utilizando un sistema de adquisición comercial del fabricante “Intan Technologies”. El mismo cuenta con un amplificador y digitalizador “RHD 2132” y una placa de interfaz USB “RHD 2000” que comunica con la PC (Figura 8). La frecuencia de adquisición de los datos (“frecuencia de muestreo”) fue de 30kHz.

Para poder alinear la actividad neuronal con el audio, no solo lo reproducimos dentro de la caja insonorizada, sino que también conectamos la salida de audio de la PC a una entrada analógica de la placa “RHD 2000” (Figura 8). De esta forma, la actividad neuronal y el audio se adquirieron en simultáneo.

Dado que el núcleo HVC es relativamente “grande” (ver Capítulo 1.4.1), una sola jornada no es suficiente para hacer mediciones en todos los sitios disponibles. Para poder continuar con el experimento otro día, al final de la jornada sellamos la craneotomía con silicona biocompatible *Kwik-cast silicone sealant* del fabricante *World Precision Instruments*. De esta manera el tejido queda protegido hasta el siguiente experimento.

Luego de adquirir la señal electrofisiológica, aislamos por un lado los disparos neuronales y por otro las componentes de baja frecuencia conocidas como el potencial de campo local o LFP por sus siglas en inglés (*Local Field Potential*). Para ello usamos filtros pasa bajos sobre la señal electrofisiológica original. Finalmente para cuantificar de manera más sistemática la respuesta neuronal proponemos un índice al que llamamos “integral de disparos normalizada” (ver ecuación 7). El mismo se calcula de la siguiente manera, primero sumamos el total de disparos neuronales que ocurren durante la presentación de los estímulos y le restamos la “actividad neuronal espontánea”. Finalmente normalizamos este resultado por la suma total de disparos generados durante la presentación del canto propio. De esta manera tenemos un índice que cuantifica la selectividad de HVC tomando como referencia el canto propio con su composición espectral completa (0 ~ 15kHz).

$$\begin{aligned} & \text{Integral de disparos normalizada [u. a.]} \\ &= \frac{\# \text{ disparos durante estímulo [u]} - \text{tasa de disparo espontánea [u/s]} \cdot \text{duración del estímulo [s]}}{\# \text{ disparos durante BOS [u]} - \text{tasa de disparo espontánea [u/s]} \cdot \text{duración del BOS [s]}} \quad (7) \end{aligned}$$

La “actividad neuronal espontánea” se calcula como el producto entre la tasa de disparo espontánea y la duración del estímulo. La tasa de disparo espontánea se estima (para cada uno de los sitios de registro) a partir de la grabación de un minuto de actividad espontánea antes de comenzar a reproducir los estímulos auditivos.

Durante mi proceso doctoral hice experimentos preliminares para registrar actividad de neuronas únicas, pero los resultados no fueron concluyentes debido a que no logré poner a punto la técnica de adquisición de los datos. Resultaría de gran interés, a futuro, aislar disparos de neuronas únicas para evaluar sus patrones de actividad.

2.6 HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS DE DATOS

Para levantar los datos el fabricante del sistema de adquisición ofrece una rutina escrita en el lenguaje de programación Matlab. El resto de los programas necesarios para analizar los datos fueron desarrollados por mí especialmente para estos experimentos. Todos los códigos que desarrollé y utilicé están disponibles en mi perfil de GitHub (<https://github.com/jlassaortiz/PSTH> online).

3 RESPUESTA NEURONAL A CANTOS CON FILTROS ACÚSTICOS

3.1 MOTIVACIÓN

Dentro del circuito del canto, el núcleo HVC es considerado un núcleo sensor-motor. La razón de esta clasificación es que HVC no solo interviene en el circuito motor responsable de la ejecución del canto, sino que, además posee conexiones aferentes de varios núcleos auditivos (ver Capítulo 1.4.1). Esta conectividad es coherente con el comportamiento electrofisiológico de HVC. Como se explicó en la Introducción (ver Capítulo 1.4.2), este núcleo aumenta su actividad neuronal cuando el ave, dormida o anestesiada, escucha una grabación de su propio canto (BOS, por sus siglas del inglés *Bird's Own Song*). Trabajos previos mostraron que las bajas frecuencias del BOS tienen una importancia relativa mayor en la retroalimentación auditiva (Fukushima et al., 2015). Los autores encontraron que la respuesta neuronal generada por BOS enriquecidos en bajas frecuencias (menores a 1 kHz) es mayor a la generada por el BOS sin modificar. Cabe destacar que el rango de frecuencias del canto de los diamantes mandarines cubre desde los 300 Hz llegando a superar los 15 kHz (“The Song of the Zebra Finch,” 2012).

Uno de los objetivos de esta tesis fue dilucidar cuál es el rango de frecuencias del BOS relevante y necesario para generar respuesta neuronal en HVC durante la retroalimentación auditiva. Para ello realizamos un experimento de registro de actividad neuronal en ave dormida (métodos en Capítulo 2.5) mientras reproducíamos grabaciones del BOS, BOS filtrado (con distintos filtros pasa bandas para eliminar frecuencias específicas) y los controles CON (canto de un conoespecífico) y REV (canto propio reproducido en reversa).

3.2 MÉTODOS ESPECÍFICOS

Generación de estímulos auditivos

Para llevar a cabo este experimento, generamos los estímulos “canto propio” o BOS, CON y REV, tal como se describe en el Capítulo 2.3.

En el trabajo seminal de (Fukushima et al., 2015) los investigadores utilizan un filtro tipo pasa-bajos con el objetivo de enriquecer en bajas frecuencias (menores a 1 kHz) las grabaciones de los cantos propios (BOS) para luego utilizarlos como estímulos auditivos. En ese artículo, los investigadores reportan que la reproducción de los cantos enriquecidos en bajas frecuencias generan una respuesta neuronal en el núcleo HVC distinta a la que generan los BOS sin modificar. Esta investigación no profundizó en el estudio del resto de las bandas de frecuencias del BOS. Nosotros nos apoyamos en este marco teórico y lo ampliamos utilizando una variedad de filtros pasa-bajos. A su vez, para complementar aún más el estudio, sumamos al análisis BOS modificados con filtros pasa-altos, algo que (Fukushima et al., 2015) no testearon.

En términos generales, ambos tipos de filtros (pasa-bajos y pasa-altos) permiten el paso de frecuencias superiores o inferiores (según el caso) a una frecuencia de corte específica definida por el usuario. En esta tesis, aplicamos ambos tipos de filtros sobre el BOS para obtener versiones modificadas a las que llamamos *fBOS* (por sus siglas del inglés, *filtered Bird's Own Song*). Además, normalizamos la intensidad de los cantos filtrados para que todos los estímulos se escucharan con la misma intensidad, independientemente de su composición espectral. Para llevar a cabo esta tarea, utilizamos la función *Filter (pass Hann band)* del software *Praat* (Boersma & Weenink, 2023). Seleccionamos las frecuencias de corte en: 1.5 kHz, 2.5 kHz, 3.5 kHz, 4.5 kHz y 5.5 kHz tanto para los filtros pasa-altos como pasa-bajos. En consecuencia, para estos experimentos disponíamos de un total de 13 estímulos auditivos distintos: BOS, CON, REV y 10 versiones de fBOS. Esto es la regla general para la gran mayoría de los protocolos experimentales, aunque en los experimentos iniciales usamos otras frecuencias de corte intermedias. La estandarización en la elección de las frecuencias de corte se hizo luego de hacer algunos registros preliminares.

Protocolo experimental

Una vez que contamos con los estímulos auditivos, proseguimos con los procedimientos experimentales descriptos en Métodos Generales. Primero implantamos el soporte craneal estereotáxico (Capítulo 2.4) y 48 horas más tarde realizamos las mediciones de actividad neuronal en animal dormido (Capítulo 2.5). Utilizando coordenadas estereotáxicas y valiéndonos de la respuesta neuronal característica, altamente selectiva al canto propio, nos aseguramos que todos los registros se hicieran dentro del núcleo HVC. El

comportamiento electrofisiológico único y el fácil acceso al núcleo por coordenadas estereotáxicas, hacen que sea innecesario realizar histología para determinar que los registros fueron efectivamente hechos en el núcleo HVC.

Análisis de datos

La señal obtenida durante los experimentos tiene una frecuencia de muestreo de 30 kHz. A posteriori, la filtramos para poder analizar por separado los disparos neuronales y el potencial de campo local o LFP (por sus siglas del inglés *Local Field Potential*). Con un filtro pasa-altos de 500 Hz logramos recuperar la actividad neuronal mientras que el LFP se obtiene con distintos filtros pasa-bandas. En este trabajo exploramos la respuesta de las bandas más comúnmente estudiadas en la literatura (delta, theta, alfa, beta, gamma, gamma-alta y 30 Hz). Para aislar los distintos anchos de banda del LFP utilicé *wavelets* debido a su capacidad para descomponer señales en componentes de frecuencia variable mientras se mantiene la resolución temporal. Esta técnica es particularmente útil para analizar señales no estacionarias, como el LFP, ya que permite una representación precisa tanto en el dominio del tiempo como en el de la frecuencia (Mike X Cohen, 2014).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Respuesta de múltiples unidades neuronales a cantos con filtros acústicos

Al medir con un electrodo extracelular, la actividad neuronal que registramos proviene de múltiples unidades neuronales y por eso nos referimos a ella como MUA (por sus siglas en inglés de *Multi-Unit Activity*). Para cada estímulo, alineamos estos disparos neuronales ocurridos en cada una de las 20 repeticiones. Como primer control verificamos que la respuesta neuronal sea selectiva al canto propio y no al reverso ni al conespecífico. Para poder visualizarlo generamos histogramas de los disparos acumulados (barras grises de 15ms de ancho) para cada estímulo auditivo y sobre estos graficamos una curva que integra los disparos neuronales (*sliding window technique*) para obtener mayor detalle y resolución temporal (ventana de 15ms que se desliza en pasos de 5ms) (Figura 9). La actividad selectiva al canto propio nos revela que el sitio de registro fue efectivamente en HVC y que el animal estaba dormido. Recordemos que, en esta especie, la respuesta

neuronal generada por la reproducción del canto propio solo ocurre si el ave se encuentra dormida o anestesiada (más detalles en Capítulo 1.4.2).

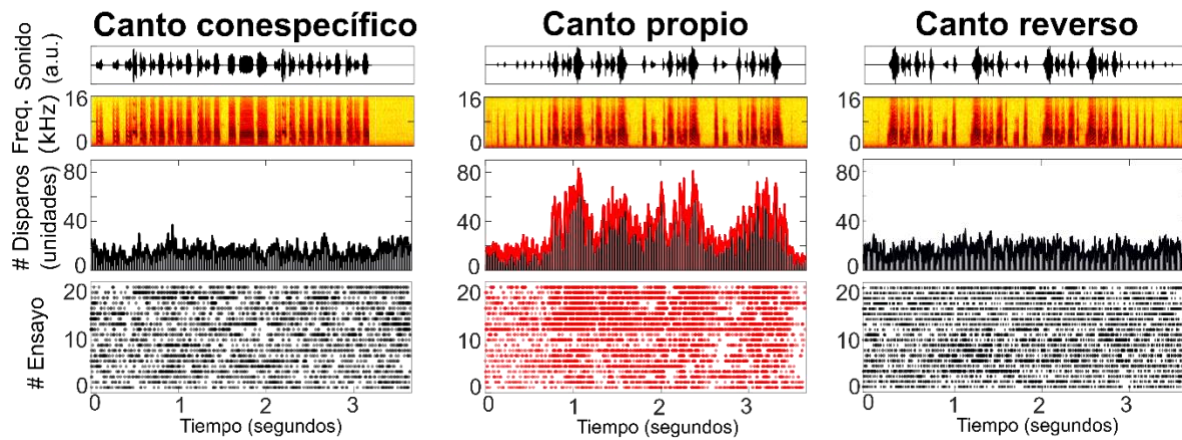


Figura 9. La respuesta de la actividad de múltiples unidades neuronales en HVC es selectiva al canto propio. Los paneles de arriba hacia abajo muestran: señal de audio, espectrograma, histogramas de disparos neuronales y, finalmente, los eventos de disparo de neuronas a lo largo de las 20 repeticiones (o ensayos) de cada estímulo. Sobre los histogramas de disparos neuronales (barras grises de 15ms de ancho) graficamos una curva que integra los disparos neuronales con una ventana de 15ms que se desplaza en pasos de 5ms. El objetivo de esta curva es tener una representación con saltos discretos más pequeños para complementar al histograma. Notar que la actividad neuronal aumenta únicamente frente a la presentación del canto propio y no lo hace cuando se reproduce el canto reverso o el canto de un conespecífico.

Repetimos este análisis para el resto de los estímulos. En la Figura 10 se puede visualizar la respuesta (en un único sitio de registro) que generan los distintos cantos filtrados cuando se les suprimen las bajas frecuencias (Figura 10, arriba en verde) o las frecuencias altas (Figura 10, abajo en azul). En este caso podemos ver como al eliminar las frecuencias inferiores a 3.5 kHz no parece haber respuesta neuronal selectiva, al igual que si eliminamos todo el contenido espectral por encima de 1.5 kHz. Junto a los histogramas se representan el espectrograma de cada canto propio filtrado. Las bandas de frecuencias eliminadas se visualizan como franjas en amarillo claro dentro del espectrograma, indicando la ausencia de dichas frecuencias.

Para poder visualizar el espectrograma con mayor facilidad, el mismo se encuentra ampliado en la Figura 10. La barra roja sobre el histograma indica el segmento del tiempo donde se reproduce el canto propio filtrado (fBOS), luego procede un silencio. En el primer panel arriba a la izquierda de la Figura 10 podemos ver como la actividad neuronal aumenta durante la presentación del sonido (histograma debajo de la barra roja) y luego disminuye cuando no hay sonido.

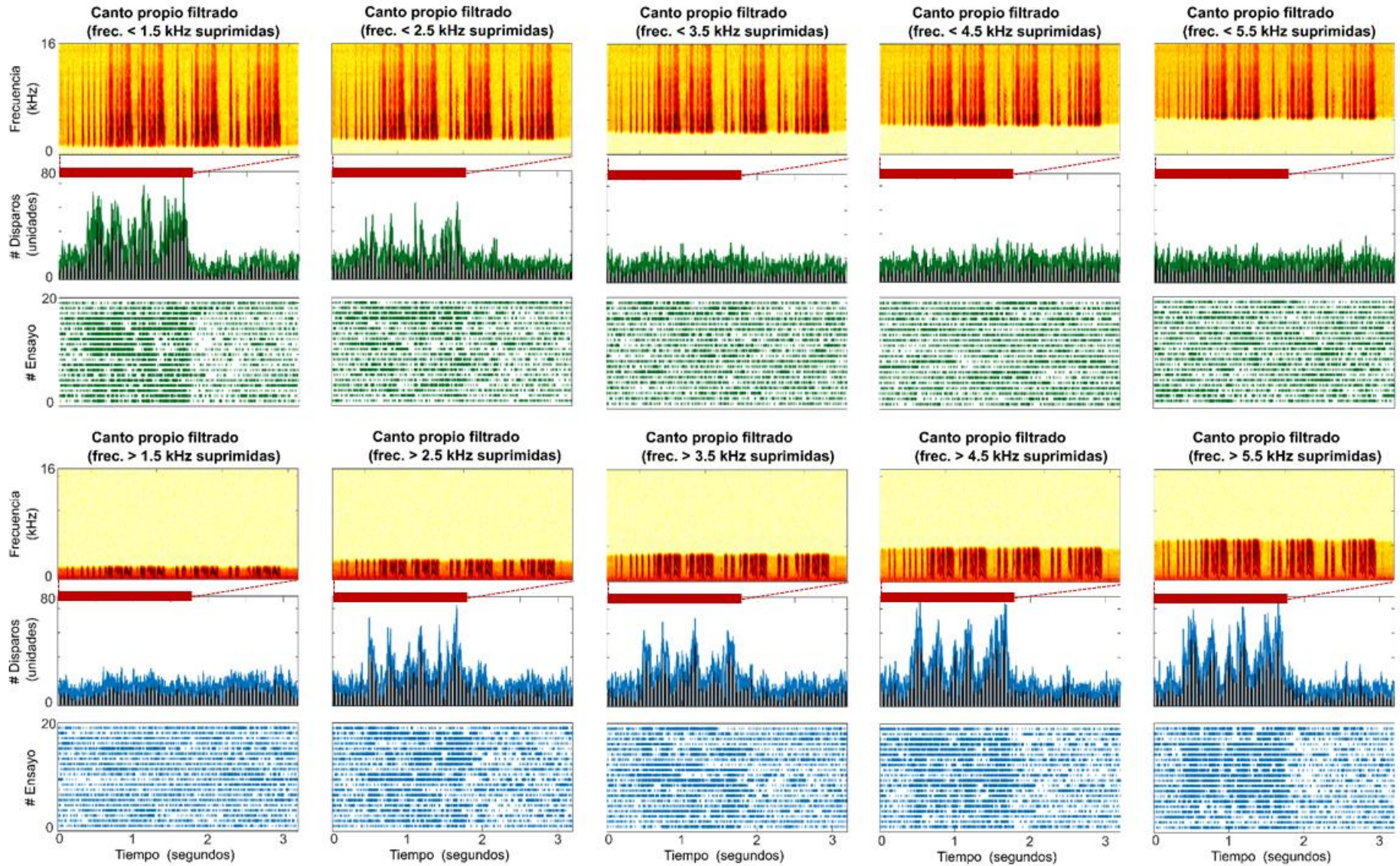


Figura 10. Ejemplo de cómo, para un único sitio de registro, la respuesta neuronal en HVC varía dependiendo la composición espectral del estímulo auditivo. Arriba en verde y gris, respuesta neuronal al suprimir bajas frecuencias del canto propio. Abajo en azul y gris, respuesta neuronal al eliminar altas frecuencias del canto propio. Todos estos datos provienen de un único sitio de registro de un único animal. En esta figura, para facilitar su visualización, el espectrograma se encuentra ampliado y fuera de escala respecto a la respuesta neuronal. La barra roja indica la ventana temporal donde se reproduce el sonido para comprender como se alinea el estímulo auditivo con la respuesta neuronal.

Para cuantificar de manera más sistemática la respuesta neuronal selectiva proponemos un índice al que llamamos “integral de disparos normalizada” (para más detalles ver en Capítulo 2.5). En la Figura 11 se ve como a partir de este análisis podemos construir curvas de respuesta a las distintas frecuencias de corte para los filtros pasa-altos y pasa-bajos por separado. Los ejemplos que se cuantifican en la Figura 11 son tomados de la Figura 10.

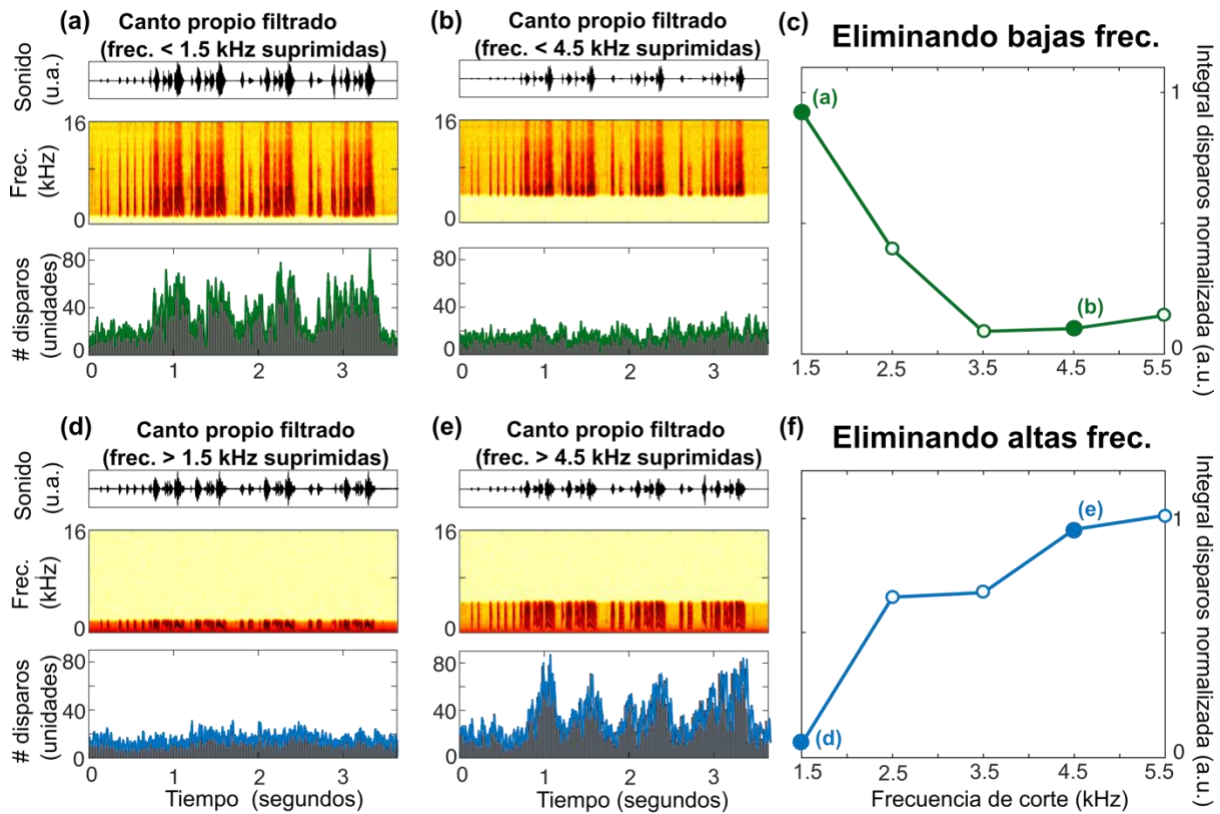


Figura 11. Cambios en la respuesta de múltiples unidades neuronales en función de la composición espectral del estímulo auditivo fBOS (canto propio filtrado). Los datos mostrados en esta figura provienen de la Figura 10. Cuantificamos la cantidad de disparos neuronales acumulados luego de la presentación de 20 repeticiones de cada estímulo auditivo. En esta figura se pueden ver los histogramas de actividad neuronal resultante alineados a la señal de sonido y espectrogramas de 4 estímulos diferentes en un mismo sitio de registro. Los resultados (a, b, d, e) corresponden a: cantos procesados con un filtro pasa-altos que suprime frecuencias debajo de (a) 1.5 kHz y (b) 4.5 kHz y por otro lado cantos filtrados con pasa-bajos que suprime frecuencias superiores a (d) 1.5 kHz y (e) 4.5 kHz. Normalizamos la cantidad de disparos neuronales que ocurren durante la presentación de los estímulos dividiéndolos por el total de disparos ocurridos durante la presentación del canto propio completo (más detalles en texto). En los paneles laterales de la derecha se muestra como varía la respuesta neuronal normalizada en función de las frecuencias de corte de los distintos filtros pasa-altos (a, curva verde) y pasa-bajos (f, curva azul). Las letras sobre la curva indican correspondencia con los ejemplos de los paneles de la izquierda.

Calculamos las curvas de respuesta de cada uno de los sitios de registro y graficamos todos estos datos acumulados (proveniente de 42 sitios de registro de 3 aves diferentes) en la

Figura 12. Las líneas más gruesas representan la media, las líneas verticales al intervalo de confianza (IC_{95} ; $\alpha = 95\%$) para la media y los asteriscos indican diferencias significativas con la actividad generada por el canto reverso a la que consideramos como control (modelado estadístico GLM donde la respuesta al REV es considerada control, $p < 0.05$). Estos análisis nos permitieron determinar cuáles eran los estímulos filtrados que generaban respuestas neuronales equivalentes (sin diferencia estadística significativa) a la generada por el canto propio completo (con una riqueza espectral en rango: 300 Hz – 15 kHz).

Las frecuencias de corte 5.5 kHz y 6.0 kHz, ambas pasa-bajos (eliminando frecuencias por encima de estos límites, Figura 12 abajo en azul) fueron las únicas dos cuyos intervalos de confianza para la media incluyen al 1, es decir no mostraron diferencias estadísticas con el canto propio completo. Esto indica que, si eliminamos todas las frecuencias altas por encima de 5.5 kHz, logramos de todos modos recuperar la respuesta neuronal máxima generada por el canto propio completo. En otras palabras, las frecuencias por encima de los 5.5 kHz resultarían irrelevantes para el núcleo HVC.

Por otro lado, al eliminar las frecuencias por debajo de 1.5 kHz (Figura 12 arriba en verde), el intervalo de confianza no incluye al 1 (uno), indicando que, al suprimir las frecuencias bajas la respuesta neuronal generada es significativamente menor a la generada por el canto propio completo. De todas maneras, resulta relevante que esta respuesta neuronal, aunque es estadísticamente menor, sigue siendo alta y se asemeja a la respuesta neuronal generada por el canto completo. Este resultado indica que las frecuencias fundamentales son necesarias para recuperar en su totalidad la respuesta neuronal, pero su eliminación no genera un efecto drástico en la respuesta de las neuronas de HVC.

Al eliminar las bajas frecuencias en un rango desde los 0 kHz hasta los 3 kHz (Figura 12 arriba en verde), la respuesta neuronal generada en HVC continúa siendo significativamente mayor (significancias indicadas con asteriscos) a la generada por el canto reverso (control). Más allá de este límite, la integral de disparos normalizada decae lo suficiente como para no encontrar diferencias estadísticas con el control. En otras palabras, al eliminar las frecuencias por debajo de los 3.5 kHz, el estímulo auditivo parecería no generar respuesta selectiva en el núcleo HVC.

Por otro lado, si eliminamos las altas frecuencias desde el “infinito” ($+\infty$ kHz) hasta los 2.25 kHz (Figura 12 abajo en azul), la respuesta selectiva se conserva lo suficiente para considerarla significativamente mayor a la respuesta generada por el control. Si la

frecuencia de corte del pasa-bajos es menor a este límite (< 2.25 kHz), el canto filtrado produce una respuesta neuronal comparable con la del canto reverso. En otras palabras, si solo conservamos las frecuencias bajas (menores estrictas a 2.25 kHz) el estímulo auditivo parecería no generar respuesta selectiva en el núcleo HVC.

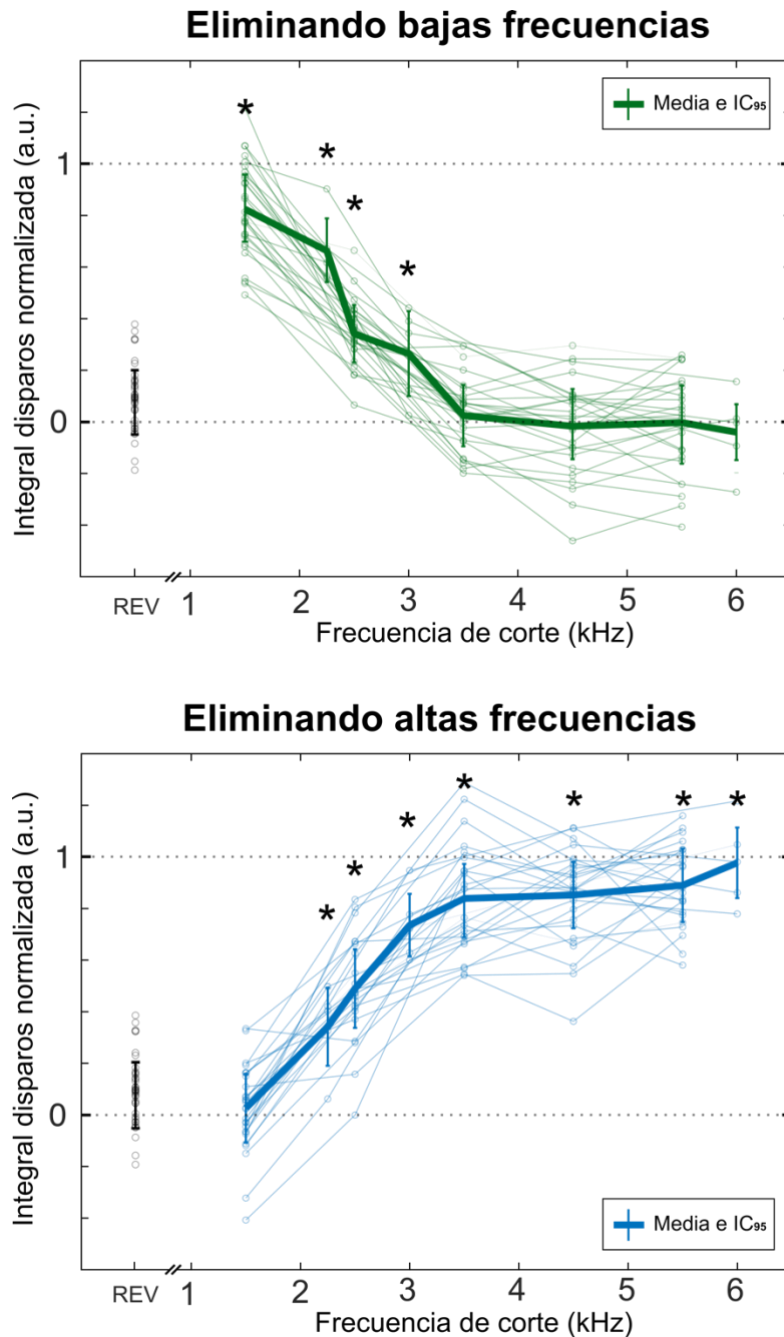


Figura 12. Datos acumulados de la actividad neuronal normalizada en función de las frecuencias de corte de los filtros pasa-altos (arriba), pasa-bajos (abajo) y el canto reverso (REV). Las líneas delgadas corresponden a los datos de un mismo sitio de registro, y la línea gruesa a la media resultante y el intervalo de confianza (IC₉₅; $\alpha = 95\%$). Los asteriscos muestran diferencias significativas (GLM, $p < 0.5$) respecto al estímulo REV. Datos de 42 protocolos de 3 aves distintas.

3.3.2 Respuesta del potencial de campo local

Como parte de este trabajo doctoral, estudiamos la respuesta a los estímulos auditivos del potencial de campo local o también llamado LFP. Como se comentó en el Capítulo 1.4, en trabajos previos se observó que la banda de 30 Hz y gamma-alta (80 – 200 Hz) del potencial local de campo en HVC aumentan su fuerza durante la ejecución del canto en diamantes mandarines (Brown et al., 2021; Markowitz et al., 2015). En este trabajo exploramos la respuesta frente a estímulos auditivos de las bandas más comúnmente estudiadas en la literatura (delta, theta, alfa, beta, gamma, gamma-alta y 30 Hz).

Para ello filtramos la actividad electrofisiológica registrada de manera de aislar cada banda de interés. Al igual que con los disparos neuronales, superpusimos la respuesta ocurrida en cada una de las 20 repeticiones de cada estímulo y obtuvimos señales como las que se muestran en la Figura 13. Para cada estímulo calculamos la media de la fuerza del LFP durante la presentación del estímulo auditivo (Figura 13, línea roja continua) y durante el silencio posterior (Figura 13, línea roja punteada). Finalmente calculamos la diferencia entre estos dos valores para estimar cuanto varía la fuerza del potencial local cuando se presenta un estímulo auditivo. En una primera aproximación, evaluamos el comportamiento de las bandas del LFP (delta, theta, alfa, beta, gamma, gamma-alta y 30 Hz) frente al *canto propio*, *canto reverso* y *canto de un conespecífico*. En la Figura 13 se muestra un ejemplo de la respuesta de la banda gamma-alta (gris oscuro) y 30Hz (gris claro) en un sitio de registro. En este caso particular, la banda de 30Hz parece incrementar su amplitud frente al canto propio y, en menor medida, al canto del conespecífico. Por el contrario, no encontramos evidencia estadística que sugiera que la banda gamma-alta aumenta su actividad cuando se le presenta el canto propio (modelado como GLM donde el estímulo REV funcionó como control, $p > 0.05$).

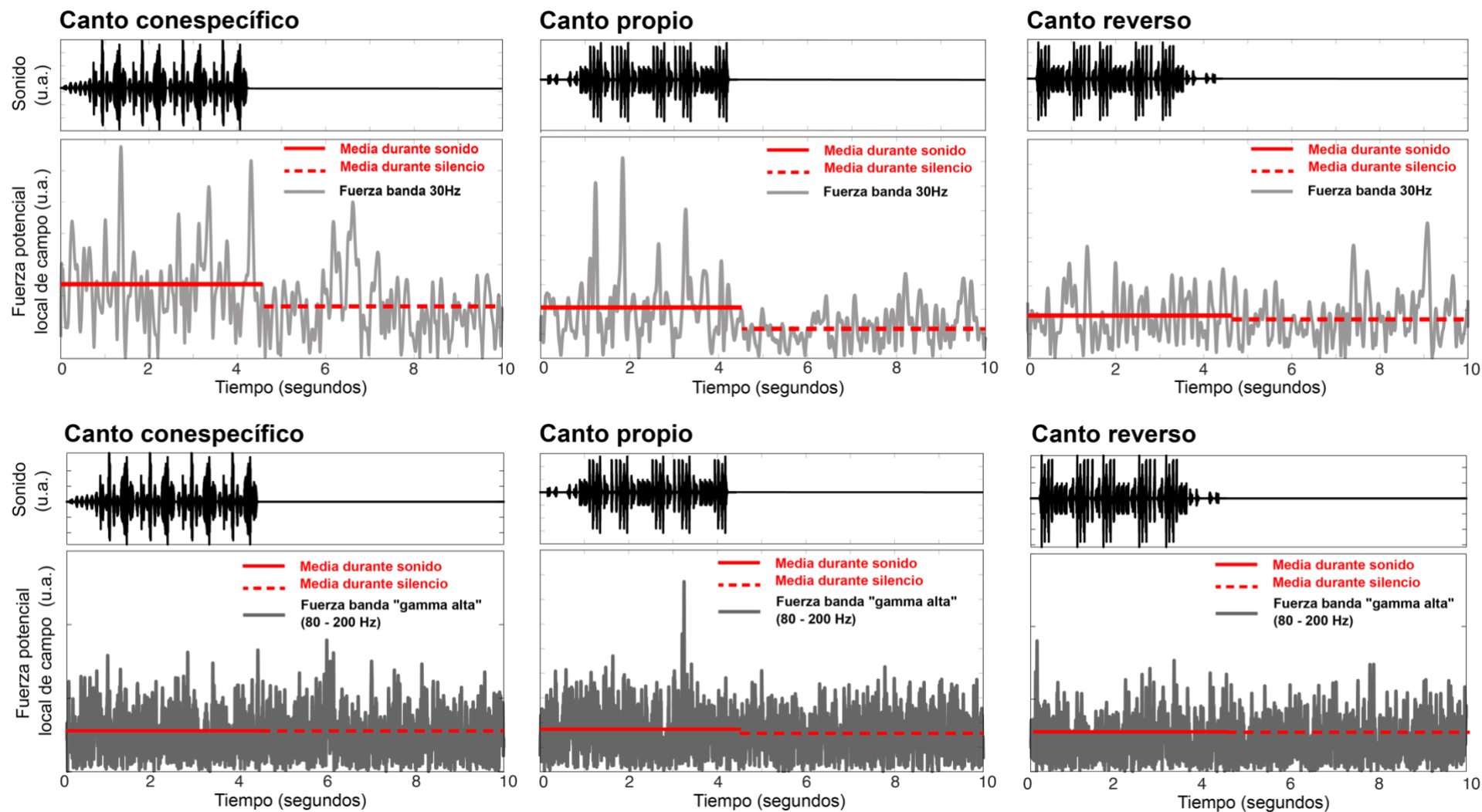


Figura 13. Ejemplo de respuesta de dos bandas del potencial de campo local frente a estímulos auditivos. En gris claro: Traza promedio de la banda de 30Hz. En gris oscuro: Traza de la banda “gamma-alta” (80-200 Hz). Todas se encuentran alineadas con los estímulos auditivos. Las señales de potencial local surgen de promediar la actividad de las 20 presentaciones de cada estímulo. Durante la presentación del canto propio (y en menor medida, frente al canto del conespecífico) hay un aumento de la fuerza de la banda de 30Hz. Esto no ocurre en la banda “gamma alta” o la banda de 30Hz cuando se presenta el canto reverso.

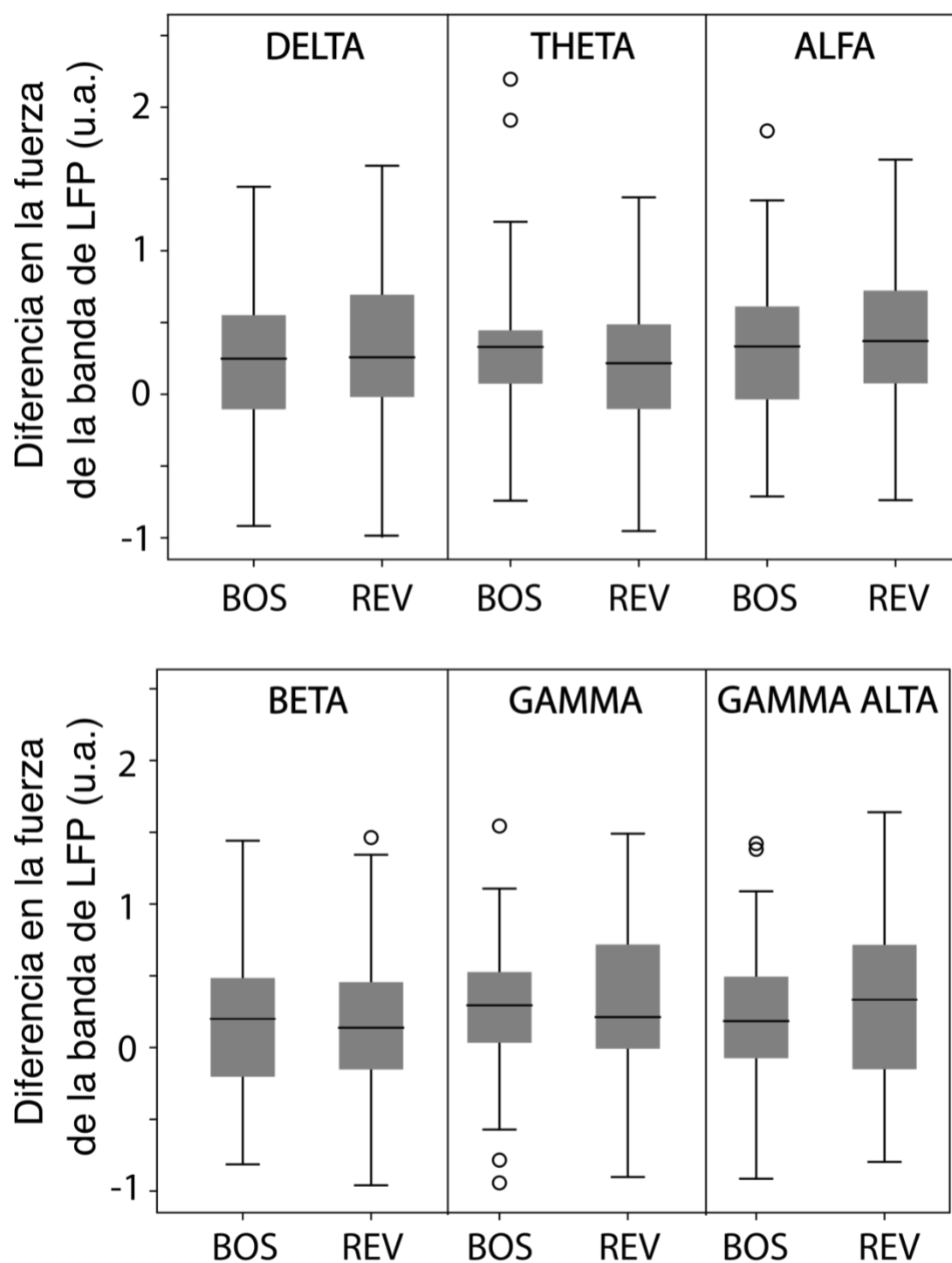


Figura 14. Datos acumulados de diferencia de las bandas de LFP tradicionales de la literatura cuando se reproduce un estímulo auditivo y el silencio posterior. Los estímulos estudiados en este caso fueron el canto propio (BOS) y, como control, el canto propio reproducido en reversa (REV). No encontramos diferencias estadísticas en la diferencia de la fuerza de la banda de LFP explicada por el estímulo BOS al compararlo con el control REV (GLM, $p > 0.05$). Los datos provienen de 87 sitios de registro de 5 aves.

Hicimos un análisis de los datos acumulados (87 sitios de registro de 5 aves) y no encontramos diferencias estadísticas explicadas por el efecto generado por el BOS respecto al control REV para ninguna de las bandas del potencial local de campo tradicionales de la literatura (Figura 14). En todos los casos hicimos modelos lineales generalizados o GLM usando como variable respuesta la diferencia en el poder de la banda y como variable explicatoria el tipo de estímulo auditivo BOS y el control REV.

Este resultado negativo no se replicó para el análisis de la banda de 30Hz (Figura 15). Esta fue la única que mostró un aumento significativo en la fuerza de la señal durante la presentación del canto propio (GLM, $p < 0.05$). Este resultado pone en evidencia una diferencia en el comportamiento del potencial local de campo respecto a lo que ocurre cuando el animal está cantando (Brown et al., 2021; Markowitz et al., 2015), donde tanto la banda del 30 Hz como la gamma-alta aumentaban su actividad cuando el animal cantaba. Cuando el animal escucha su propio canto, observamos este mismo fenómeno únicamente para la banda de 30Hz.

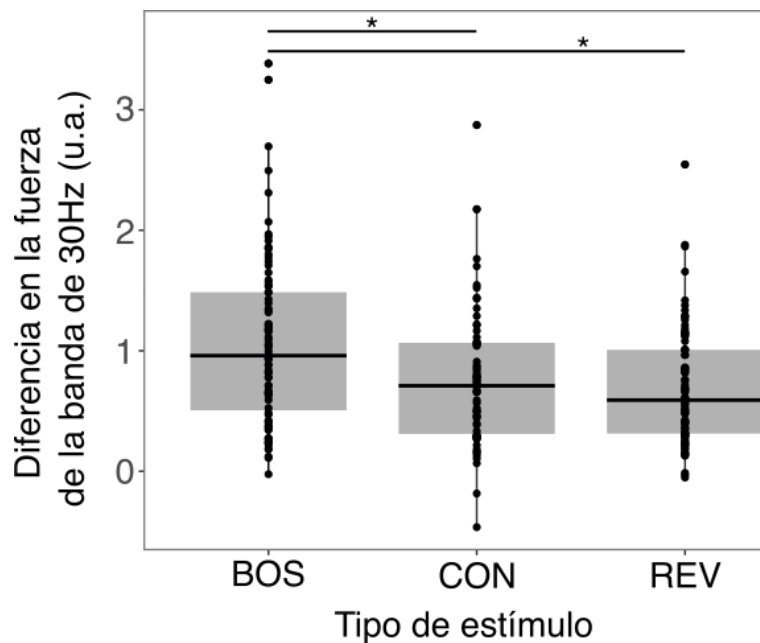


Figura 15. Datos acumulados de diferencia de la banda de 30 Hz del potencial de campo local cuando se reproduce un estímulo auditivo y el silencio posterior. Los estímulos estudiados en este caso fueron el canto propio (BOS), canto de un conespecífico (CON) y el canto propio reproducido en reversa (REV). Las barras y asteriscos indican diferencias significativas (GLM, $p < 0.05$) entre el BOS y los controles CON y REV. Los datos provienen de 87 sitios de registro de 5 aves.

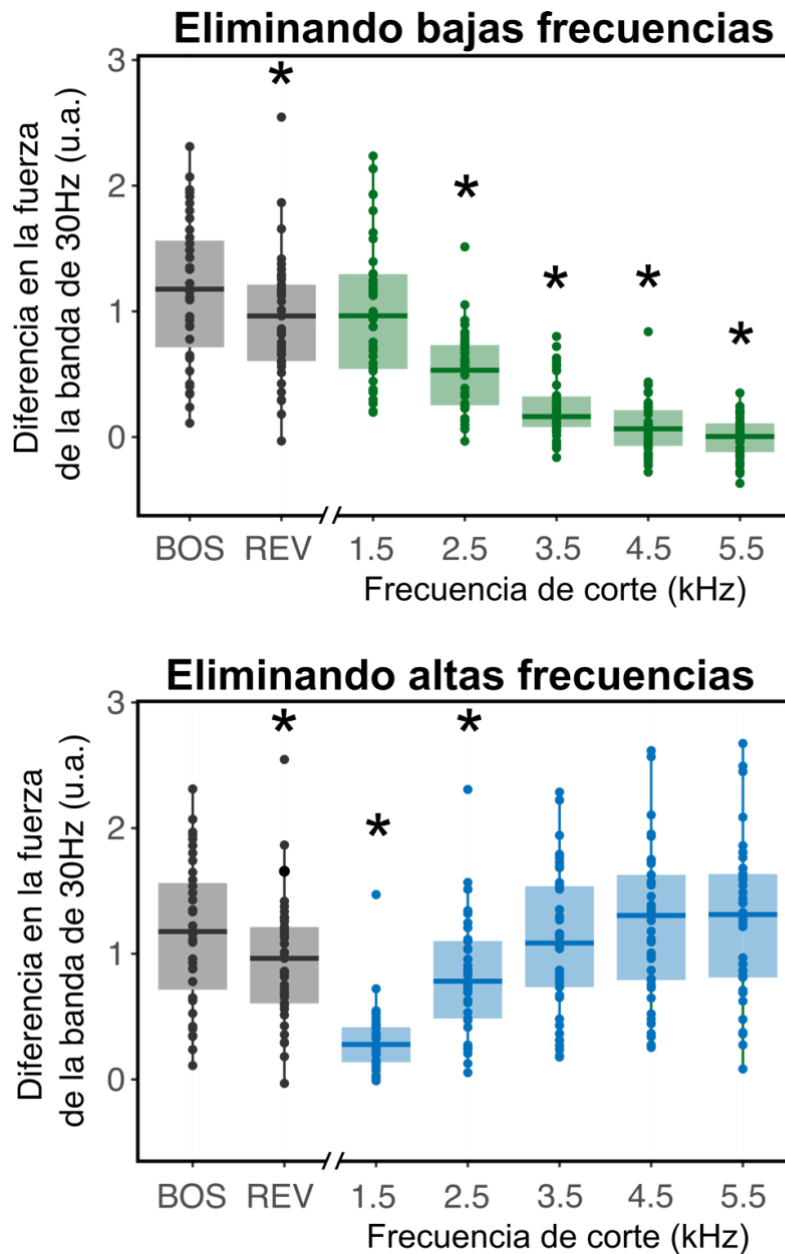


Figura 16. Respuesta de la banda del 30 Hz del potencial local de campo (LFP) a los cantos propios filtrados (fBOS) y los controles BOS y REV. Al igual que la actividad neuronal (Figura 12), la respuesta de la banda de 30 Hz del LFP varía con la composición espectral del estímulo. Los asteriscos muestran diferencias significativas (GLM, $p < 0.05$) con la respuesta generada por el BOS. La respuesta del LFP no muestra diferencias significativas con la generada por el BOS si eliminamos las frecuencias fundamentales por debajo de los 1.5 kHz (arriba en verde) o si eliminamos las frecuencias altas (abajo en azul) por encima de los 3.5 kHz. Resulta relevante que algunos estímulos filtrados tengan una respuesta menor al canto reverso (REV), algo que no ocurre con la actividad neuronal. Datos de 41 protocolos de 3 aves.

Finalmente, repetimos el análisis anterior con los cantos propios filtrados para la banda de 30 Hz. Los datos acumulados (41 protocolos de 3 aves) se muestran en la Figura 16. Podemos observar que la tendencia de la respuesta del LFP se asemeja a la de la actividad neuronal (ver Figura 12). El análisis estadístico reveló que existen diferencias

significativas en la respuesta de algunos estímulos (GLM, $p < 0.05$; marcados con un asterisco) al ser comparados con la respuesta generada por el canto propio (BOS). Resulta relevante que algunos estímulos filtrados tengan una respuesta menor al canto reverso (REV), algo que no ocurre con la actividad neuronal (Figura 12).

3.4 CONCLUSIONES

El canto de diamantes mandarines es un comportamiento de una gran complejidad acústica. Entre los atributos que lo caracterizan podemos destacar la riqueza en armónicos que poseen muchas de sus sílabas, consecuencia directa de los mecanismos dinámicos que generan el canto. Esta característica dota a las vocalizaciones de un amplio ancho de banda, pudiendo encontrar sonidos desde 300 Hz hasta los 15 kHz. Durante muchos años la comunidad científica no incursionó en el detalle de cómo es codificada esta riqueza espectral dentro del circuito del canto. Algunos trabajos previos encontraron que las bajas frecuencias son relevantes para el núcleo HVC (Fukushima et al., 2015) pero sin hacer un análisis exhaustivo sobre todo el rango de frecuencias que posee el canto de estos animales. Parte de este trabajo doctoral consistió en enfrentar este interrogante que hasta la fecha se encontraba pendiente. Nos preguntamos cuáles son las frecuencias del canto propio de los diamantes mandarines relevantes y necesarias para generar la respuesta auditiva selectiva en el núcleo HVC.

En primer lugar, es importante detenerse y analizar con cuidado que es lo que ocurre con la frecuencia de corte de 1.5 kHz. Por debajo de este límite se encuentra la gran mayoría de las frecuencias fundamentales de las sílabas que vocalizan los diamantes mandarines, encontrándose pocos casos donde la misma supere este umbral. En nuestro análisis encontramos que si conservamos solamente las frecuencias bajas (donde se encuentran las fundamentales) no se genera respuesta selectiva al canto. Es decir, las frecuencias fundamentales no son suficientes para inducir la respuesta neuronal selectiva en el núcleo HVC. Por otro lado, si eliminamos solamente las bajas frecuencias menores a 1.5 kHz, la respuesta generada por el estímulo filtrado es estadísticamente menor a la respuesta que genera el estímulo BOS sin filtrar. De todas formas, es esencial resaltar que esta respuesta, aunque es estadísticamente menor, continua siendo muy elevada. Estos resultados cambian la interpretación sobre la relevancia que tienen las frecuencias fundamentales dentro de la respuesta auditiva del núcleo HVC. Como las frecuencias fundamentales son controladas de forma activa por el ave, esperamos que resulten

relevantes dentro de la respuesta neuronal auditiva en HVC. Recordemos que mediante el control de la presión del aire que fluye por la siringe y, sobre todo, de la tensión de los músculos siríngeos, estas aves modulan la frecuencia fundamental durante la ejecución del canto (ver Capítulo 1.2). Además, según (Fukushima et al., 2015), los estímulos auditivos enriquecidos en las bajas frecuencias generaban una respuesta neuronal diferencial en HVC. De todas formas, era necesario en el área llevar adelante un estudio detallado de la respuesta neuronal auditiva de HVC en función de la composición espectral del BOS. Nuestros resultados indican que las frecuencias fundamentales son necesarias para evocar el comportamiento neuronal selectivo con la misma intensidad que lo hace el canto propio, pero no son determinantes, ya que en ausencia de las frecuencias fundamentales la respuesta sigue siendo muy alta.

Al analizar los cantos filtrados con pasa-bajos, observamos que, a pesar del amplio ancho de banda que poseen las vocalizaciones de estos animales (300 Hz – 15 kHz), para lograr generar una respuesta auditiva selectiva igual a la que genera el canto propio completo, es suficiente con que el mismo conserve todas las frecuencias menores a 5.5 kHz. Con esta banda acotada logramos recuperar el 100% de la actividad neuronal generada por la reproducción del canto original.

Teniendo en cuenta los resultados conjuntos de las respuestas generadas por los *fBOS* filtrados con pasa-bajos y pasa-altos, podemos afirmar que el rango de frecuencias más relevante para generar respuesta auditiva en HVC está entre los 1.5 kHz y los 5.5 kHz. Este rango es más acotados que el campo auditivo de estas aves (20 Hz – 20 kHz), pero coincide en gran medida con la frecuencia de resonancia de la cavidad orofaríngea-esofágica ubicada entre los 2.8 kHz – 5.5 kHz (Riede et al., 2013). La resonancia del órgano depende exclusivamente del volumen de la cavidad, es decir está enteramente restringida por la morfología y la biomecánica del aparato fonador. Esta coherencia entre las propiedades acústicas de la anatomía y la codificación neuronal nos permiten especular con una posible especialización del circuito neuronal del canto fuertemente moldeada por los límites biomecánicos.

Para complementar el análisis decidimos estudiar qué ocurría con el potencial local de campo durante el *feedback* auditivo en animales durmiendo. Son pocos los estudios sobre el potencial local de campo en el núcleo HVC. Los dos trabajos más relevantes en el área reportan un aumento en la fuerza de la banda de 30 Hz y gamma-alta (80 – 200 Hz) durante la producción del canto (Brown et al., 2021; Markowitz et al., 2015). Como parte de mi trabajo doctoral busqué cuáles bandas del LFP aumentaban su actividad durante

la presentación del canto propio mientras el animal dormía. Evalué las bandas más estudiadas en la literatura: delta, theta, alfa, beta, gamma, gamma-alta y 30 Hz.

En una primera aproximación, estudiamos como variaba la fuerza del potencial local de campo durante la presentación de estímulos auditivos en comparación con el silencio posterior (Figura 13). Evaluamos el efecto del canto propio y el control REV (Figura 14). Encontramos que casi la totalidad de las bandas más estudiadas en la literatura no cambian su actividad frente a la presentación de estos estímulos auditivos. Únicamente la banda de 30 Hz aumenta su fuerza durante la presentación del canto propio (Figura 15). Los resultados se diferencian respecto a lo hallado en animal cantando, donde estudios previos muestran que tanto la banda de 30 Hz como la gamma-alta aumentan su fuerza cuando el animal canta. Esta última señal es objeto de estudio en otros modelos animales donde está asociada a la actividad motora (Pfurtscheller et al., 2003). Por el contrario, hay pocos trabajos acerca de la banda de 30 Hz debido a que no forma parte de los recortes de banda tradicionales.

Luego de la primera caracterización, analizamos cómo fue la respuesta de la banda de 30 Hz para los cantos propios filtrados. La fuerza de la señal se comportó con una tendencia similar a la respuesta neuronal. En este caso, al eliminar las frecuencias menores a 1.5 kHz (principalmente frecuencias fundamentales) la respuesta de la banda de 30 Hz no tiene diferencias estadísticamente significativas con la generada por el canto completo. Aquí encontramos una primer diferencia con lo reportado para la respuesta neuronal, donde vimos que al eliminar las fundamentales la integral de disparos neuronales disminuye levemente. La segunda diferencia queda en evidencia al eliminar las frecuencias por encima de 3.5 kHz, donde la fuerza de la señal es estadísticamente igual a la generada por el estímulo BOS. Recordemos que para lograr recuperar el 100% de la integral de disparos normalizada que generaba el BOS, debíamos utilizar un filtro pasabajas con una frecuencia de corte mayor o igual a 5.5 kHz.

La interpretabilidad del análisis de la banda de 30 Hz queda subyugada a la respuesta generada por el estímulo REV. Contrario a las estimaciones, esperábamos que la fuerza de la señal en respuesta al REV sea siempre la menor, como ocurre con la integral de disparos normalizada. Este resultado por fuera de las predicciones abre más interrogantes sobre qué es lo que podría estar integrando el LFP y a su vez aporta más datos para intentar dilucidar un problema aún abierto en la neurociencia sobre qué es y qué nos informa el potencial local de campo.

4 MODELADO DE CANTOS VARIANDO PARÁMETROS BIOMECÁNICOS

4.1 MOTIVACIÓN

El director del *Laboratorio de Sistemas Dinámicos*, Gabriel Mindlin, desarrolló previamente un modelo biofísico que logra generar muy buenas imitaciones del canto de aves (Amador et al., 2013; Gardner et al., 2001; Laje & Mindlin, 2005; Mindlin et al., 2003; Perl et al., 2011; Sitt et al., 2008). Este modelo, además de su buen desempeño en la generación de cantos sintéticos, describe los procesos mecánicos y fisiológicos intervinientes, utilizando para esto ecuaciones diferenciales de baja dimensionalidad. Esto es consecuencia de su fuerte inspiración en la biofísica detrás de la producción vocal. Como vimos en los Capítulos 1.2 y 1.3, el sistema puede dividirse en dos secciones. Por un lado se modela la siringe, el órgano responsable de la generación del sonido, y por otro, el tracto vocal conformado por la tráquea, glotis, cavidad orofaríngea-esofágica y pico. Cuando el sonido generado por la siringe atraviesa el tracto vocal el mismo se filtra, modulando así su composición espectral. Cada segmento del tracto se comporta como un filtro pasivo con características particulares que dependen directamente de las dimensiones del órgano. Al realizar cambios en los tamaños de las distintas componentes del tracto vocal, generamos cantos sintéticos que reflejan estas modificaciones. Si agregamos parámetros de escaleo, podemos hacer que el modelo de producción vocal se transforme en un generador de cantos de aves con variaciones de tamaño determinadas por el investigador.

4.2 MÉTODOS ESPECÍFICOS

Los cantos sintéticos fueron generados con una rutina escrita en Python, reproduciendo los trabajos de Mindlin y colaboradores. Las referencias más relevantes son (Amador et al., 2013; Bush et al., 2018; Perl et al., 2011) . Todos los códigos que desarrollé y utilicé están disponibles en mi perfil de GitHub (<https://github.com/jlassaortiz/PSTH> online).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Modificación de modelo biomecánico considerando leyes de escala

El modelo biomecánico que se desarrollaron Mindlin y colaboradores en el laboratorio está descrito por las siguientes 6 ecuaciones (más detalles en Capítulo 1.3):

$$\frac{dx}{dt} = y \quad (1)$$

$$\frac{dy}{dt} = -\alpha(t)\gamma^2 - \beta(t)\gamma^2x - \gamma^2x^3 - \gamma x^2y + \gamma^2x^2 - \gamma xy \quad (2)$$

$$\frac{di_1}{dt} = i_2 \quad (3)$$

$$\frac{di_2}{dt} = \frac{-i_1}{L_g C_h} - R_h \left(\frac{1}{L_b} + \frac{1}{L_g} \right) i_2 + i_3 \left(\frac{1}{L_g C_h} - \frac{R_b R_h}{L_b L_g} \right) + \frac{1}{L_g} \frac{dV_{ext}(t)}{dt} + \frac{R_h V_{ext}(t)}{L_g L_b} \quad (4)$$

$$\frac{di_3}{dt} = -\frac{L_g i_2}{L_b} - \frac{R_b i_3}{L_b} + \frac{V_{ext}(t)}{L_b} \quad (5)$$

$$V_{ext}(t) = f(l_t, t) \quad (6)$$

Las ecuaciones (1) y (2) modelan la siringe, el órgano que actúa como fuente de sonido en las aves. El resto de las ecuaciones modelan el paso de la señal por el tracto vocal. Este se comporta como una serie de filtros pasivos que modulan el sonido proveniente de la fuente. En las ecuaciones (3), (4), (5) y (6) encontramos varios parámetros que se relacionan directamente con la biomecánica del aparato fonador. Donde: R_b y L_b corresponden a la resistencia e inductancia del circuito que representa al pico (*beak* en inglés), R_h y C_h corresponden a la resistencia y capacitancia del circuito que representa la OEC, modelada como un resonador de *Helmholtz*, L_g corresponde a la inductancia del circuito que representa la glotis, i representa la corriente eléctrica teórica.

En particular, algunos escalan con el tamaño del ave. Las relaciones de estos con las dimensiones del animal son las siguientes:

$$C_h, R_h, R_b, L_b, L_g \text{ *prámetros relacionados con el tamaño cabeza*} \quad (7)$$

$$l_t = \text{largo tráquea parámetro relacionado con el largo cuello} \quad (8)$$

Para modificar el tamaño del ave debemos introducir un parámetro de escala al que llamamos $\lambda = (1 \pm \varepsilon)$. Este toma valores alrededor de 1 (uno) donde el tamaño del ave aumentará o disminuirá en un porcentaje definido por ε .

Para que el escaleo tenga sentido desde el punto de vista biológico, elegimos $\varepsilon = 0.4$. La motivación de escalar al animal en un 40% respecto al valor de referencia se basa en que el peso promedio de un diamante mandarín es de aproximadamente 17.8g (promedio calculado a partir de la base de datos de aves del laboratorio; $n = 33$). En consecuencia, al elegir $\lambda = 0.6$ o $\lambda = 1.4$, estaríamos modelando un animal con un peso de 10.7g o 24.9g respectivamente. Ambos valores pueden ser pesos de individuos reales, en otras palabras, corresponderían a dimensiones de animales posibles de encontrar en la naturaleza. En particular, en la base de datos interna el mínimo y máximo peso que encontramos es 11.5g y 29.7g respectivamente.

El tracto vocal (tráquea, glotis, cavidad orofaríngea-esofágica y pico) está modelado como un circuito eléctrico análogo al sistema acústico. Esta forma de representación en términos de circuitos eléctricos es usual en acústica (más detalles en Capítulo 1.3). Las equivalencias entre los distintos componentes acústicos y eléctricos es la siguiente:

Tabla 1. Analogías eléctricas y acústicas. Tabla modificada de (Perl et al., 2011)

Parámetros eléctricos	Equivalente acústico
Impedancia	Inertancia
L	$M = \frac{\rho_0 l}{S}$ Donde $l = \text{largo}$, $S = \text{área}$ y $\rho_0 = \text{densidad del aire}$
Resistencia	Resistencia
R	$R = \frac{\rho_0 c k^2}{2\pi}$ Donde $\rho_0 = \text{densidad del aire}$, $c = \text{velocidad del sonido}$ y $k = \text{constante restitución}$
Capacitancia	Admitancia
C	$C = \frac{V}{\rho_0 c^2}$

Donde $V = \text{volumen}$, $\rho_0 = \text{densidad del aire}$ y $c = \text{velocidad del sonido}$

A partir de estas equivalencias y siguiendo un trabajo previo realizado por Mindlin y colaboradores (Uribarri et al. 2020), introducimos el parámetro λ de la siguiente manera:

$$L' = \frac{\rho_0 l'}{S'} = \frac{\rho_0 l \lambda}{S \lambda^2} = \frac{\rho_0 l}{S} \frac{1}{\lambda} = \frac{L}{\lambda}$$

$$C' = \frac{V'}{\rho_0 c^2} = \frac{V \lambda^3}{\rho_0 c^2} = \frac{V}{\rho_0 c^2} \lambda^3 = C \lambda^3$$

Por la ecuación (4) sabemos que en la siguiente expresión ambos términos de la resta tienen las mismas unidades:

$$\frac{1}{L_g C_h} - \frac{R_b R_h}{L_b L_g} \leftrightarrow \frac{1}{[LC]} = \frac{[R]^2}{[L]^2} \leftrightarrow \frac{1}{\frac{1}{\lambda} \lambda^3} = \frac{[R]^2}{\frac{1}{\lambda^2}} \leftrightarrow \frac{1}{\lambda^2} = [R]^2 \lambda^2 \leftrightarrow [R]^2 = \frac{1}{\lambda^4} \leftrightarrow$$

$$\leftrightarrow [R] = \frac{1}{\lambda^2}$$

$$R' = \frac{R}{\lambda^2}$$

Finalmente, el largo de la tráquea es directamente proporcional a la magnitud del escaleo:

$$l'_t = l_t \lambda$$

De esta manera, contamos con un método para modificar el tamaño del ave. Más aun, podemos modificar de manera independiente el tamaño de la cabeza y del cuello. Esto nos permite generar cantos sintéticos de aves más chicas o más grandes (siguiendo las leyes de escala) y además de aves “monstruosas” que no existen en la naturaleza. Por ejemplo, podemos sintetizar el canto de un ave con tamaño de cabeza normal ($\lambda_{\text{cabeza}} = 1.0$) y el cuello más largo ($\lambda_{\text{cuello}} = 1.4$).

4.3.2 Modelado de cantos sintéticos

Como primer paso, y antes de variar el parámetro de escala introducido, generamos imitaciones del canto propio lo más realistas posibles con $\lambda = 1$. En la Figura 17 se puede ver la comparación de un canto real y el mejor canto sintético generado (sin modificar el “tamaño” del ave).

Para hacer el mejor canto sintético buscamos los parámetros C_h , R_h , R_b y L_b óptimos. El método que desarrollamos en el laboratorio fue el siguiente:

1. Genero un canto sintético utilizando valores históricos previamente utilizados en el laboratorio. El buen desempeño de estos parámetros fue validado de manera experimental en trabajos previos (Amador et al., 2013; Bush et al. 2018; Perl et al., 2011).
2. Comparo los espectrogramas (Figura 17) y composición espectral (Figura 18) del canto sintético con el del canto real y busco diferencias en la intensidad de las frecuencias.
3. Modifico de a uno los parámetros.
4. Repito el paso 2 y 3 hasta que no encuentro mejoras respecto de la última iteración.

En el apéndice se explica con mayor detalle el criterio de cómo modificar el valor de los parámetros y más detalles del método de búsqueda del canto sintético ideal.

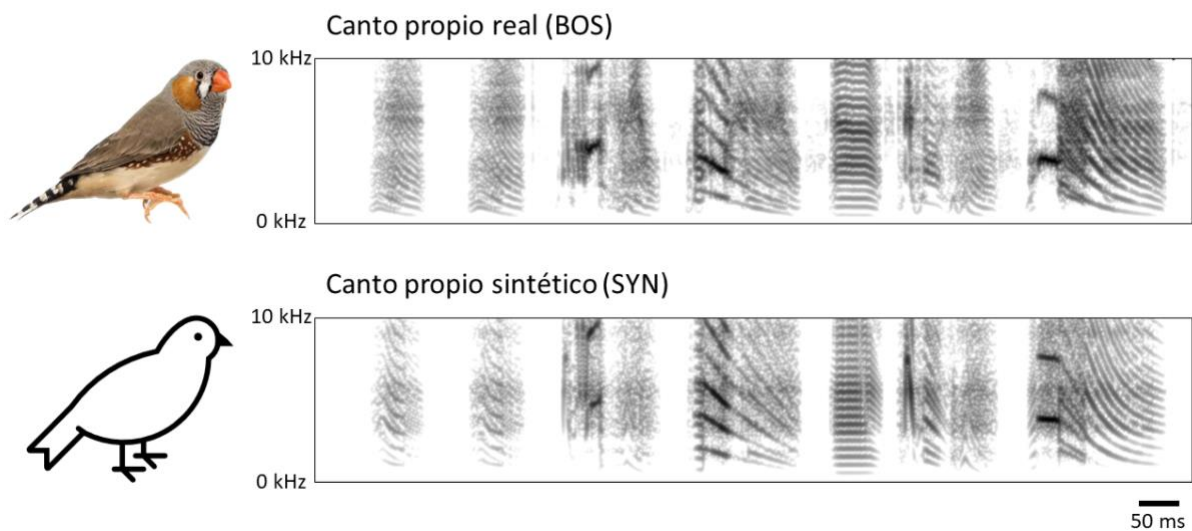


Figura 17. Comparación entre espectrogramas del canto propio real de un ave (arriba) y el mejor canto sintético generado (abajo). Aquí el parámetro de escala introducido está definido como $\lambda = \lambda_{\text{cabeza}} = \lambda_{\text{cuello}} = 1$.

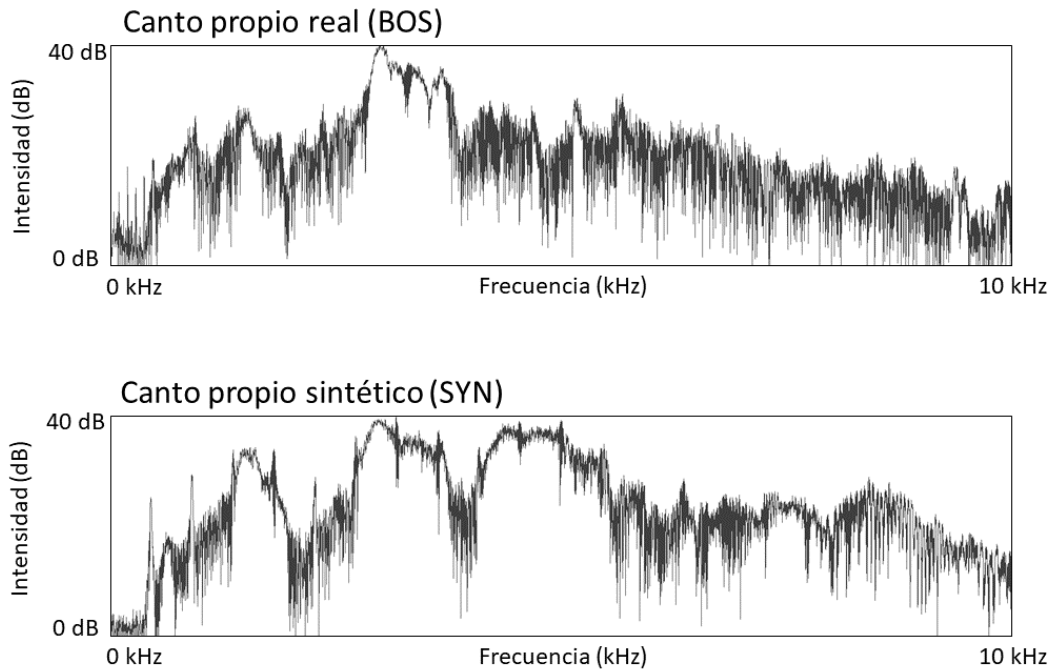


Figura 18. Composición espectral del canto propio real (arriba) y el sintético (abajo) calculada a partir de la FFT (Fast Fourier Transform) del sonido.

Una vez encontrados los parámetros ideales procedíamos a la generación del resto de los estímulos auditivos variando el parámetro de escala λ . Como comentamos anteriormente, podemos variar de manera independiente el tamaño de la cabeza y del cuello, permitiéndonos evaluar el efecto de estas combinaciones no-naturales.

En la Figura 19 podemos ver el espectrograma y la composición espectral del canto sintético ideal ($\lambda = 1$; arriba), el canto sintético de un ave ficticia con un largo de cuello normal y la cabeza más grande ($\lambda_{\text{cuello}} = 1.0$ & $\lambda_{\text{cabeza}} = 1.4$; en medio) y el canto sintético de un ave con el cuello más largo y tamaño de cabeza normal ($\lambda_{\text{cuello}} = 1.4$ & $\lambda_{\text{cabeza}} = 1.0$; abajo). La fecha y la línea punteada señala, a modo de ejemplo, frecuencias donde existen diferencias en la composición espectral entre los estímulos.

Otro análisis que llevamos adelante fue la caracterización del aparato vocal usando ruido blanco como señal sonora. Lo que hicimos fue, para distintos valores del parámetro de escala λ , introducir como señal de entrada ruido blanco a las ecuaciones que describen el aparato vocal. Luego evaluamos como era la composición espectral del sonido de salida. En la Figura 20 mostramos la composición espectral del sonido de entrada (ruido blanco, línea gris) y la del sonido que sale del aparato vocal (línea negra). Hacemos este análisis

para tractos vocales provenientes de un animal pequeño ($\lambda_{cuello} = \lambda_{cabeza} = 0.6$, arriba), de tamaño normal ($\lambda_{cuello} = \lambda_{cabeza} = 1.0$, en medio) y grande ($\lambda_{cuello} = \lambda_{cabeza} = 1.4$, abajo). En la figura se puede observar como a medida que aumenta el tamaño del animal, la señal de salida se enriquece en bajas frecuencias.

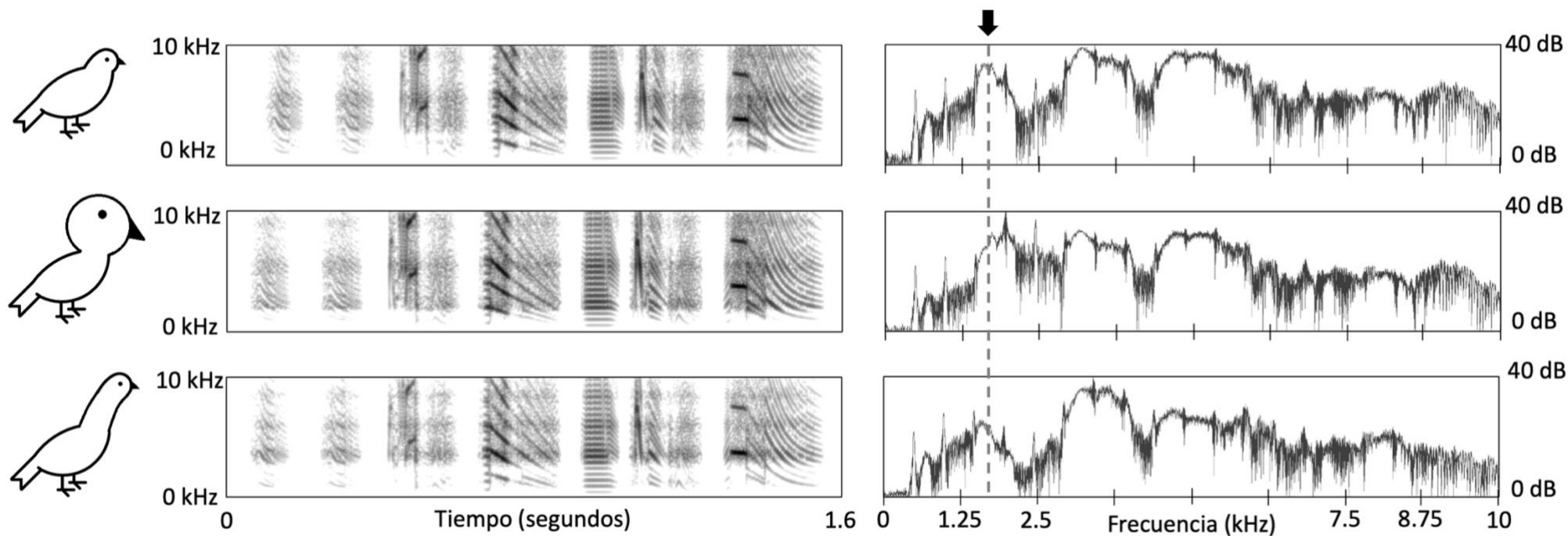


Figura 19. Ejemplos espectrograma (izquierda) y composición espectral (derecha) de distintos cantos sintéticos al variar los parámetros de escala. Arriba mostramos el canto sintético “ideal” (tamaño estándar). En medio, el canto del ave “cabeza grande y cuello normal” y abajo el canto sintético del ave “cuello largo y cabeza de tamaño normal”. Tanto en el espectrograma como en la composición espectral podemos apreciar diferencias en la modulación espectral. La fecha y línea punteada señalan las frecuencias donde la diferencia en la composición espectral es más pronunciada. Otra diferencia puede verse en el espectrograma del canto sintético “cuello largo y cabeza de tamaño normal” (abajo), donde las frecuencias más bajas son menos intensas en comparación a los otros dos estímulos

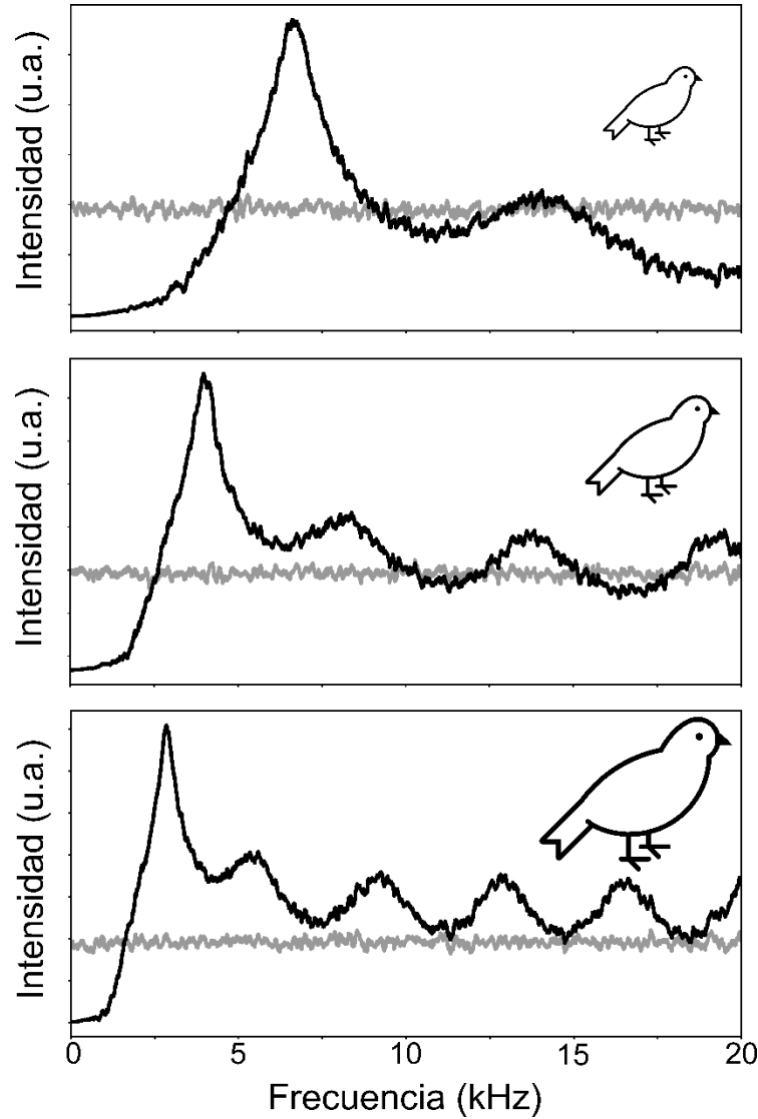


Figura 20. Caracterización del tracto vocal. Gráfico del comportamiento del filtro al usar como señal de entrada ruido blanco. En gris se muestra la composición espectral de la señal de entrada (ruido blanco) y en negro la señal filtrada que sale del aparato vocal. Arriba, caracterización del filtro de un ave “chica” ($\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}} = 0.6$), al medio comportamiento del filtro de un ave de tamaño “estándar” ($\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}} = 1.0$) y abajo caracterización del filtro de un ave “grande” ($\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}} = 1.4$).

4.4 CONCLUSIONES

El modelo biomecánico de producción vocal desarrollado previamente en el laboratorio por Mindlin y colaboradores se inspira fuertemente en la biofísica de la fonación. Esto presenta una enorme ventaja ya que nos permite modificar variables con fuerte correlato fisiológico y evaluar cómo se modifica el canto sintetizado. Como parte de mi trabajo doctoral, agregué al modelo un parámetro de escaleo λ que permitiera modificar el tamaño

del ave. La implementación se hizo de manera que se pudieran modificar de forma independiente el tamaño de la cabeza y del cuello dentro de un rango de tamaños biológicamente posible. Esto nos permite generar cantos sintéticos respetando las leyes de escala ($\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}}$) aunque podían ser aves más chicas ($\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}} = 0.6$) o más grandes ($\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}} = 1.4$) que el canto sintético ideal ($\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}} = 1.0$). Además, somos capaces de generar cantos provenientes de aves “monstruosas” donde $\lambda_{\text{cuello}} \neq \lambda_{\text{cabeza}}$. La combinación de parámetros no es fisiológica, por lo que los cantos sintéticos con estas características no deberían encontrarse en la naturaleza.

La gran libertad para modificar parámetros fisiológicos involucrados en las vocalizaciones, hacen al modelo una herramienta aún más versátil y valiosa. Si elegimos con cuidado distintas combinaciones de λ_{cuello} y λ_{cabeza} , podemos utilizar estos estímulos para intentar dilucidar como se codifican la biomecánica de las vocalizaciones en HVC. Actualmente está en discusión cómo es la codificación del canto en este núcleo. Contar con una herramienta teórica como esta puede ayudar al entendimiento de los procesos neuronales involucrados detrás de un comportamiento tan complejo como es el canto de las aves.

5 RESPUESTA NEURONAL A CANTOS SINTÉTICOS

5.1 MOTIVACIÓN

El modelo biofísico de producción vocal en aves desarrollado por el *Laboratorio de Sistemas Dinámicos* por Mindlin y colaboradores tiene un fuerte correlato con los procesos mecánicos y fisiológicos intervinientes en las vocalizaciones. Aplicando cambios al modelo de manera controlada podemos generar estímulos que nos ayuden a develar como se codifica la biomecánica de la producción vocal en el núcleo HVC.

Como se explica en el Capítulo 4, la versatilidad del modelo permite que variemos el tamaño del animal, lo que en consecuencia modificará la composición espectral del canto sintético. El escaleo del modelo puede hacerse siguiendo las leyes de escala o variando de manera independiente el tamaño de la cabeza y el cuello. Esta última estrategia generará cantos sintéticos provenientes de animales que son imposibles de encontrar en la naturaleza.

Uno de los objetivos de esta tesis fue intentar dilucidar si existe una diferencia en la respuesta neuronal de HVC frente a estímulos sintéticos que siguen las leyes de escala y estímulos que no lo hacen. Para ello realizamos un experimento de registro de actividad neuronal en ave dormida (ver Capítulo 2.5) mientras reproducíamos grabaciones del canto propio (BOS), cantos sintéticos (SYN) que siguieran las leyes de escala y otros que no lo hicieran, además de los controles CON (canto conespecífico) y REV (canto propio reverso).

5.2 MÉTODOS ESPECÍFICOS

Generación de estímulos auditivos

Para verificar nuestra hipótesis generamos cantos sintéticos variando de manera independiente los parámetros de escala λ_{cuello} y λ_{cabeza} . Realizamos todas las combinaciones posibles para los siguientes valores: $\lambda_{\text{cuello}} \in \{0.6, 1.0, 1.4\}$ y $\lambda_{\text{cabeza}} \in \{0.6, 1.0, 1.4\}$, por lo que obtuvimos un total de 9 cantos sintéticos. De estos, solamente 3 combinaciones de λ_{cuello} y λ_{cabeza} respetaban las leyes de escala ($\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}} = 0.6$; $\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}} = 1.0$ y $\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}} = 1.4$). El resto de los estímulos tenían combinaciones de parámetros correspondientes a animales “monstruosos” imposibles de encontrar en la naturaleza.

Elegimos que los valores de λ (tanto para el cuello como para la cabeza) varíen un 40% respecto al valor de referencia. Para generar el canto sintético ideal, donde el tamaño del animal es estándar, el parámetro usado es $\lambda = 1$. Luego, para generar versiones “pequeñas” usamos $\lambda = (1 - 0.4) = 0.6$, lo que quiere decir que “achicamos” al animal en un 40%. Por otro lado, para hacer cantos provenientes de animales “más grandes” usamos $\lambda = (1 + 0.4) = 1.4$, que se traduce en “agrandar” al animal en un 40%.

La motivación de elegir variar los tamaños un 40% respecto al valor de referencia se basa en que el peso promedio de un diamante mandarín es de aproximadamente 17.8g (promedio calculado a partir de la base de datos de aves del laboratorio; $n = 33$). En consecuencia, al elegir $\lambda = 0.6$ o $\lambda = 1.4$, estaríamos modelando un animal con un peso de 10.7g o 24.9g respectivamente. Ambos valores pueden ser pesos de individuos reales, en otras palabras, corresponderían a tamaños de animales posibles de encontrar en la naturaleza. En particular, en la base de datos interna el mínimo y máximo peso que encontramos es 11.5g y 29.7g respectivamente.

Protocolo experimental

Una vez que contamos con los estímulos auditivos, proseguimos con los protocolos experimentales descriptos en Métodos Generales. Primero implantamos el soporte craneal estereotáxico (Capítulo 2.4) y 48 horas más tarde realizamos las mediciones de actividad neuronal en animal dormido (Capítulo 2.5).

5.3 RESULTADOS

Mediante el uso de un electrodo extracelular registramos la actividad neuronal proveniente de múltiples unidades, lo que se denomina como Actividad Multiunidad (conocida como MUA por sus siglas del inglés *Multi-Unit Activity*). Evaluamos como es la respuesta acumulada de los disparos neuronales que se produjeron en cada una de las 20 repeticiones de cada estímulo. Como primer paso de control, verificamos que la respuesta sea específica al canto propio (BOS) y no al canto reverso (REV) ni al de un conoespecífico (CON). Para visualizar esto de manera efectiva, generamos histogramas de los disparos acumulados (barras grises de 15ms de ancho) para cada estímulo auditivo y sobre estos graficamos una curva que integra los disparos neuronales (*sliding window technique*) para obtener mayor detalle y resolución temporal (ventana de 15ms que se desliza en pasos de 5ms) (ver Figura 21). La presencia de actividad selectiva al canto propio nos indica que el lugar de registro fue efectivamente dentro del núcleo HVC y que el animal se encontraba

dormido (más detalles sobre el comportamiento electrofisiológico de HVC en Capítulo 1.4). Además, sumamos como un control extra la actividad neuronal generada por el canto sintético ideal ($\lambda_{cuello} = \lambda_{cabeza} = 1.0$, Figura 21 en azul).

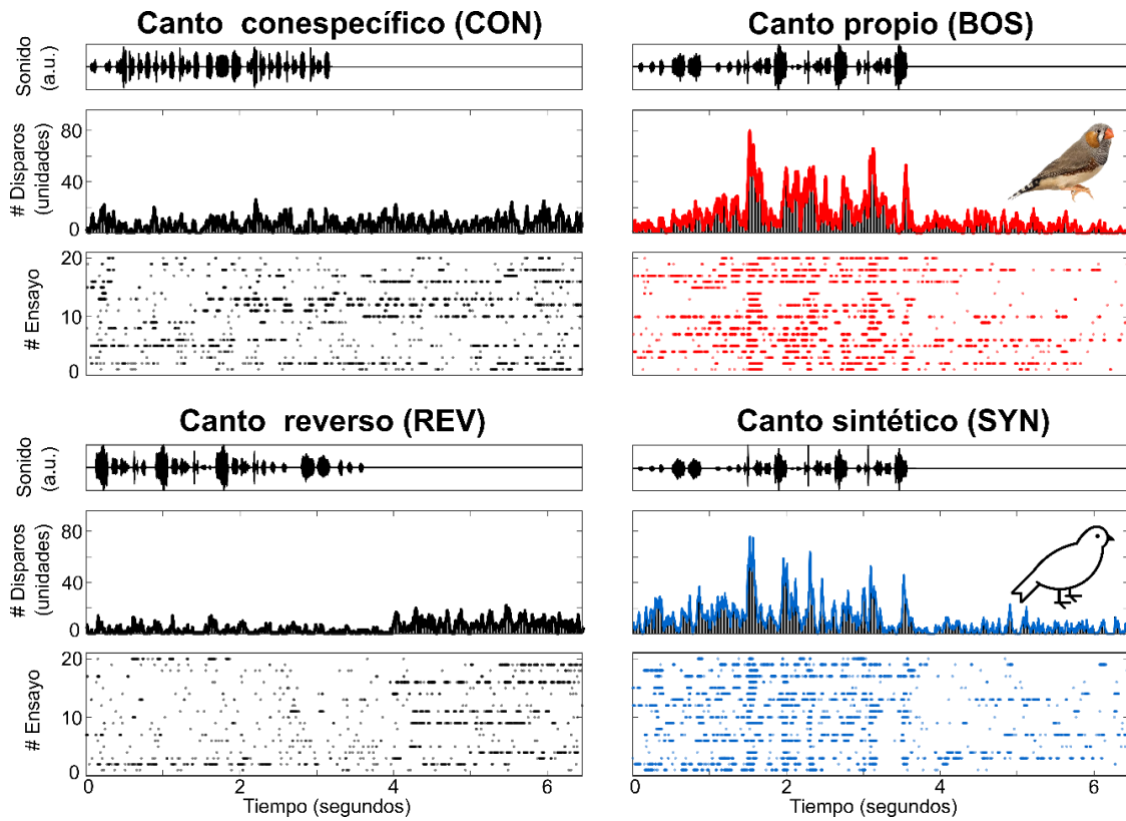


Figura 21. Respuesta neuronal en núcleo HVC al canto propio, canto sintético, canto reverso y conespecífico. Para cada tipo de estímulo se muestra la señal de sonido alineada con el histograma de actividad neuronal acumulada (barras grises de 15ms de ancho) junto con la curva que integra los disparos neuronales (sliding window technique, ventana de 15ms que se desliza en pasos de 5ms) y los eventos de disparo de neuronas a lo largo de las 20 repeticiones de cada estímulo. Los histogramas de respuesta neuronal acumulada revelan una respuesta neuronal selectiva al canto propio (en rojo) y al canto sintético (en azul).

Analizamos el resto de las respuestas neuronales a los distintos estímulos auditivos con la misma estrategia con la que analizamos los controles. En la Figura 22 se muestra la respuesta a cada una de las 9 versiones de cantos sintéticos que surgen de las distintas combinaciones de λ_{cuello} y λ_{cabeza} para un solo sitio de registro en un animal.

En una primera aproximación, los estímulos que siguen las leyes de escala (aquellos sobre la diagonal ascendente, con valores $\lambda_{cuello} = \lambda_{cabeza} = 0.6$; $\lambda_{cuello} = \lambda_{cabeza} = 1.0$ y $\lambda_{cuello} = \lambda_{cabeza} = 1.4$) parecen tener respuestas similares mientras que algunos de los SYN “monstruosos” generan una respuesta neuronal menor (i.e. $\lambda_{cuello} = 1.4$ y $\lambda_{cabeza} = 1.0$).

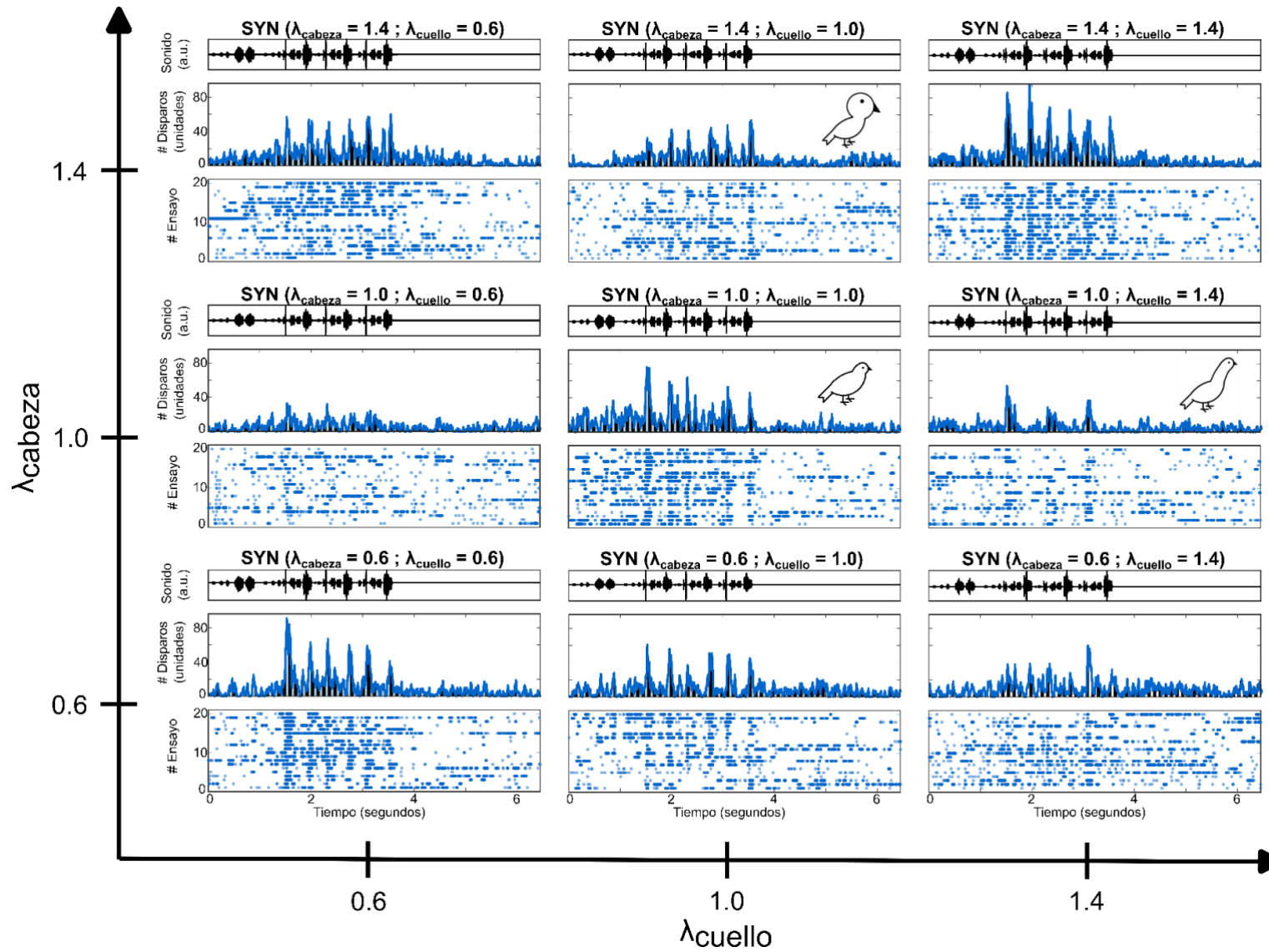


Figura 22. Ejemplo de una grilla de respuestas neuronales generadas por la presentación de diferentes cantos sintéticos en un mismo sitio de registro. Los ejes de la grilla indican la combinación de los parámetros de escaneo (λ_{cuello} y λ_{cabeza}) de cada estímulo. Para cada tipo de estímulo se muestra la señal de sonido alineada con el histograma de actividad neuronal acumulada y los eventos de disparo de neuronas a lo largo de las 20 repeticiones de cada estímulo. Los estímulos que siguen las leyes de escala (aquellos sobre la diagonal ascendente, con valores $\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}} = 0.6$; $\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}} = 1.0$ y $\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}} = 1.4$) parecen tener respuestas similares mientras que algunos de los SYN “monstruos” generan una respuesta neuronal menor (i.e. $\lambda_{\text{cuello}} = 1.4$ y $\lambda_{\text{cabeza}} = 1.0$).

Al igual que en el Capítulo 3.3.1, para cuantificar de manera más sistemática la respuesta neuronal selectiva proponemos un índice al que llamamos “integral de disparos normalizada”. Calculamos el mismo a partir de sumar el total de disparos neuronales que ocurren durante la presentación de los estímulos y luego lo normalizamos por el total de disparos generados por el canto propio real. De esta manera el índice cuantifica la selectividad de HVC tomando como referencia el BOS (para más detalles ver Capítulo 2.5). Calculamos estos valores para cada estímulo que se muestra en la Figura 22. Al graficarlos en un plano podemos generar una ilustración como se ve en la Figura 23. Los círculos azules indican el valor de la integral de disparos normalizada para la combinación de λ_{cuello} y λ_{cabeza} correspondiente.

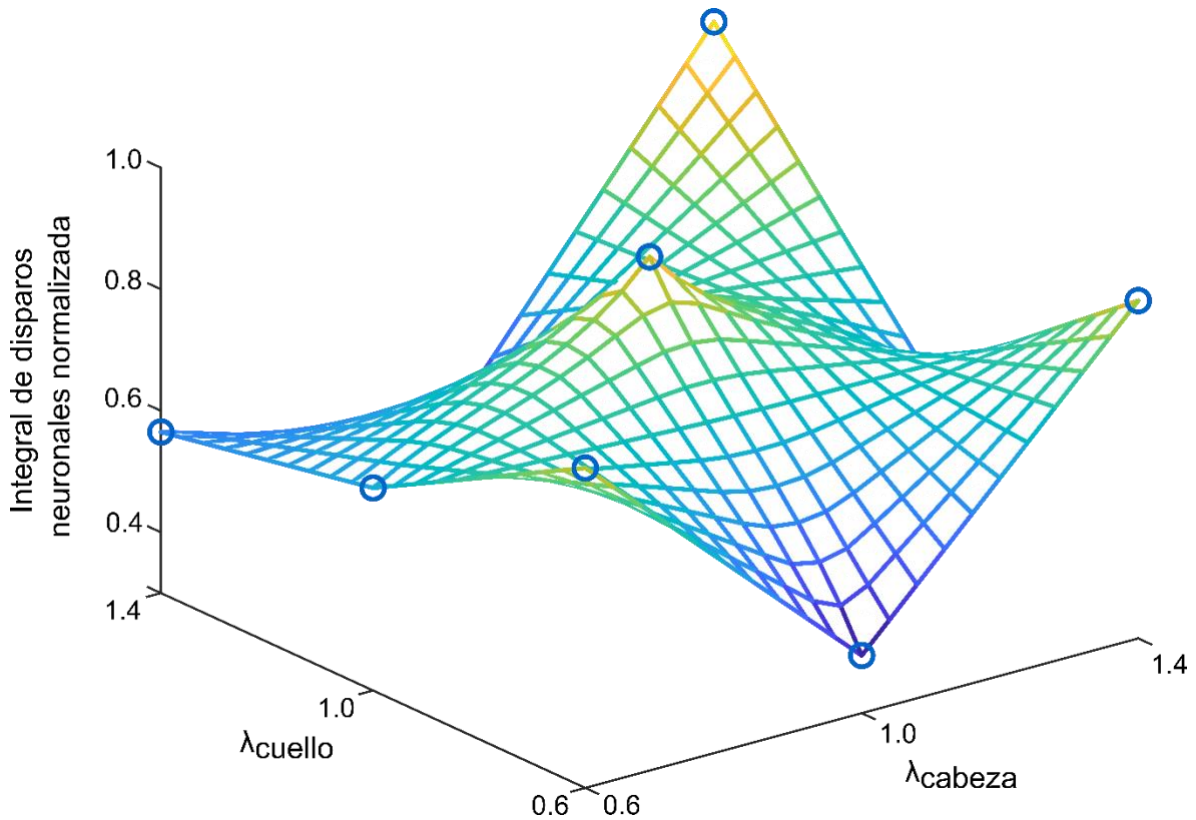


Figura 23. Gráfico de la integral de disparos normalizada de los registros mostrados en la Figura 22. Para cada uno de los estímulos de la figura anterior, calculamos la integral de disparos normalizada y la graficamos en función del plano de combinaciones de los parámetros de escaleo (λ_{cuello} y λ_{cabeza}).

Logramos obtener datos de 23 sitios de registro diferentes de un total de 2 aves (9 sitios de un ave y 14 del otro). Los datos acumulados se pueden ver en la Figura 24. Los puntos

azules corresponden al valor de la integral de disparos normalizada de cada uno de los 23 sitios de registro, mientras que el punto negro y la barra vertical indican la media y error estándar. Además, indicamos con números el valor de la media. En trabajos previos (Amador et al., 2013), el canto sintético lograba recuperar en promedio un 58% de la actividad neuronal que ocurre durante la presentación del canto propio. El desempeño de los cantos sintéticos ideales ($\lambda_{cuello} = \lambda_{cabeza} = 1.0$) que usé para esta tesis fue similar. Dentro de estos resultados parciales logro recuperar en promedio un 53% de la actividad (ver Figura 24), siendo esto comparable con resultados anteriores.

Buscamos determinar si existen diferencias entre la respuesta neuronal generada por el SYN ideal y el resto de los cantos sintéticos dentro de este conjunto de datos preliminares. Para ello hicimos un modelo lineal generalizado modelando varianzas. Aun siendo el tamaño de la muestra pequeño (solo tenemos datos provenientes de dos aves), encontramos diferencias significativas con cuatro estímulos (GLM modelando las varianzas, $p < 0.05$), aquellos marcados con un asterisco en la Figura 24. Todos estos tienen en común que son cantos sintéticos generados a partir de combinaciones donde $\lambda_{cuello} \neq \lambda_{cabeza}$, es decir el modelo que los generó no respeta las leyes de escala. En consecuencia, estos modelos no representan con fidelidad la biología de la producción vocal, sino que son composiciones “monstruosas” que no esperamos encontrar en la naturaleza.

Para cada estímulo existe una alta variabilidad en la respuesta. Para cada tipo de estímulo hicimos un test de diferencias de varianzas y no encontramos diferencias significativas (test de Levene, $p > 0.05$), por lo que concluimos que la variabilidad en la respuesta es la misma para todos los estímulos. Además, estudiamos si la intensidad de la respuesta podía estar correlacionada con la posición relativa del sitio de registro dentro de HVC. Desarrollamos un modelo lineal generalizado para analizar la respuesta neuronal (integral de disparos normalizada) al estímulo auditivo BOS en función de la posición dentro del núcleo HVC. La posición tridimensional del sitio de registro se determinó en coordenadas cartesianas, tomando como punto de referencia (0,0,0) el “punto Y” (referencia estereotáctica) y utilizando el micrómetro como unidad de medida. Para el modelo estadístico, cada una de las tres coordenadas que describen la posición se consideró como una variable explicativa independiente. Aunque los resultados provienen únicamente de dos aves y deben ser considerados preliminares, no encontramos evidencia estadísticamente significativa que sugiera que la respuesta neuronal generada por el estímulo auditivo BOS dependa de la posición del sitio de registro dentro del núcleo HVC.

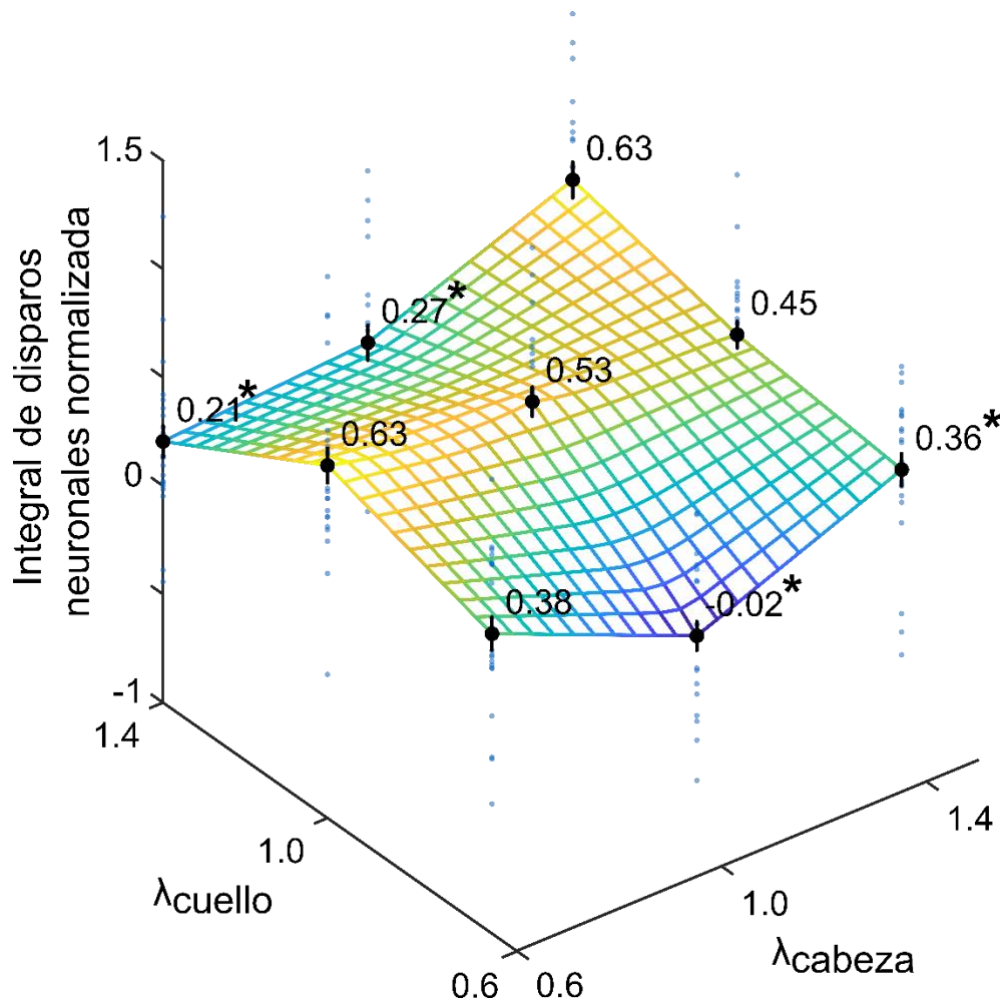


Figura 24. Datos agrupados de las grillas de respuesta neuronal normalizada a distintos cantos sintéticos. Cada punto azul corresponde al valor de actividad neuronal de un sitio de registro y el punto negro indica la media resultante. En este conjunto de datos preliminares, los estímulos que no siguen las leyes de escala tienen valores significativamente menores (GLM, $p < 0.05$, marcados con asterisco). Los datos provienen de 23 sitios de solamente 2 aves distintas.

Nos interesamos particularmente en comparar el desempeño de los modelos que respetaban las leyes de escala ($\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}}$) con aquellos donde el valor de λ_{cuello} y λ_{cabeza} son extremos y opuestos. Es decir, los modelos “monstruosos”: *cuello largo y cabeza chica* ($\lambda_{\text{cuello}} = 1.4$ y $\lambda_{\text{cabeza}} = 0.6$) y *cuello corto y cabeza grande* ($\lambda_{\text{cuello}} = 0.6$ y $\lambda_{\text{cabeza}} = 1.4$). En la Figura 25 mostramos los perfiles de integral de disparos normalizada (datos agrupados) para este subconjunto de estímulos. Al igual que en la Figura 24, los puntos negros indican el valor de la media. La línea azul continua marca la “diagonal” que une los estímulos que siguen las leyes de escala en la Figura 24, mientras que, la línea azul punteada marca la “diagonal” que une los cantos sintéticos más

“monstruosos” (con valores de λ_{cuello} y λ_{cabeza} extremos y opuestos). Esta es otra estrategia para visualizar que, si se respetan las leyes de escala, la respuesta neuronal parecería ser superior a los cantos sintéticos que no lo hacen.

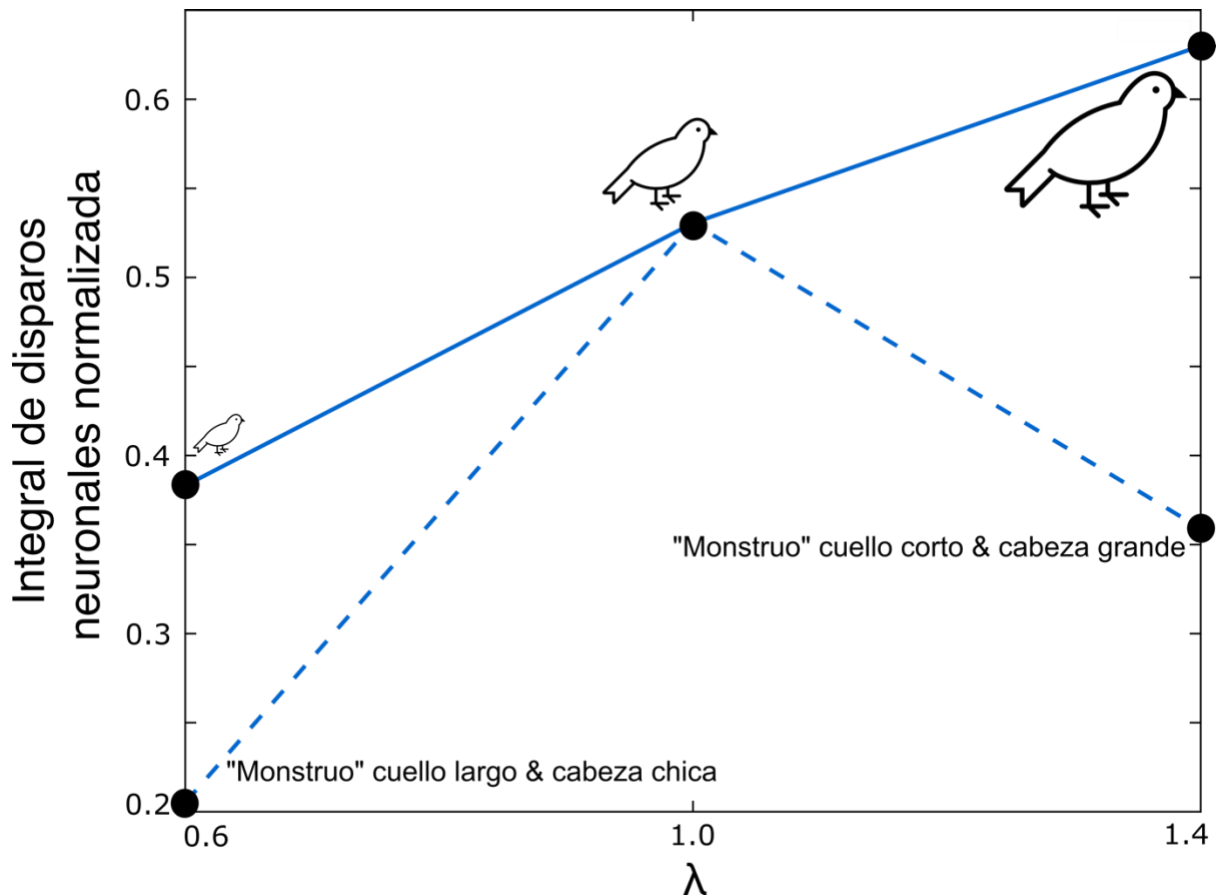


Figura 25. Perfiles de integral de disparos normalizada (datos preliminares agrupados de 23 sitios de registro de únicamente 2 aves distintas) para cantos sintéticos que respetan las leyes de escala ($\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}}$) con aquellos donde el valor de λ_{cuello} y λ_{cabeza} son extremos y opuestos, es decir, los modelos “monstruosos”: cuello largo y cabeza chica ($\lambda_{\text{cuello}} = 1.4$ y $\lambda_{\text{cabeza}} = 0.6$) y cuello corto y cabeza grande ($\lambda_{\text{cuello}} = 0.6$ y $\lambda_{\text{cabeza}} = 1.4$). Los puntos negros indican el valor de la media. La línea azul continua marca la “diagonal” que une los estímulos que siguen las leyes de escala en la Figura 24, mientras que la línea azul punteada marca la “diagonal” que une los cantos sintéticos más “monstruosos” (con valores de λ_{cuello} y λ_{cabeza} extremos y opuestos). Esta figura muestra como en un estímulo monstruoso la caída de la actividad neuronal es mucho mayor que en un estímulo que sigue las leyes de escala para este conjunto de datos preliminares.

5.4 CONCLUSIONES

Como se comentó en la Capítulo 4, el modelo de producción vocal desarrollado en el laboratorio por Mindlin y colaboradores refleja con fidelidad la biomecánica del aparato fonador. Disponemos de una herramienta que nos permite modificar parámetros fisiológicos que finalmente impactan en el canto sintético generado. Esto, sumado al

carácter sensorimotor de HVC, hizo posible llevar adelante el protocolo experimental comentado en esta sección, con el objetivo de sumar un aporte al entendimiento de la codificación del canto propio en el núcleo HVC.

Dentro de los parámetros fisiológicos del modelo que se pueden modificar se encuentran el largo efectivo del cuello y otros hiperparámetros proporcionales al volumen de la cavidad orofaríngea-esofágica. El diseño experimental que elegimos buscaba variar el largo de la tráquea y el tamaño de la cabeza utilizando el coeficiente de escala λ dentro de un rango de tamaños que sabemos que existe en la naturaleza. Generamos entonces una batería de estímulos donde algunos cantos sintéticos respetaban las leyes de escala ($\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}}$) y otros que no lo hacían ($\lambda_{\text{cuello}} \neq \lambda_{\text{cabeza}}$).

Uno de los objetivos de este trabajo doctoral fue intentar dilucidar si existe una diferencia en la respuesta neuronal dentro del núcleo HVC frente a estímulos sintéticos que siguen o no las leyes de escala. Los resultados parciales sugieren que, cuando los cantos respetan las leyes de escala ($\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}}$), no habría diferencias significativas con el canto sintético ideal ($\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}} = 1.0$), aunque resulta llamativo que el canto sintético del ave “gigante” (rico en bajas frecuencias) tenga una tendencia a responder con mayor intensidad. Esta tendencia es coherente con los resultados hallados por (Fukushima & Margoliash, 2015b). En ese trabajo, los investigadores encontraron que HVC prefería los cantos enriquecidos en bajas frecuencias y sugieren que esto es debido a que cuando el animal escucha su propio canto lo oye más grave como consecuencia de la conducción de bajas frecuencias por los huesos craneales.

Por otro lado, si los parámetros difieren para ambas componentes del tracto vocal (violando las leyes de escala, $\lambda_{\text{cuello}} \neq \lambda_{\text{cabeza}}$), la respuesta neuronal parece disminuir significativamente. Dentro de estos resultados preliminares, nos resultó curioso que la integral de disparos neuronales normalizada generada por el canto sintético “ave grande” ($\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}} = 1.4$), donde se cambian dos parámetros, genere una respuesta neuronal equivalente a la que hace el canto sintético ideal. Mientras que si al canto sintético ideal le modificamos solo el parámetro $\lambda_{\text{cuello}} = 1.4$, la respuesta neuronal decae, según sugieren estos resultados parciales. Lo llamativo de esto es la diferencia en la respuesta neuronal al modificar un solo parámetro comparado con modificar dos pero respetando las leyes de escala. La variación en la respuesta parecería radicar con mayor importancia en la combinación de los parámetros y no en la magnitud del cambio. Estos resultados preliminares sugieren que el núcleo HVC puede estar codificando información

biomecánica compleja acerca de su propio canto y que las leyes de escala estarían representadas en este núcleo sensorimotor. HVC de alguna manera podría diferenciar cantos sintéticos factibles de cantos sintéticos no factibles de encontrar en la naturaleza.

6 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

El trabajo desarrollado en esta tesis buscó avanzar en el conocimiento de cómo es la codificación neuronal de la biomecánica de los comportamientos complejos. En esta dirección, el trabajo que llevé adelante durante mi doctorado se focalizó en la codificación del canto propio dentro del núcleo HVC de diamantes mandarines. Apoyándonos en la cualidad sensorimotora del núcleo, realizamos experimentos de retroalimentación auditiva para intentar dilucidar qué aspectos de la biomecánica del canto son codificados en HVC. Utilizamos estímulos auditivos grabados y también sintéticos, estos últimos generados por un modelo biomecánico de producción vocal previamente desarrollado en el laboratorio. La versatilidad del modelo desarrollado por Mindlin y colaboradores, y el modelado de los procesos biomecánicos involucrados en la producción del canto, nos permitió desarrollar protocolos experimentales complejos fundamentales para los resultados de esta tesis.

En una primera aproximación nos preguntamos cuáles son las frecuencias del canto propio de los diamantes mandarines relevantes y necesarias para generar la respuesta neuronal selectiva en el núcleo HVC. Recordemos que los cantos de estas aves se caracterizan por su amplio ancho de banda, pudiendo encontrar sonidos desde 300 Hz hasta los 15 kHz. Para responder a este interrogante, realizamos experimentos de retroalimentación auditiva utilizando como estímulos el canto propio filtrado. Como primer paso, fue crucial examinar la frecuencia de corte de 1.5 kHz, ya que gran mayoría de las frecuencias fundamentales de las sílabas de los diamantes mandarines se sitúan por debajo de este límite. Por trabajos previos, se sabe que estos animales controlan voluntariamente las frecuencias fundamentales de sus vocalizaciones variando la tensión ejercida sobre los labios de la siringe (Döppler et al., 2018; Goller & Suthers, 1996). Nuestro estudio reveló que, si conservamos solo las frecuencias bajas, entonces no se genera una respuesta selectiva a este canto propio modificado. En otras palabras, las frecuencias fundamentales no son suficientes para inducir la respuesta neuronal selectiva en el núcleo HVC. En cambio, al eliminar solo las bajas frecuencias menores a 1.5 kHz, la respuesta generada por el estímulo sonoro filtrado es mayor a la espontánea aunque significativamente inferior a la del canto completo. **Este conjunto de hallazgos señala que las frecuencias fundamentales son necesarias para evocar el comportamiento neuronal selectivo con la misma intensidad que lo hace el**

canto propio, pero no son determinantes, ya que en ausencia de las frecuencias fundamentales la respuesta neuronal en HVC sigue siendo muy alta.

Al explorar más frecuencias de corte, observamos que **es necesario conservar todas las frecuencias menores a 5.5 kHz para lograr suscitar una respuesta neuronal selectiva equivalente a la generada por el canto completo.** Si nos limitamos a esta banda específica, conseguimos recuperar el 100% de la actividad neuronal provocada por el canto original. Este resultado motivó dos observaciones. Por un lado, el rango es más estrecho que el campo auditivo en estas aves (20 Hz – 20 kHz), y por otro, **esta banda de frecuencias coincide en gran medida con la frecuencia de resonancia de la cavidad orofaríngea-esofágica, ubicada entre los 2.8 kHz y 5.5 kHz** (Riede et al., 2013). La resonancia del órgano está relacionada con el volumen de la cavidad, quedando así restringida por la morfología y la biomecánica del aparato fonador. **De esta manera, nuestros resultados sugieren que HVC codifica las bandas de frecuencias que son enfatizadas por su anatomía y que el resto de las frecuencias tienen menor relevancia para la codificación neuronal.** Esto nos motiva a especular que los límites biomecánicos de la producción vocal pudieron haber modelado esta preferencia del circuito neuronal por algunas bandas de frecuencia.

Para enriquecer nuestra investigación, decidimos examinar cómo se comportaba el potencial local de campo también conocido por sus siglas en inglés como LFP, una variable electrofisiológica sub estudiada en aves canoras. Los dos trabajos más destacados (Brown et al., 2021; Markowitz et al., 2015) informan que, durante la producción del canto, hay un aumento en la intensidad de dos bandas particulares, por un lado la banda de 30 Hz y por otro la banda gamma-alta (80 – 200 Hz). Por estudios hechos en otros modelos animales, esta última está asociada con la ejecución de actividades motoras (Pfurtscheller et al., 2003). Como parte de mi proyecto de doctorado, nos propusimos determinar qué bandas del LFP mostraban un aumento en su actividad durante la presentación del canto propio cuando el animal se encontraba dormido. Debido a que no encontramos en la literatura trabajos previos que estudien el potencial local de campo en HVC dentro de un paradigma de *feedback* auditivo, decidimos examinar todas las bandas más comúnmente estudiadas en otros modelos animales. Estas son conocidas por sus nombres propios como: delta, theta, alfa, beta, gamma y gamma-alta. Además incluimos en nuestro análisis a la banda de 30 Hz que, aunque no forma parte de las bandas de LFP tradicionales, fue estudiada en diamantes mandarines macho cantando (Markowitz et al., 2015).

En los resultados comentados en el Capítulo 3.3.2 “Respuesta del potencial de campo local” mostramos cómo variaba la intensidad del potencial local de campo durante la presentación de estímulos auditivos. Descubrimos que **las bandas más estudiadas en la literatura no mostraban cambios en su actividad ante la presentación de los estímulos BOS, CON o REV. La única excepción ocurrió para la banda de 30 Hz que mostró un aumento en su intensidad durante la presentación del BOS.** Estos resultados difieren de lo observado en animales cantando, donde las investigaciones previas indicaban que, tanto en la banda de 30 Hz como la gamma-alta, había un aumento de la intensidad de la señal durante la ejecución del canto.

Luego de la primera caracterización, examinamos la respuesta a los estímulos filtrados en la banda de 30 Hz. La intensidad de la señal se comportó de manera similar a la respuesta neuronal. Con esto lo que queremos decir es que, **si usamos un filtro pasa-altos, la respuesta disminuye a medida que se aumenta la frecuencia de corte. Al contrario, y como ocurre con la integral de disparos normalizada, al utilizar un filtro pasa-bajos la respuesta del LFP aumenta al usar frecuencias de cortes con valores crecientes.** Al hacer un análisis con mayor detenimiento, observamos que **si eliminamos únicamente las frecuencias menores a 1.5 kHz, principalmente las fundamentales, la respuesta de la banda de 30 Hz no mostró diferencias significativas en comparación con la generada por el canto completo.** Aquí hallamos una primera discrepancia con lo informado para la respuesta neuronal, donde la eliminación de las fundamentales resultó en una disminución significativa de la integral de disparos neuronales. La segunda discrepancia surge al eliminar las frecuencias por encima de 3.5 kHz, donde la intensidad de la señal del LFP fue estadísticamente igual a la del BOS. Recordemos que para recuperar el 100% de la integral de disparos normalizada generada por el canto propio, era necesario emplear una frecuencia de corte mayor o igual a 5.5 kHz.

La respuesta del LFP frente al estímulo REV no fue la que hipotetizábamos inicialmente. Esperábamos que la fuerza de la señal en respuesta al estímulo REV fuera siempre la menor, siendo este resultado coherente con lo hallado para la integral de disparos normalizada. Como esto no fue así, la interpretabilidad del resto de los resultados del LFP se ven condicionados. No logramos encontrar una explicación para el interrogante sobre qué información particular es la que estaría codificando el potencial local de campo en HVC.

Motivados por desarrollar protocolos experimentales de mayor complejidad que complementen los resultados descritos en el Capítulo 3 “Respuesta neuronal a cantos con filtros acústicos”, decidimos tomar el modelo de producción vocal desarrollado previamente en el laboratorio y modificarlo para generar estímulos sintéticos con variaciones en distintos parámetros fisiológicos. El modelo concebido anteriormente en el Laboratorio de Sistemas Dinámicos por Mindlin y colaboradores se fundamenta sólidamente en los principios biomecánicos de la fonación. Esta característica es altamente beneficiosa, ya que nos permite ajustar variables que se correlacionan con la fisiología de las vocalizaciones que terminan impactando en el canto sintetizado. Como parte de esta investigación doctoral, introdujimos un parámetro de escala λ al modelo, lo que permitió ajustar el tamaño del ave. Implementamos esta modificación cuidadosamente de manera que fuera posible alterar independiente el tamaño de la cabeza y del cuello. La motivación de este último requisito radicaba en que buscábamos poder generar dos tipos diferentes de estímulos. Por un lado, aquellos que al modificar su tamaño respetaran las leyes de escala, es decir con $\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}}$, y por otro, queríamos poder generar estímulos que no siguieran estas leyes y que tuvieran combinaciones de tamaños de cuello y cabeza imposibles de encontrar en la naturaleza ($\lambda_{\text{cuello}} \neq \lambda_{\text{cabeza}}$).

Gracias a estos desarrollos comentados detalladamente en el Capítulo 4 “Modelado de cantos variando parámetros biomecánicos”, **contamos con una herramienta que nos brinda la capacidad de ajustar parámetros fisiológicos, los cuales inciden directamente en la síntesis del canto.** De esta manera, pudimos hacernos preguntas novedosas como ¿puede el núcleo HVC estar codificando información biomecánica compleja que incluya una representación de las leyes de escala? Otra pregunta más específica que deriva directamente de esta última es ¿la respuesta selectiva de HVC por el canto propio depende si el modelo que generó el canto respeta o no las leyes de escala? Para iniciar la búsqueda de una respuesta a estos interrogantes, llevamos adelante un diseño experimental donde variamos el largo de la tráquea y el volumen de la cavidad orofaríngea-esofágica (o tamaño de la cabeza) de forma independiente. De esta manera, creamos una serie de estímulos donde algunos cantos sintéticos cumplían con las leyes de escala ($\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}}$) y otros no ($\lambda_{\text{cuello}} \neq \lambda_{\text{cabeza}}$). Los resultados preliminares indicaron que, cuando los cantos respetan las leyes de escala, no parecería haber diferencias significativas con el canto sintético ideal ($\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}} = 1.0$). Sin embargo, si los parámetros difieren para ambas componentes del tracto vocal (violando las leyes de escala), la respuesta neuronal tiende a disminuir. Aunque los resultados son

parciales como consecuencia de un número de muestras bajo, vale la pena observar detenidamente la respuesta neuronal generada por el canto sintético "ave grande" ($\lambda_{cuello} = \lambda_{cabeza} = 1.4$) donde, al cambiar dos parámetros, se produce una respuesta neuronal equivalente a la del canto sintético ideal. En cambio, si al canto sintético ideal le modificamos solamente el parámetro $\lambda_{cuello} = 1.4$, la respuesta neuronal tiende a decaer (Figura 24). Los resultados sugieren que los cambios dentro de los rangos biológicos no impactan en la respuesta de HVC. Aunque el resultado es preliminar, la diferencia en la respuesta neuronal al modificar un solo parámetro en comparación con modificar dos (pero respetando las leyes de escala) resulta llamativa. **Estos hallazgos sugieren que el núcleo HVC podría estar codificando información biomecánica compleja acerca de su propio canto, y que las leyes de escala podrían estar representadas en este núcleo sensoriomotor.**

A lo largo de mi trayecto de formación doctoral, logré avanzar en el entendimiento sobre algunos aspectos de la codificación neuronal de la biomecánica de comportamientos complejos, centrándome específicamente en la representación del canto propio en el núcleo HVC de diamantes mandarines. Desde la exploración de las frecuencias relevantes para HVC hasta la inmersión en el interrogante del potencial local de campo, cada descubrimiento logró ampliar nuestra comprensión y a su vez abrió las puertas a nuevas preguntas. Además, mediante el uso de herramientas de modelado, pudimos preguntarnos si HVC codifica información biomecánica compleja, incluyendo la representación de leyes de escala. Interesantemente, los resultados parciales sugieren que HVC, codifica la coherencia entre diferentes parámetros fisiológicos. Estos datos preliminares abren nuevos senderos hacia la comprensión de cómo los sistemas neuronales integran y responden a la complejidad biomecánica, delineando un territorio fascinante para futuras investigaciones en neurociencia.

7 APÉNDICE

7.1 GRABACIÓN DEL CANTO Y DETERMINACIÓN DEL BOS

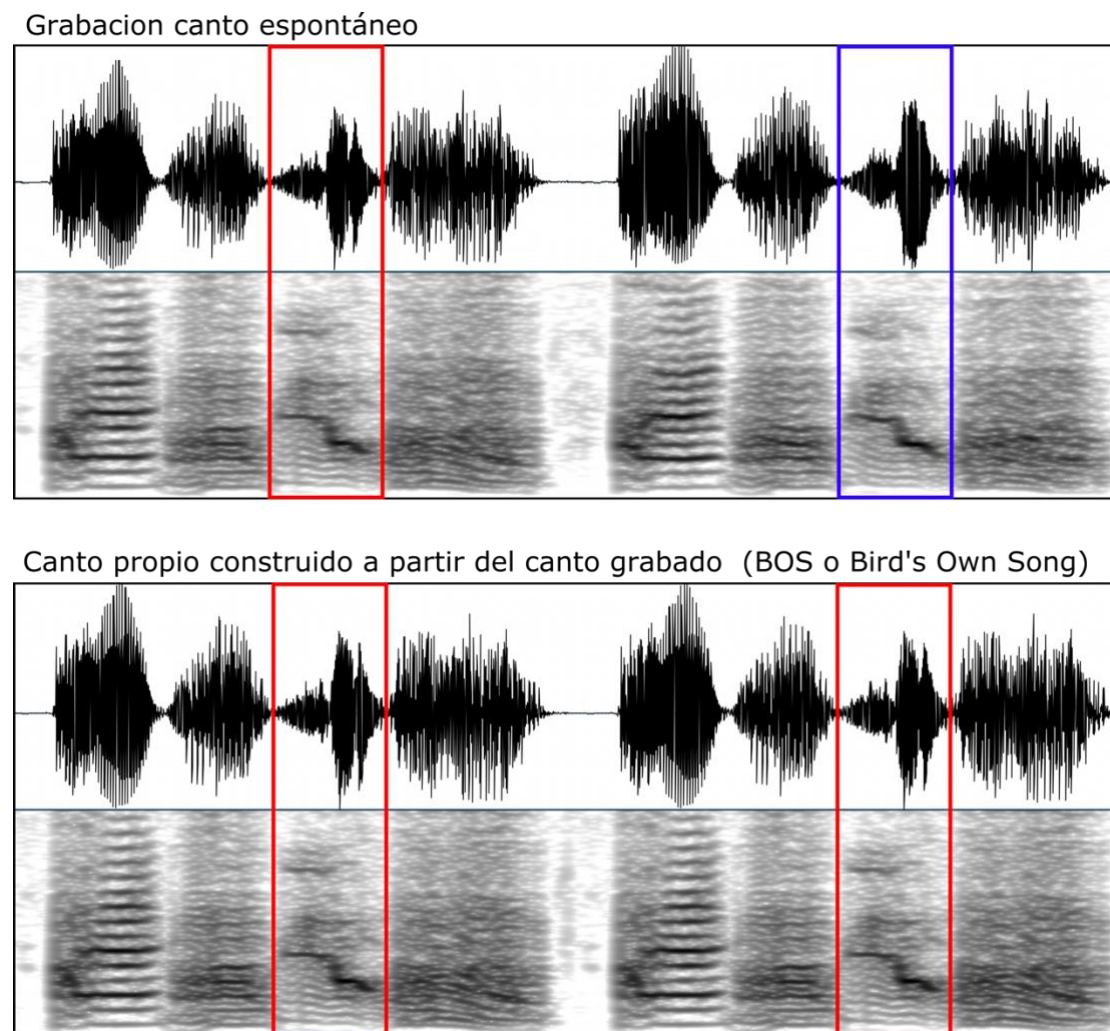


Figura 26. (arriba) Grabación de canto espontáneo de un diamante mandarín macho adulto. Los recuadros indican una misma sílaba repetida dos veces en el canto. Al ser un canto espontáneo, existen pequeñas diferencias entre las repeticiones de una misma sílaba durante la ejecución de un canto. (abajo) Canto propio (BOS) construido a partir del canto espontáneo. Para reducir la variabilidad del estímulo, recreamos el canto espontáneo “copiando y pegando” las sílabas repetidas dentro del canto. (arriba y abajo) En rojo mostramos sílabas que son copias entre si y en azul una sílaba que tiene la misma identidad que las rojas, pero presenta cambios sutiles consecuencia de la variación inevitable que ocurre durante la producción vocal.

Una vez que se construyó el BOS, se finaliza el procesamiento filtrándolo con la herramienta Praat (Boersma & Weenink, 2023) utilizando los siguientes parámetros:

Scale intensity: 70dB

Pass Hann band: 100 - 20000 Hz

Smoothing: 100

7.2 MODELADO DE CANTOS VARIANDO PARÁMETROS BIOMECÁNICOS

Los parámetros para la construcción de los cantos sintéticos se ajustan de manera empírica a partir de valores de parámetros históricos, encontrados y validados por investigaciones previas (Amador et al., 2013).

En el Capítulo 4.3.2 enumeramos un paso a paso para el ajuste de los parámetros C_h, R_h, R_b y L_b . Abajo, transcribo el algoritmo de búsqueda:

1. Genero un canto sintético utilizando valores históricos previamente utilizados en el laboratorio. El buen desempeño de estos parámetros fue validado de manera experimental en trabajos previos (Amador et al., 2013; Perl et al., 2011).
2. Comparo los espectrogramas (Figura 17) y composición espectral (Figura 18) del canto sintético con el del canto real y busco diferencias en la intensidad de las frecuencias.
3. ***Modifico de a uno los parámetros.***
4. Repito el paso 2 y 3 hasta que no encuentro mejoras respecto de la última iteración.

Para que la estrategia de búsqueda sea reproducible debemos desarrollar con mayor detalle el paso 3. Una vez identificadas las diferencias en la composición espectral a partir de la observación de los espectrogramas y las figuras de composición espectral (paso 2), pensamos qué cambios en los parámetros pueden reducir esas diferencias. Para ello evaluamos el comportamiento de uno de los principales filtros del tracto vocal, la OEC. La misma está modelada como un resonador de Helmholtz, del cual se conoce el comportamiento de su resonancia en función de la geometría de la cavidad. La estrategia con la que se modeló, hace que se tenga control de la relación entre sus parámetros y la resonancia. En este caso, la frecuencia de resonancia (ω) de la OEC (modelada como un circuito RLC) queda definida como:

$$\omega = \frac{1}{2\pi\sqrt{L_g C_h}}$$

Donde R_h y R_b determinan la “intensidad” de la resonancia. A mayores valores de R , el efecto de resonancia de la OEC es menor y por lo tanto menos notorio.

Como comentamos en el Capítulo 1.3, el canto de los diamantes mandarines se caracteriza por tener una franja de armónicos con mayor fuerza entre los 2.5 kHz a 7.5 kHz. En el

animal, los límites precisos de esa franja son determinados por el volumen de la OEC. En nuestro modelo, los límites de los armónicos enaltecidos dependen L_g y C_h ; y la fuerza con la que esa franja se enriquece depende de los parámetros R_h y R_b . Entonces, si observamos que la franja enriquecida en armónicos de nuestro canto sintético es distinta a la del BOS, modificamos L_g y C_h . En cambio si la franja enriquecida en armónicos es la misma que la del canto real pero difieren en la intensidad, modificamos R_h y R_b .

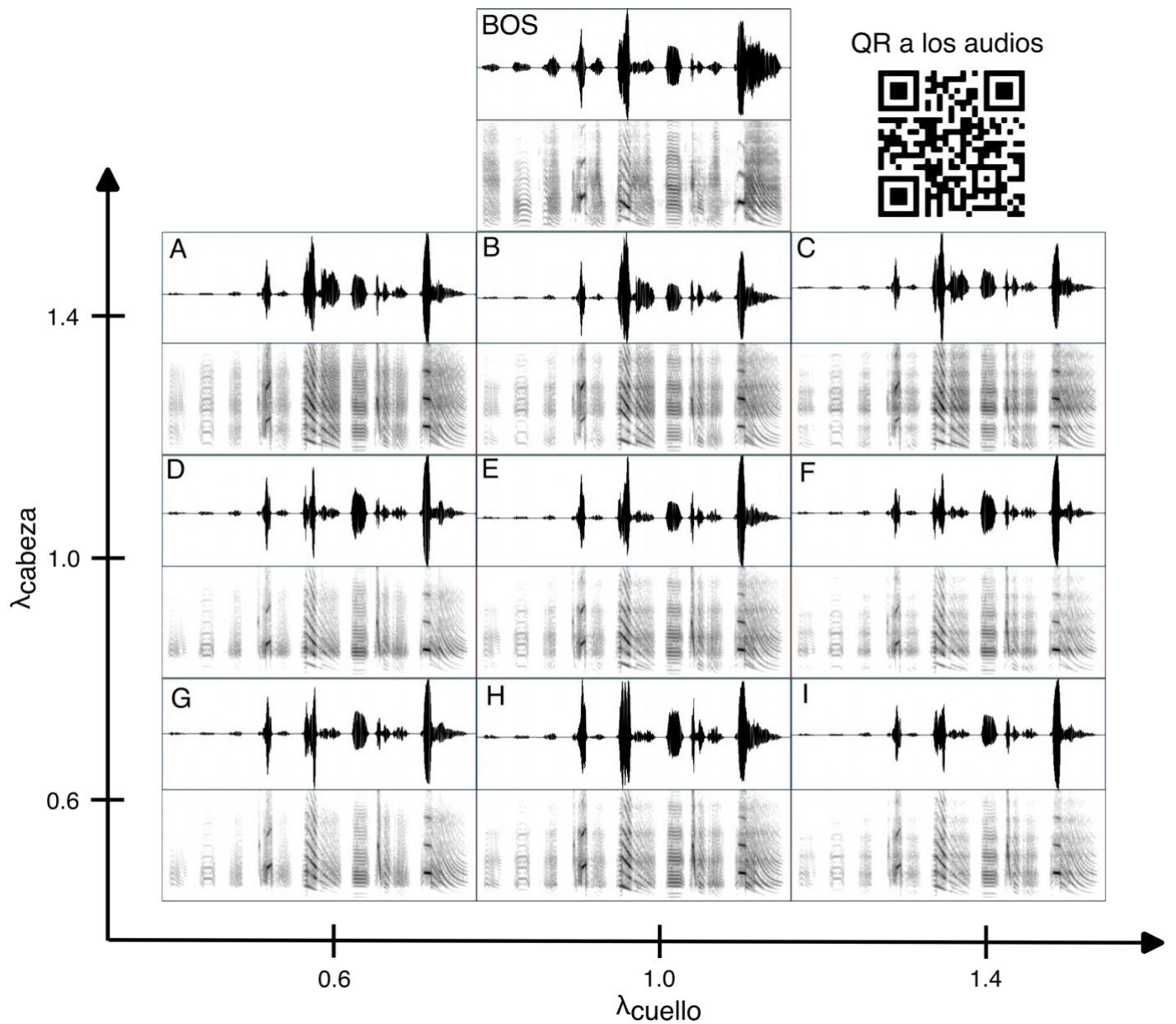


Figura 27. Grilla con todos los estímulos sintéticos del canto de un ave modificando los parámetros de escala. En la imagen se muestra incrustado un QR que direcciona a los audios que se muestran en la figura. Para mayor comodidad también dejo disponible un enlace que direcciona al mismo sitio:

https://drive.google.com/drive/folders/1XxeE4ZcIXDdsyBEqTXDXruMbCZTbzHm6?usp=share_link

7.3 MAPA DE LAS EXPLORACIONES HECHAS EN HVC

[illegible]

Figura 28. Mapa de las exploraciones hecha en el hemisferio izquierdo un ave. El cuadrado negro indica el punto de referencia estereotáxico “Y”. Las celdas en verde indican los lugares de registro donde hubo señal neuronal selectiva al canto propio (típica del núcleo HVC), las celdas rojas indican los sitios de registro donde no se observó señal neuronal selectiva al canto propio (muy posiblemente fuera de HVC), las celdas amarillas (no se muestra ninguna en esta figura pero si en las figuras de abajo) indican los sitios de registro donde dudaba si la actividad neuronal era selectiva al canto al punto que requería analizar los datos en detalle y finalmente las celdas grises (no se muestran en esta figura pero si en las de abajo) indican el comienzo del borde del cemento dental. Dentro de cada celda se indica la fecha de registro de cada exploración. Arriba a la izquierda en amarillo se muestra el código de identificación del sujeto experimental.

7.3.1 Mapas de exploraciones de todos los animales

[illegible][illegible]

zf-JL029-RoN		HEMISFERIO IZQUIERDO															
		0.0	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8	1.9	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7	2.8
CAUDAL	0.7																
	0.6						23/7/21		21/7/21		30/7/21						
	0.5																
	0.4						19/7/21		21/7/21		14/7/21		30/7/21				
	0.3																
	0.2		30/7/21		26/7/21		19/7/21		16/7/21		14/7/21		5/7/21		28/7/21		
	0.1																
ROSTRAL	0.0		30/7/21		23/7/21		19/7/21		16/7/21		7/7/21		5/7/21		26/7/21		28/7/21
	0.1																
	0.2		30/7/21		28/7/21		23/7/21		19/7/21		16/7/21		7/7/21		26/7/21		
	0.3																
	0.4				30/7/21		23/7/21		30/7/21		16/7/21		7/7/21		28/7/21		
	0.5																
	0.6														28/7/21		
	0.7																
	0.8														28/7/21		

zf-JL032-ViA		HEMISFERIO IZQUIERDO										
		0.0	1.5	1.6	1.7	1.8	1.9	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4
CAUDAL	0.7											
	0.6											
	0.5											
	0.4									23/8/21		
	0.3											
	0.2			1/9/21		1/9/21		25/8/21		20/8/21		13/8/21
	0.1											
	0.0		1/9/21		30/8/21		23/8/21		18/8/21		11/8/21	
ROSTRAL	0.1											
	0.2			1/9/20		30/8/21		25/8/21		18/8/21		13/8/21
	0.3											
	0.4					30/8/21		25/8/21		20/8/21		
	0.5											
	0.6									20/8/21		

zf-JL030-VioleBla			HEMISFERIO IZQUIERDO							
		0.0	1.9	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6
CAUDAL	0.7									
	0.6									
	0.5									
	0.4					4/10/21				
	0.3									
	0.2					4/10/21		4/10/21	1/10/21	
	0.1									
	0.0				1/1/21	29/9/21		29/9/21		
ROSTRAL	0.1									
	0.2			4/10/21		4/10/21		1/10/21		
	0.3									
	0.4									

zf-JL040-AmaNe		HEMISFERIO DERECHO													
		3.1	3.0	2.9	2.8	2.7	2.6	2.5	2.4	2.3	2.2	2.1	2.0	1.9	0.0
CAUDAL	0.5														
	0.4														
	0.3														
	0.2						16/12/22		16/12/22						
	0.1														
ROSTRAL	0.0				16/12/22		8/12/22		8/12/22		14/12/22				
	0.1														
	0.2				14/12/22		14/12/22		14/12/22		22/12/22				
	0.3														
	0.4				20/12/23		20/12/22		16/12/22		22/12/22				
	0.5														
	0.6				26/12/22		26/12/22		23/12/22		22/12/22				
	0.7														
	0.8						26/12/22								

zf-JL040-AmaNe		HEMISFERIO IZQUIERDO										
		0.0	1.8	1.9	2.0	2.1	2.2	2.25	2.3	2.4	2.5	2.6
CAUDAL	0.5											
	0.4						6/12/22			6/12/22		
	0.3											
	0.2		1/12/22		28/11/22		28/11/22			28/11/22		6/12/22
	0.1											
ROSTRAL	0.0		25/11/22		25/11/22					22/11/22		22/11/22
	0.1											
	0.2		1/12/22		25/11/22		24/11/22			24/11/22		1/12/22
	0.3											
	0.4						25/11/22					
	0.5											
	0.6											
	0.7											
	0.8											

zf-JL044-AmA		HEMISFERIO DERECHO													
		3.1	3.0	2.9	2.8	2.7	2.6	2.5	2.4	2.3	2.2	2.1	2.0	1.9	0.0
CAUDAL	0.4														
	0.3														
	0.2														
	0.1														
	0.0														
ROSTRAL	0.1														
	0.2				17/2/23										
	0.3														
	0.4	22/2/23		17/2/23		22/2/23		22/2/23							
	0.5														
	0.6														
	0.7												13/2/23		
	0.8	22/2/23		17/2/23		22/2/23		17/2/23							
	0.9										13/2/23		16/2/23		
	1.0														
	1.1								16/2/23		13/2/23		16/2/23		
	1.2						22/2/23								
	1.3														

zf-JL044-AmA		HEMISFERIO IZQUIERDO											
		0.0	1.7	1.8	1.9	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7
CAUDAL	0.4												
	0.3												
	0.2									1/2/23		3/2/23	
	0.1												
	0.0						1/2/23			01-02-23 x2		1/2/23	
ROSTRAL	0.1												
	0.2			1/2/23			1/2/23					3/2/23	
	0.3									1/2/23			
	0.4					10/2/23							
	0.5							3/2/23		3/2/23			
	0.6					10/2/23							
	0.7							3/2/23		6/2/23			
	0.8			10/2/23		8/2/23							
	0.9							3/2/23		6/2/23			
	1.0			10/2/23		8/2/23						10/2/23	
	1.1							6/2/23		6/2/23			
	1.2			10/2/23		10/2/23		8/2/23					
	1.3									6/2/23			
	1.4							8/2/23					

zf-JL041-NeBla		HEMISFERIO DERECHO															
		3.2	3.1	3.0	2.9	2.8	2.7	2.6	2.5	2.4	2.3	2.2	2.1	2.0	1.9	0.0	
CAUDAL	0.3																
	0.2																
	0.1																
	0.0																
ROSTRAL	0.1																
	0.2	03/04/2023		03/04/2023	31/03/2023		31/03/2023		29/03/2023								
	0.3			11/04/2023				11/04/2023									
	0.4	03/04/2023		03/04/2023	29/03/2023	07/04/2023	29/03/2023	05/04/2023	29/03/2023	07/04/2023		05/03/2023					
	0.5			11/04/2023				11/04/2023									
	0.6				31/03/2023	11/04/2023	29/03/2023	05/04/2023	31/03/2023								
	0.7																
	0.8	11/04/2023					07/04/2023	31/03/2023			07/04/2023						

zf-JL041-NeBla		HEMISFERIO IZQUIERDO										
		0.0	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7	2.8	2.9	3.0
CAUDAL	0.3											
	0.2											
	0.1											
	0.0					27/03/2023		23/03/2023		27/03/2023		
ROSTRAL	0.1											
	0.2					10/03/2023		23/03/2023		22/03/2023		
	0.3											
	0.4			13/03/2023		10/03/2023		15/03/2023		20/03/2023		22/03/2023
	0.5											
	0.6			13/03/2023		10/03/2023		17/03/2023		20/03/2002		
	0.7											
	0.8			13/03/2023		27/03/2023		20/03/2023		22/03/2022		
	0.9											
	1.0									22/03/2023		

8 REFERENCIAS

- Amador, A., & Margoliash, D. (2011). Auditory Memories and Feedback Processing for Vocal Learning. In *The Auditory Cortex* (pp. 561–575). Springer US.
https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0074-6_26
- Amador, A., & Mindlin, G. B. (2008). Beyond harmonic sounds in a simple model for birdsong production. *Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science*, 043123(2008). <https://doi.org/10.1063/1.3041023>
- Amador, A., & Mindlin, G. B. (2021). Synthetic Birdsongs as a Tool to Induce, and Listen to, Replay Activity in Sleeping Birds. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 15). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.647978>
- Amador, A., & Mindlin, G. B. (2023). The science of birdsong and the spectrogram, the technique that changed it all. *Molecular Psychology: Brain, Behavior, and Society*, 2, 9. <https://doi.org/10.12688/molpsychol.17520.1>
- Amador, A., Perl, Y. S., Mindlin, G. B., & Margoliash, D. (2013). Elemental gesture dynamics are encoded by song premotor cortical neurons. *Nature*, 495(7439), 59–64. <https://doi.org/10.1038/nature11967>
- Arneodo, E. M., Perl, Y. S., & Mindlin, G. B. (2011). Acoustic signatures of sound source-tract coupling. *Physical Review E*, 83(4), 041920. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.83.041920>
- Assaneo, M. F., Ripollés, P., Orpella, J., Lin, W. M., de Diego-Balaguer, R., & Poeppel, D. (2019). Spontaneous synchronization to speech reveals neural mechanisms facilitating language learning. *Nature Neuroscience*, 22(4), 627–632. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0353-z>
- Bateson, P., & Laland, K. N. (2013). Tinbergen’s four questions: An appreciation and an update. In *Trends in Ecology and Evolution* (Vol. 28, Issue 12, pp. 712–718). <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.09.013>
- Berens, P. (2008). Feature selectivity of the gamma-band of the local field potential in primate primary visual cortex. *Frontiers in Neuroscience*, 2(2), 199–207. <https://doi.org/10.3389/neuro.01.037.2008>
- Boari, S. (2019). *Biomecánica y circuitos neuronales de control motor en el canto de aves oscinas* [Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales]. https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6653_Boari
- Boari, S., Mindlin, G. B., & Amador, A. (2022). Neural oscillations are locked to birdsong rhythms in canaries. *European Journal of Neuroscience*, 55(2), 549–565. <https://doi.org/10.1111/ejn.15552>
- Boari, S., Uribarri, G., Amador, A., & Mindlin, G. (2019). Observable for a Large System of Globally Coupled Excitable Units. *Mathematical and Computational Applications*, 24(2), 37. <https://doi.org/10.3390/mca24020037>

- Boersma, P., & Weenink, D. (2023). *Praat: doing phonetics by computer* (6.3.10). <http://www.praat.org/>
- Böhner, J. (1983). Song learning in the zebra finch (*taeniopygia guttata*): Selectivity in the choice of a tutor and accuracy of song copies. *Animal Behaviour*, *31*(1), 231–237. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(83\)80193-6](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(83)80193-6)
- Bottjer, S. W., Miesner, E. A., & Arnold, A. P. (1984). Forebrain Lesions Disrupt Development But Not Maintenance of Song in Passerine Birds. *Science*, *224*(4651), 901–903. <https://doi.org/10.1126/science.6719123>
- Brainard, M. S., & Doupe, A. J. (2013). Translating Birdsong: Songbirds as a Model for Basic and Applied Medical Research. *Annual Review of Neuroscience*, *36*(1), 489–517. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-152826>
- Brenowitz, E. A., Margoliash, D., & Nordeen, K. W. (1997). An introduction to birdsong and the avian song system. *Journal of Neurobiology*, *33*(5), 495–500. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9369455>
- Brown, D. E., Chavez, J. I., Nguyen, D. H., Kadwory, A., Voytek, B., Arneodo, E. M., Gentner, T. Q., & Gilja, V. (2021). Local field potentials in a pre-motor region predict learned vocal sequences. *PLoS Computational Biology*, *17*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008100>
- Bush, A., Döppler, J. F., Goller, F., & Mindlin, G. B. (2018). Syringeal EMGs and synthetic stimuli reveal a switch-like activation of the songbird’s vocal motor program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(33), 8436–8441. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801251115>
- Buzsáki, G., & Kandel, A. (1998). Somadendritic Backpropagation of Action Potentials in Cortical Pyramidal Cells of the Awake Rat. *Journal of Neurophysiology*, *79*(3), 1587–1591. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.79.3.1587>
- Chew, S. J., Vicario, D. S., & Nottebohm, F. (1996). A large-capacity memory system that recognizes the calls and songs of individual birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(5), 1950–1955. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.5.1950>
- Chiel, H. J., & Beer, R. D. (1997). The brain has a body: Adaptive behavior emerges from interactions of nervous system, body and environment. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 20, Issue 12, pp. 553–557). [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(97\)01149-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01149-1)
- Dooling, R. J. (1992a). Hearing in Birds. In *The Evolutionary Biology of Hearing* (pp. 545–559). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2784-7_33
- Dooling, R. J. (1992b). Perception of Speech Sounds by Birds. In *Auditory Physiology and Perception* (pp. 407–413). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-041847-6.50052-6>
- Dooling, R. J., Brown, S. D., Klump, G. M., & Okanoya, K. (1992). Auditory Perception of Conspecific and Heterospecific Vocalizations in Birds: Evidence for Special Processes. In *Journal of Comparative Psychology* (Vol. 106, Issue 1).
- Döppler, J. F., Bush, A., Goller, F., & Mindlin, G. B. (2018). From electromyographic activity to frequency modulation in zebra finch song. *Journal of Comparative*

- Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 204(2), 209–217. <https://doi.org/10.1007/s00359-017-1231-3>
- Doupe, A. J., & Konishi, M. (1991). Song-selective auditory circuits in the vocal control system of the zebra finch. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(24), 11339–11343. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.24.11339>
- Doupe, A. J., & Kuhl, P. K. (1999). BIRDSONG AND HUMAN SPEECH: Common Themes and Mechanisms. *Annual Review of Neuroscience*, 22(1), 567–631. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.567>
- Dutar, P., Vu, H. M., & Perkel, D. J. (1998). Multiple Cell Types Distinguished by Physiological, Pharmacological, and Anatomic Properties in Nucleus HVc of the Adult Zebra Finch. *Journal of Neurophysiology*, 80(4), 1828–1838. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.80.4.1828>
- Elemans, C. P. H., Rasmussen, J. H., Herbst, C. T., Düring, D. N., Zollinger, S. A., Brumm, H., Srivastava, K., Svane, N., Ding, M., Larsen, O. N., Sober, S. J., & Švec, J. G. (2015). Universal mechanisms of sound production and control in birds and mammals. *Nature Communications*, 6(1), 8978. <https://doi.org/10.1038/ncomms9978>
- Fee, M. S., Shraiman, B., Pesaran, B., & Mitra, P. P. (1998). The role of nonlinear dynamics of the syrinx in the vocalizations of a songbird. *Nature*, 395(6697), 67–71. <https://doi.org/10.1038/25725>
- Fletcher, N. H., Riede, T., & Suthers, R. A. (2006). Model for vocalization by a bird with distensible vocal cavity and open beak. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 119(2), 1005. <https://doi.org/10.1121/1.2159434>
- Fortune, E. S., & Margoliash, D. (1995). Parallel pathways and convergence onto HVc and adjacent neostriatum of adult zebra finches (*Taeniopygia guttata*). *Journal of Comparative Neurology*, 360(3), 413–441. <https://doi.org/10.1002/cne.903600305>
- Foster, E. F., & Bottjer, S. W. (1998). Axonal connections of the High Vocal Center and surrounding cortical regions in juvenile and adult male zebra finches. *The Journal of Comparative Neurology*, 397(1), 118–138. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19980720\)397:1<118::AID-CNE9>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19980720)397:1<118::AID-CNE9>3.0.CO;2-3)
- Fukushima, M., & Margoliash, D. (2015a). The effects of delayed auditory feedback revealed by bone conduction microphone in adult zebra finches. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep08800>
- Fukushima, M., & Margoliash, D. (2015b). The effects of delayed auditory feedback revealed by bone conduction microphone in adult zebra finches. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep08800>
- Fukushima, M., Rauske, P. L., & Margoliash, D. (2015). Temporal and rate code analysis of responses to low-frequency components in the bird's own song by song system neurons. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 201(12), 1103–1114. <https://doi.org/10.1007/s00359-015-1037-0>

- Gardner, T. J., Cecchi, G., Magnasco, M., Laje, R., & Mindlin, G. B. (2001). Simple Motor Gestures for Birdsongs. *Physical Review Letters*, 87(20), 208101. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.87.208101>
- Goller, F., & Daley, M. A. (2001). Novel motor gestures for phonation during inspiration enhance the acoustic complexity of birdsong. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 268(1483), 2301–2305. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1805>
- Goller, F., & Larsen, O. N. (1997). A new mechanism of sound generation in songbirds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(26), 14787–14791. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14787>
- Goller, F., Mallinckrodt, M. J., & Torti, S. D. (2004). Beak gape dynamics during song in the zebra finch. *Journal of Neurobiology*, 59(3), 289–303. <https://doi.org/10.1002/neu.10327>
- Goller, F., & Riede, T. (2013). Integrative physiology of fundamental frequency control in birds. *Journal of Physiology-Paris*, 107(3), 230–242. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2012.11.001>
- Goller, F., & Suthers, R. A. (1996). Role of syringeal muscles in controlling the phonology of bird song. *Journal of Neurophysiology*, 76(1), 287–300. <https://doi.org/10.1152/jn.1996.76.1.287>
- Gray, C. M., Maldonado, P. E., Wilson, M., & McNaughton, B. (1995). Tetrodes markedly improve the reliability and yield of multiple single-unit isolation from multi-unit recordings in cat striate cortex. *Journal of Neuroscience Methods*, 63(1–2), 43–54. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(95\)00085-2](https://doi.org/10.1016/0165-0270(95)00085-2)
- Griffith, S. C., Ton, R., Hurley, L. L., McDiarmid, C. S., & Pacheco-Fuentes, H. (2021). The Ecology of the Zebra Finch Makes It a Great Laboratory Model but an Outlier amongst Passerine Birds. *Birds*, 2(1), 60–76. <https://doi.org/10.3390/birds2010004>
- Hahnloser, R. H. R., Kozhevnikov, A. A., & Fee, M. S. (2002). An ultra-sparse code underlies the generation of neural sequences in a songbird. *Nature*, 419(6902), 65–70. <https://doi.org/10.1038/nature00974>
- Hashino, E., & Okanoya, K. (1989). Auditory sensitivity in the zebra finch. In *J. Acoust. Soc. Jpn. (E)* (Vol. 10).
- Henze, D. A., Borhegyi, Z., Csicsvari, J., Mamiya, A., Harris, K. D., & Buzsáki, G. (2000). Intracellular Features Predicted by Extracellular Recordings in the Hippocampus In Vivo. *Journal of Neurophysiology*, 84(1), 390–400. <https://doi.org/10.1152/jn.2000.84.1.390>
- Hessler, N. A., & Doupe, A. J. (1999). Singing-Related Neural Activity in a Dorsal Forebrain–Basal Ganglia Circuit of Adult Zebra Finches. *The Journal of Neuroscience*, 19(23), 10461–10481. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-23-10461.1999>
- Hienz, R. D., Sachs, M. B., & Sinnott, J. M. (1981). Discrimination of steady-state vowels by blackbirds and pigeons. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 70(3), 699–706. <https://doi.org/10.1121/1.386933>

- Hoese, W. J., Podos, J., Boetticher, N. C., & Nowicki, S. (2000). Vocal Tract Function in Birdsong Production: Experimental Manipulation of Beak Movements. *Journal of Experimental Biology*, 203(12), 1845–1855. <https://doi.org/10.1242/jeb.203.12.1845>
- Humphrey, D. R., & Schmidt, E. M. (1990). Extracellular Single-Unit Recording Methods. In A. A. Boulton & G. B. V. C. H. Baker (Eds.), *Neurophysiological Techniques, II* (Vol. 15, pp. 1–64). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-185-3:1>
- Janik, V. M., & Knörnschild, M. (2021). Vocal production learning in mammals revisited. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 376, Issue 1836). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0244>
- Jarvis, E. D. (2004). Learned Birdsong and the Neurobiology of Human Language. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1016(1), 749–777. <https://doi.org/10.1196/annals.1298.038>
- Jensen, K. K., Cooper, B. G., Larsen, O. N., & Goller, F. (2007). Songbirds use pulse tone register in two voices to generate low-frequency sound. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1626), 2703–2710. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0781>
- Kamondi, A., Acsády, L., Wang, X.-J., & Buzsáki, G. (1998). Theta oscillations in somata and dendrites of hippocampal pyramidal cells in vivo: Activity-dependent phase-precession of action potentials. *Hippocampus*, 8(3), 244–261. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1998\)8:3<244::AID-HIPO7>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:3<244::AID-HIPO7>3.0.CO;2-J)
- Katz, L. C., & Gurney, M. E. (1981). Auditory responses in the zebra finch's motor system for song. *Brain Research*, 221(1), 192–197. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)91073-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)91073-8)
- Kazemi, A., Kesba, M., & Provini, P. (2023). Realistic three-dimensional avian vocal tract model demonstrates how shape affects sound filtering (*Passer domesticus*). *Journal of The Royal Society Interface*, 20(198). <https://doi.org/10.1098/rsif.2022.0728>
- Kirn, J., Alvarez-Buylla, A., & Nottebohm, F. (1991). Production and survival of projection neurons in a forebrain vocal center of adult male canaries. *The Journal of Neuroscience*, 11(6), 1756–1762. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-06-01756.1991>
- Kroodsma, D. E., & Konishi, M. (1991). A suboscine bird (eastern phoebe, Sayornis phoebe) develops normal song without auditory feedback. *Animal Behaviour*, 42(3), 477–487. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(05\)80047-8](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(05)80047-8)
- Laje, R., Gardner, T. J., & Mindlin, G. B. (2002). Neuromuscular control of vocalizations in birdsong: A model. *Physical Review E*, 65(5), 051921. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.65.051921>
- Laje, R., & Mindlin, G. B. (2005). *The physics of birdsong*.

- Larsen, O. N., & Goller, F. (2002). Direct observation of syringeal muscle function in songbirds and a parrot. *Journal of Experimental Biology*, 205(1), 25–35. <https://doi.org/10.1242/jeb.205.1.25>
- Leonardo, A. (2004). Experimental test of the birdsong error-correction model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(48), 16935–16940. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407870101>
- Leonardo, A., & Fee, M. S. (2005). Ensemble Coding of Vocal Control in Birdsong. *The Journal of Neuroscience*, 25(3), 652–661. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3036-04.2005>
- Loning, H., Verkade, L., Griffith, S. C., & Naguib, M. (2023). The social role of song in wild zebra finches. *Current Biology*, 33(2), 372-380.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.11.047>
- Luo, M., Ding, L., & Perkel, D. J. (2001). An Avian Basal Ganglia Pathway Essential for Vocal Learning Forms a Closed Topographic Loop. *The Journal of Neuroscience*, 21(17), 6836–6845. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-17-06836.2001>
- Margoliash, D. (1983). Acoustic parameters underlying the responses of song-specific neurons in the white-crowned sparrow. *The Journal of Neuroscience*, 3(5), 1039–1057. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2027-06.2006>
- Margoliash, D. (1986). Preference for autogenous song by auditory neurons in a song system nucleus of the white-crowned sparrow. *The Journal of Neuroscience*, 6(6), 1643–1661. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.06-06-01643.1986>
- Markowitz, J. E., Liberti, W. A., Guitchounts, G., Velho, T., Lois, C., & Gardner, T. J. (2015). Mesoscopic patterns of neural activity support songbird cortical sequences. *PLoS Biology*, 13(6), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002158>
- McCasland, J. S. (1987). Neuronal control of bird song production. *The Journal of Neuroscience*, 7(1), 23–39. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.07-01-00023.1987>
- McCasland, J. S., & Konishi, M. (1981). Interaction between auditory and motor activities in an avian song control nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(12), 7815–7819. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7815>
- Mello, C. V., Vicario, D. S., & Clayton, D. F. (1992). Song presentation induces gene expression in the songbird forebrain (immediate-early gene/natural stimulus/auditory/avian neostriatum/spedes recognition). In *Neurobiology* (Vol. 89). <https://www.pnas.org>
- Mike X Cohen. (2014). *Analyzing Neural Time Series Data - Theory and Practice*. The MIT Press.
- Mindlin, G. B. (2018). *Dinámica No Lineal*. Editorial UNQ.
- Mindlin, G. B., Gardner, T. J., Goller, F., & Suthers, R. (2003). Experimental support for a model of birdsong production. *Physical Review E*, 68(4), 041908. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.68.041908>

- Mitzdorf, U. (1985). Current source-density method and application in cat cerebral cortex: investigation of evoked potentials and EEG phenomena. *Physiological Reviews*, 65(1), 37–100. <https://doi.org/10.1152/physrev.1985.65.1.37>
- Mitzdorf, U. (1987). Properties of the Evoked Potential Generators: Current Source-Density Analysis of Visually Evoked Potentials in the Cat Cortex. *International Journal of Neuroscience*, 33(1–2), 33–59. <https://doi.org/10.3109/00207458708985928>
- Mooney, R. (2000). Different Subthreshold Mechanisms Underlie Song Selectivity in Identified HVC Neurons of the Zebra Finch. *The Journal of Neuroscience*, 20(14), 5420–5436. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-14-05420.2000>
- Mooney, R. (2009). Neural mechanisms for learned birdsong. *Learning & Memory*, 16(11), 655–669. <https://doi.org/10.1101/lm.1065209>
- MORTON, S. R., & DAVIES, P. H. (2006). Food of the zebra finch (*Poephila guttata*), and an examination of granivory in birds of the Australian arid zone. *Australian Journal of Ecology*, 8(3), 235–243. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1983.tb01321.x>
- Nixdorf-Bergweiler, B. E., Lips, M. B., & Heinemann, U. (1995). Electrophysiological and morphological evidence for a new projection of LMAN-neurons towards area X. *NeuroReport*, 6(13), 1729–1732. <https://doi.org/10.1097/00001756-199509000-00006>
- Nottebohm, F., & Arnold, A. P. (1976). Sexual Dimorphism in Vocal Control Areas of the Songbird Brain. *Science*, 194(4261), 211–213. <https://doi.org/10.1126/science.959852>
- Nottebohm, F., Paton, J. A., & Kelley, D. B. (1982). Connections of vocal control nuclei in the canary telencephalon. *Journal of Comparative Neurology*, 207(4), 344–357. <https://doi.org/10.1002/cne.902070406>
- Nottebohm, F., Stokes, T. M., & Leonard, C. M. (1976). Central control of song in the canary, *Serinus canarius*. *The Journal of Comparative Neurology*, 165(4), 457–486. <https://doi.org/10.1002/cne.901650405>
- Nowicki, S. (1987). Vocal tract resonances in oscine bird sound production: evidence from birdsongs in a helium atmosphere. *Nature*, 325(6099), 53–55. <https://doi.org/10.1038/325053a0>
- Ohms, V. R., Snelderwaard, P. Ch., ten Cate, C., & Beckers, G. J. L. (2010). Vocal Tract Articulation in Zebra Finches. *PLoS ONE*, 5(7), e11923. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011923>
- Okanoya, K., & Dooling, R. J. (1987). Hearing in Passerine and Psittacine Birds: A Comparative Study of Absolute and Masked Auditory Thresholds. In *Journal of Comparative Psychology* (Vol. 101, Issue 1).
- Okuhata, S., & Saito, N. (1987). Synaptic connections of thalamo-cerebral vocal nuclei of the canary. *Brain Research Bulletin*, 18(1), 35–44. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(87\)90031-1](https://doi.org/10.1016/0361-9230(87)90031-1)

- Ölveczky, B. P., Andalman, A. S., & Fee, M. S. (2005). Vocal Experimentation in the Juvenile Songbird Requires a Basal Ganglia Circuit. *PLoS Biology*, 3(5), e153. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030153>
- Perl, Y. S., Arneodo, E. M., Amador, A., Goller, F., & Mindlin, G. B. (2011). Reconstruction of physiological instructions from Zebra finch song. *Physical Review E*, 84(5), 051909. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.84.051909>
- Perl, Y. S., Arneodo, E. M., Amador, A., & Mindlin, G. B. (2012). Nonlinear dynamics and the synthesis of zebra finch song. *International Journal of Bifurcation and Chaos*, 22(10). <https://doi.org/10.1142/S0218127412502355>
- Pfurtscheller, G., Graimann, B., Huggins, J. E., Levine, S. P., & Schuh, L. A. (2003). Spatiotemporal patterns of beta desynchronization and gamma synchronization in corticographic data during self-paced movement. *Clinical Neurophysiology*, 114(7), 1226–1236. [https://doi.org/10.1016/S1388-2457\(03\)00067-1](https://doi.org/10.1016/S1388-2457(03)00067-1)
- Podos, J., Sherer, J. K., Peters, S., & Nowicki, S. (1995). Ontogeny of vocal tract movements during song production in song sparrows. *Animal Behaviour*, 50(5), 1287–1296. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(95\)80044-1](https://doi.org/10.1016/0003-3472(95)80044-1)
- Poeppel, D., & Assaneo, M. F. (2020). Speech rhythms and their neural foundations. *Nature Reviews Neuroscience*, 21(6), 322–334. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-0304-4>
- Prather, J. F., Peters, S., Nowicki, S., & Mooney, R. (2008). Precise auditory-vocal mirroring in neurons for learned vocal communication. *Nature*, 451(7176), 305–310. <https://doi.org/10.1038/nature06492>
- Riede, T., Schilling, N., & Goller, F. (2013). The acoustic effect of vocal tract adjustments in zebra finches. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 199(1), 57–69. <https://doi.org/10.1007/s00359-012-0768-4>
- Riede, T., Suthers, R. A., Fletcher, N. H., & Blevins, W. E. (2006). Songbirds tune their vocal tract to the fundamental frequency of their song. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(14), 5543–5548. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601262103>
- Scharff, C., & Nottebohm, F. (1991). A comparative study of the behavioral deficits following lesions of various parts of the zebra finch song system: implications for vocal learning. *The Journal of Neuroscience*, 11(9), 2896–2913. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-09-02896.1991>
- Searcy, W. A., & Nowicki, S. (2019). Birdsong learning, avian cognition and the evolution of language. In *Animal Behaviour* (Vol. 151, pp. 217–227). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2019.01.015>
- Simpson, H., & Vicario, D. (1990). Brain pathways for learned and unlearned vocalizations differ in zebra finches. *The Journal of Neuroscience*, 10(5), 1541–1556. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-05-01541.1990>
- Sitt, J. D., Amador, A., Goller, F., & Mindlin, G. B. (2008). Dynamical origin of spectrally rich vocalizations in birdsong. *Physical Review E*, 78(1), 011905. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.78.011905>

- Sitt, J. D., Arneodo, E. M., Goller, F., & Mindlin, G. B. (2010). Physiologically driven avian vocal synthesizer. *Physical Review E*, 81(3), 031927. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.81.031927>
- Slater, P. J. B., Eales, L. A., & Clayton, N. S. (1988). Song Learning in Zebra Finches (*Taeniopygia guttata*): Progress and Prospects. In *ADVANCES IN THE STUDY OF BEHAVIOR* (Vol. 18, pp. 1–34). [https://doi.org/10.1016/S0065-3454\(08\)60308-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3454(08)60308-3)
- Sohrabji, F., Nordeen, E. J., & Nordeen, K. W. (1990). Selective impairment of song learning following lesions of a forebrain nucleus in the juvenile zebra finch. *Behavioral and Neural Biology*, 53(1), 51–63. [https://doi.org/10.1016/0163-1047\(90\)90797-A](https://doi.org/10.1016/0163-1047(90)90797-A)
- The song of the zebra finch. (2012). *Lab Animal*, 41(5), 117. <https://doi.org/10.1038/labon0512-117>
- Tinbergen, N. (1963). On aims and methods of Ethology. *Zeitschrift Für Tierpsychologie*, 20(4), 410–433. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1963.tb01161.x>
- Titze, I. R. (1988). The physics of small-amplitude oscillation of the vocal folds. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 83(4), 1536–1552. <https://doi.org/10.1121/1.395910>
- Vellema, M., Verschueren, J., Van Meir, V., & Van der Linden, A. (2011). A customizable 3-dimensional digital atlas of the canary brain in multiple modalities. *NeuroImage*, 57(2), 352–361. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.04.033>
- Vicario, D. S., & Yohay, K. H. (1993). Song-selective auditory input to a forebrain vocal control nucleus in the zebra finch. *Journal of Neurobiology*, 24(4), 488–505. <https://doi.org/10.1002/neu.480240407>
- Volman, S. F. (1996). Quantitative assessment of song-selectivity in the zebra finch ?high vocal center? *Journal of Comparative Physiology A*, 178(6). <https://doi.org/10.1007/BF00225832>
- Westneat, M. W., Long, J. H., Hoese, W., & Nowicki, S. (1993). Kinematics of Birdsong: Functional Correlation of Cranial Movements and Acoustic Features in Sparrows. *Journal of Experimental Biology*, 182(1), 147–171. <https://doi.org/10.1242/jeb.182.1.147>
- Wild, J. (1993). Descending projections of the songbird nucleus robustus archistriatalis. *Journal of Comparative Neurology*, 338(2), 225–241. <https://doi.org/10.1002/cne.903380207>
- Wild, J. (1997a). Functional Anatomy of Neural Pathways Contributing to the Control of Song Production in Birds. *European Journal of Morphology*, 35(4), 303–325. <https://doi.org/10.1076/ejom.35.4.303.13077>
- Wild, J. (1997b). Neural pathways for the control of birdsong production. *Journal of Neurobiology*, 33(5), 653–670. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4695\(19971105\)33:5<653::AID-NEU11>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(19971105)33:5<653::AID-NEU11>3.0.CO;2-A)

- Wild, J. (2004). Functional Neuroanatomy of the Sensorimotor Control of Singing. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1016(1), 438–462. <https://doi.org/10.1196/annals.1298.016>
- Williams, H. (1990). Models for song learning in the zebra finch: fathers or others? *Animal Behaviour*, 39(4), 745–757. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(05\)80386-0](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(05)80386-0)
- Williams, H., & Nottebohm, F. (1985). Auditory Responses in Avian Vocal Motor Neurons: A Motor Theory for Song Perception in Birds. *Science*, 229(4710), 279–282. <https://doi.org/10.1126/science.4012321>
- Yu, A. C., & Margoliash, D. (1996). Temporal Hierarchical Control of Singing in Birds. *Science*, 273(5283), 1871–1875. <https://doi.org/10.1126/science.273.5283.1871>

9 TABLA FIGURAS

Figura 1. Canto de un diamante mandarín. En el panel de arriba se muestra la señal del sonido y en el panel de abajo su espectrograma (ver texto). Las letras A, B, C y D indican sílabas distintas que juntas conforman un motivo. Las barras negras señalan un mismo motivo que se repite cuatro veces durante la ejecución de este canto. Las sílabas anteriores al primer motivo se denominan “notas introductorias” y las que se encuentran entre los motivos “sílabas de transición”.13

Figura 2. Esquema del aparato fonador de las aves oscinas. Los principales elementos que lo conforman son la siringe (fuente generadora del sonido) y el tracto vocal formado por la tráquea, cavidad orofaríngea-esofágica y el pico. Figura modificada de (Amador et al., 2013).....15

Figura 3. Modelo dinámico del aparato fonador. Las primeras dos ecuaciones (naranja) describen a la siringe que es la fuente generadora del sonido, donde x representa la posición de los labios siríngicos, Gamma (γ) es un parámetro de escala estático y los parámetros adimensionales Alfa (α) y Beta (β) son dependientes del tiempo. Estos últimos correlacionan con la presión del aire que llega a la siringe y la tensión de los labios, respectivamente. El resto del sistema (verde) modela la propagación del sonido a lo largo del tracto vocal. (explicación de los términos de las ecuaciones 3,4,5 y 6 en el texto)17

Figura 4. Analogía entre el sistema acústico del tracto vocal y un circuito eléctrico. En este esquema se indican con flechas las equivalencias entre cavidades y elementos eléctricos si se modela al tracto vocal como un circuito. Rb y Lb corresponden a la resistencia e inductancia en el circuito que representa al pico (beak en inglés), Rh y Ch a la resistencia y capacitancia en el circuito que representan la OEC, modelada como un resonador de Helmholtz, Lg a la inductancia en el circuito que representa la glotis, i representa la corriente eléctrica teórica y Ps la diferencia de presión entre el aire que ingresa a la glotis y el que sale del pico.19

Figura 5. Sistema del canto. Esquema de los núcleos neuronales y las conexiones que forman parte de la vía motora (negro), vía del aprendizaje (rosa) y vía auditiva (naranja). Notar que el núcleo HVC (nombre propio) forma parte de la vía motora y del aprendizaje además de recibir conexiones aferentes de la vía auditiva. “AUD” no representa a un núcleo en particular sino a núcleos altamente interconectados dedicados al procesamiento auditivo (Campo L, CM y NCM. **Abreviaturas:** nXlits, porción tráqueo-siríngica del núcleo hipogloso; RA, núcleo robusto del arcopalio; DM, núcleo intercolicular dorso-medial; RAM, núcleo Retroambigualis; PAm, núcleo Parambigualis; Uva, núcleo Uvaeformis; Nif, núcleo interfacial del nidopalio; Ov, núcleo Ovoidalis; LMAN, núcleo lateral magnocelular del nidopalio anterior; DLM, núcleo lateral dorsal del tálamo medial; CM, mesopalio caudal; NCM, nidopalio medial caudal. Figura tomada de (Boari, 2019).20

Figura 6. Esquema general del diseño experimental. Realizamos registros de actividad neuronal extracelular mientras se reproducen estímulos auditivos y el ave se encuentra dormida.26

Figura 7. (izquierda) Esquema en vista superior del soporte craneal estereotáxico fijado en la región frontal-parietal del cráneo de un ave. (derecha) Fotografía de un ave con el soporte implantado. Este dispositivo nos permite inmovilizar la cabeza del animal en posición estereotáxica sin necesidad de ocluir el canal auditivo.29

Figura 8. Esquema de la estación de registro electrofisiológico. El marco gris esquematiza una caja insonorizada donde posicionamos al ave y el parlante que reproduce los estímulos auditivos. Para

grabar la actividad neuronal utilizamos un sistema de adquisición comercial del fabricante “Intan Technologies”. La señal neuronal extracelular primero es amplificada y digitalizada por un amplificador “RHD 2132” y luego pasa a una interfaz USB “RHD 2000” que comunica con la PC. Los estímulos auditivos se reproducen desde la PC. La señal se bifurca en dos canales, uno llega hasta el parlante dentro de la caja insonorizada y el otro ingresa a una entrada analógica de la placa “RHD 2000”. De esta manera logramos adquirir la actividad neuronal y el audio en simultáneo.31

Figura 9. La respuesta de la actividad de múltiples unidades neuronales en HVC es selectiva al canto propio. Los paneles de arriba hacia abajo muestran: señal de audio, espectrograma, histogramas de disparos neuronales y, finalmente, los eventos de disparo de neuronas a lo largo de las 20 repeticiones (o ensayos) de cada estímulo. Sobre los histogramas de disparos neuronales (barras grises de 15ms de ancho) graficamos una curva que integra los disparos neuronales con una ventana de 15ms que se desplaza en pasos de 5ms. El objetivo de esta curva es tener una representación con saltos discretos más pequeños para complementar al histograma. Notar que la actividad neuronal aumenta únicamente frente a la presentación del canto propio y no lo hace cuando se reproduce el canto reverso o el canto de un conespecífico.36

Figura 10. Ejemplo de cómo, para un único sitio de registro, la respuesta neuronal en HVC varía dependiendo la composición espectral del estímulo auditivo. Arriba en verde y gris, respuesta neuronal al suprimir bajas frecuencias del canto propio. Abajo en azul y gris, respuesta neuronal al eliminar altas frecuencias del canto propio. Todos estos datos provienen de un único sitio de registro de un único animal. En esta figura, para facilitar su visualización, el espectrograma se encuentra ampliado y fuera de escala respecto a la respuesta neuronal. La barra roja indica la ventana temporal donde se reproduce el sonido para comprender como se alinea el estímulo auditivo con la respuesta neuronal.37

Figura 11. Cambios en la respuesta de múltiples unidades neuronales en función de la composición espectral del estímulo auditivo fBOS (canto propio filtrado). Los datos mostrados en esta figura provienen de la Figura 10. Cuantificamos la cantidad de disparos neuronales acumulados luego de la presentación de 20 repeticiones de cada estímulo auditivo. En esta figura se pueden ver los histogramas de actividad neuronal resultante alineados a la señal de sonido y espectrogramas de 4 estímulos diferentes en un mismo sitio de registro. Los resultados (a, b, d, e) corresponden a: cantos procesados con un filtro pasa-altos que suprime frecuencias debajo de (a) 1.5 kHz y (b) 4.5 kHz y por otro lado cantos filtrados con pasa-bajos que suprime frecuencias superiores a (d) 1.5 kHz y (e) 4.5 kHz. Normalizamos la cantidad de disparos neuronales que ocurren durante la presentación de los estímulos dividiéndolos por el total de disparos ocurridos durante la presentación del canto propio completo (más detalles en texto). En los paneles laterales de la derecha se muestra como varía la respuesta neuronal normalizada en función de las frecuencias de corte de los distintos filtros pasa-altos (a, curva verde) y pasa-bajos (f, curva azul). Las letras sobre la curva indican correspondencia con los ejemplos de los paneles de la izquierda.38

Figura 12. Datos acumulados de la actividad neuronal normalizada en función de las frecuencias de corte de los filtros pasa-altos (arriba), pasa-bajos (abajo) y el canto reverso (REV). Las líneas delgadas corresponden a los datos de un mismo sitio de registro, y la línea gruesa a la media resultante y el intervalo de confianza (IC_{95} ; $\alpha = 95\%$). Los asteriscos muestran diferencias significativas (GLM, $p < 0.5$) respecto al estímulo REV. Datos de 42 protocolos de 3 aves distintas.40

Figura 13. Ejemplo de respuesta de dos bandas del potencial de campo local frente a estímulos auditivos. En gris claro: Traza promedio de la banda de 30Hz. En gris oscuro: Traza de la banda “gamma-alta” (80-200 Hz). Todas se encuentran alineadas con los estímulos auditivos. Las señales de

potencial local surgen de promediar la actividad de las 20 presentaciones de cada estímulo. Durante la presentación del canto propio (y en menor medida, frente al canto del conespecífico) hay un aumento de la fuerza de la banda de 30Hz. Esto no ocurre en la banda “gamma alta” o la banda de 30Hz cuando se presenta el canto reverso.42

Figura 14. Datos acumulados de diferencia de la banda de LFP tradicionales de la literatura cuando se reproduce un estímulo auditivo y el silencio posterior. Los estímulos estudiados en este caso fueron el canto propio (BOS) y, como control, el canto propio reproducido en reversa (REV). No encontramos diferencias estadísticas en la diferencia de la fuerza de la banda de LFP explicada por el estímulo BOS al compararlo con el control REV (GLM, $p > 0.05$). Los datos provienen de 87 sitios de registro de 5 aves.43

Figura 15. Datos acumulados de diferencia de la banda de 30 Hz del potencial de campo local cuando se reproduce un estímulo auditivo y el silencio posterior. Los estímulos estudiados en este caso fueron el canto propio (BOS), canto de un conespecífico (CON) y el canto propio reproducido en reversa (REV). Las barras y asteriscos indican diferencias significativas (GLM, $p < 0.05$) entre el BOS y los controles CON y REV. Los datos provienen de 87 sitios de registro de 5 aves.44

Figura 16. Respuesta de la banda del 30 Hz del potencial local de campo (LFP) a los cantos propios filtrados (fBOS) y los controles BOS y REV. Al igual que la actividad neuronal (Figura 12), la respuesta de la banda de 30 Hz del LFP varía con la composición espectral del estímulo. Los asteriscos muestran diferencias significativas (GLM, $p < 0.05$) con la respuesta generada por el BOS. La respuesta del LFP no muestra diferencias significativas con la generada por el BOS si eliminamos las frecuencias fundamentales por debajo de los 1.5 kHz (arriba en verde) o si eliminamos las frecuencias altas (abajo en azul) por encima de los 3.5 kHz. Resulta relevante que algunos estímulos filtrados tengan una respuesta menor al canto reverso (REV), algo que no ocurre con la actividad neuronal. Datos de 41 protocolos de 3 aves.45

Figura 17. Comparación entre espectrogramas del canto propio real de un ave (arriba) y el mejor canto sintético generado (abajo). Aquí el parámetro de escala introducido está definido como $\lambda = \lambda_{\text{cabeza}} = \lambda_{\text{cuello}} = 1$53

Figura 18. Composición espectral del canto propio real (arriba) y el sintético (abajo) calculada a partir de la FFT (Fast Fourier Transform) del sonido.54

Figura 19. Ejemplos espectrograma (izquierda) y composición espectral (derecha) de distintos cantos sintéticos al variar los parámetros de escala. Arriba mostramos el canto sintético “ideal” (tamaño estándar). En medio, el canto del ave “cabeza grande y cuello normal” y abajo el canto sintético del ave “cuello largo y cabeza de tamaño normal”. Tanto en el espectrograma como en la composición espectral podemos apreciar diferencias en la modulación espectral. La fecha y línea punteada señalan las frecuencias donde la diferencia en la composición espectral es más pronunciada. Otra diferencia puede verse en el espectrograma del canto sintético “cuello largo y cabeza de tamaño normal” (abajo), donde las frecuencias más bajas son menos intensas en comparación a los otros dos estímulos56

Figura 20. Caracterización del tracto vocal. Gráfico del comportamiento del filtro al usar como señal de entrada ruido blanco. En gris se muestra la composición espectral de la señal de entrada (ruido blanco) y en negro la señal filtrada que sale del aparato vocal. Arriba, caracterización del filtro de un ave “chica” ($\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}} = 0.6$), al medio comportamiento del filtro de un ave de tamaño “estándar” ($\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}} = 1.0$) y abajo caracterización del filtro de un ave “grande” ($\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}} = 1.4$).57

Figura 21. Respuesta neuronal en núcleo HVC al canto propio, canto sintético, canto reverso y conespecífico. Para cada tipo de estímulo se muestra la señal de sonido alineada con el histograma de actividad neuronal acumulada (barras grises de 15ms de ancho) junto con la curva que integra los disparos neuronales (sliding window technique, ventana de 15ms que se desliza en pasos de 5ms) y los eventos de disparo de neuronas a lo largo de las 20 repeticiones de cada estímulo. Los histogramas de respuesta neuronal acumulada revelan una respuesta neuronal selectiva al canto propio (en rojo) y al canto sintético (en azul).61

Figura 22. Ejemplo de una grilla de respuestas neuronales generadas por la presentación de diferentes cantos sintéticos en un mismo sitio de registro. Los ejes de la grilla indican la combinación de los parámetros de escaleo (λ_{cuello} y λ_{cabeza}) de cada estímulo. Para cada tipo de estímulo se muestra la señal de sonido alineada con el histograma de actividad neuronal acumulada y los eventos de disparo de neuronas a lo largo de las 20 repeticiones de cada estímulo. Los estímulos que siguen las leyes de escala (aquellos sobre la diagonal ascendente, con valores $\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}} = 0.6$; $\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}} = 1.0$ y $\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}} = 1.4$) parecen tener respuestas similares mientras que algunos de los SYN “monstruosos” generan una respuesta neuronal menor (i.e. $\lambda_{\text{cuello}} = 1.4$ y $\lambda_{\text{cabeza}} = 1.0$).62

Figura 23. Gráfico de la integral de disparos normalizada de los registros mostrados en la Figura 22. Para cada uno de los estímulos de la figura anterior, calculamos la integral de disparos normalizada y la graficamos en función del plano de combinaciones de los parámetros de escaleo (λ_{cuello} y λ_{cabeza}).63

Figura 24. Datos agrupados de las grillas de respuesta neuronal normalizada a distintos cantos sintéticos. Cada punto azul corresponde al valor de actividad neuronal de un sitio de registro y el punto negro indica la media resultante. En este conjunto de datos preliminares, los estímulos que no siguen las leyes de escala tienen valores significativamente menores (GLM, $p < 0.05$, marcados con asterisco). Los datos provienen de 23 sitios de solamente 2 aves distintas.65

Figura 25. Perfiles de integral de disparos normalizada (datos preliminares agrupados de 23 sitios de registro de únicamente 2 aves distintas) para cantos sintéticos que respetan las leyes de escala ($\lambda_{\text{cuello}} = \lambda_{\text{cabeza}}$) con aquellos donde el valor de λ_{cuello} y λ_{cabeza} son extremos y opuestos, es decir, los modelos “monstruosos”: cuello largo y cabeza chica ($\lambda_{\text{cuello}} = 1.4$ y $\lambda_{\text{cabeza}} = 0.6$) y cuello corto y cabeza grande ($\lambda_{\text{cuello}} = 0.6$ y $\lambda_{\text{cabeza}} = 1.4$). Los puntos negros indican el valor de la media. La línea azul continua marca la “diagonal” que une los estímulos que siguen las leyes de escala en la Figura 24, mientras que la línea azul punteada marca la “diagonal” que une los cantos sintéticos más “monstruosos” (con valores de λ_{cuello} y λ_{cabeza} extremos y opuestos). Esta figura muestra como en un estímulo monstruoso la caída de la actividad neuronal es mucho mayor que en un estímulo que sigue las leyes de escala para este conjunto de datos preliminares..66

Figura 26. (arriba) Grabación de canto espontáneo de un diamante mandarín macho adulto. Los recuadros indican una misma sílaba repetida dos veces en el canto. Al ser un canto espontáneo, existen pequeñas diferencias entre las repeticiones de una misma sílaba durante la ejecución de un canto. (abajo) Canto propio (BOS) construido a partir del canto espontáneo. Para reducir la variabilidad del estímulo, recreamos el canto espontáneo “copiando y pegando” las sílabas repetidas dentro del canto. (arriba y abajo) En rojo mostramos sílabas que son copias entre si y en azul una sílaba que tiene la misma identidad que las rojas, pero presenta cambios sutiles consecuencia de la variación inevitable que ocurre durante la producción vocal.74

Figura 27. Grilla con todos los estímulos sintéticos del canto de un ave modificando los parámetros de escala. En la imagen se muestra incrustado un QR que direcciona a los audios que se muestran en la figura. Para mayor comodidad también dejo disponible un enlace que direcciona al mismo sitio: .77

Figura 28. Mapa de las exploraciones hecha en el hemisferio izquierdo un ave. El cuadrado negro indica el punto de referencia estereotáxico “Y”. Las celdas en verde indican los lugares de registro donde hubo señal neuronal selectiva al canto propio (típica del núcleo HVC), las celdas rojas indican los sitios de registro donde no se observó señal neuronal selectiva al canto propio (muy posiblemente fuera de HVC), las celdas amarillas (no se muestra ninguna en esta figura pero si en las figuras de abajo) indican los sitios de registro donde dudaba si la actividad neuronal era selectiva al canto al punto que requería analizar los datos en detalle y finalmente las celdas grises (no se muestran en esta figura pero si en las de abajo) indican el comienzo del borde del cemento dental. Dentro de cada celda se indica la fecha de registro de cada exploración. Arriba a la izquierda en amarillo se muestra el código de identificación del sujeto experimental.78