Biblioteca Digital
F C E N - U B A

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

Tesis Doctoral

Aceleración hormonal en la adquisición del canto en canarios juveniles (Serinus canaria)

Alliende González, Jorge Andrés

2009

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

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

Cita tipo APA:
Alliende González, Jorge Andrés. (2009). Aceleración hormonal en la adquisición del canto en canarios juveniles (Serinus canaria). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Alliende González, Jorge Andrés. "Aceleración hormonal en la adquisición del canto en canarios juveniles (Serinus canaria)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

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

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Física

Aceleración hormonal en la adquisición del canto en canarios juveniles (*Serinus canaria*)

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

Jorge Andrés Alliende González

Director: Gabriel B. Mindlin

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

Buenos Aires, 2009

Aceleración hormonal en la adquisición del canto en canarios juveniles (*Serinus canaria*)

Resumen:

En las aves canoras, la ontogenia del canto presenta un paralelismo con la adquisición del habla en humanos. Al igual que los humanos, el desarrollo de este comportamiento requiere en primera instancia la exposición a las vocalizaciones típicas de la especie. Luego se necesita un período sensorial-motor en el que se practica el canto luego de cual la vocalización se produce de manera estereotipada. Esta última requiere el domino de las instrucciones motoras que gobiernan el aparato vocal y al sistema respiratorio.

En esta tesis, se analizaron los gestos de presión de los sacos aéreos involucrados en la producción de canto de canarios adultos. A pesar de que los canarios estudiados estuvieron expuestos a distintos tutores, encontramos que existen gestos de presión que son comunes a todos ellos. Esto nos permitió generar una base de gestos respiratorios cuyos elementos son utilizados por los canarios para construir el canto típico de la especie.

La diversidad de estos gestos de presión puede ser generada por un sistema no lineal sencillo. En una segunda etapa se buscó un sistema dinámico que fuera capaz de generar esta diversidad y que fuera lo más sencillo posible. El sistema propuesto es en algún sentido minimal: es la forma normal de un campo vector en la vecindad de una singularidad lineal forzada. Al estar constituido por el mínimo de términos necesarios para generar esta diversidad de gestos de presión, nuestro sistema constituye una restricción para cualquier implementación neuronal que pretende emular estos gestos. Luego se propuso un modelo neuronal que tiene en cuenta las propiedades anatómicas de las neuronas que forman el núcleo RA (*Robustus acropalium*) constituido por poblaciones excitatorias e inhibitorias. Este segundo modelo también es capaz de generar la diversidad de los patrones de presión y es compatible con la forma normal anteriormente mencionada.

La ubicuidad de algunos gestos de presión, aún en aves que no estuvieron sometidas a las mismas experiencias auditivas, nos indujo a preguntarnos por el rol del aprendizaje en la ontogénesis de los mismos. Así, se expuso a canarios juveniles, al inicio del período sensorial motor, a un tratamiento con testosterona, conocido acelerador hormonal del canto en juveniles. Este tratamiento tuvo como resultado un rápido desarrollo del canto en ellos. Luego de 20 días de tratamiento, los gestos de presión producidos por los juveniles fueron similares a los producidos por los adultos aún si la comparación involucra sutiles propiedades morfológicas. De este modo pudimos mostrar que un extenso período sensorial motor no es necesario para producir los gestos de presión típicos involucrados en la producción del canto esta especie; uno de los dos gestos motores fundamentales requeridos para el control del aparato vocal aviar.

Palabras clave: canto de aves, testosterona, control motor, modelos no

lineales, Serinus canaria

Hormonal acceleration of song development in juvenile canaries (*Serinus Canaria*)

Abstract:

In songbirds, the ontogeny of singing behaviour presents a parallel with the acquisition of human speech. Like humans, the development of this behavior requires in the first instance of the exposure to species-typical vocalizations. Afterwards, a sensory-motor period is needed to in order to practice the song, after which the vocalization is produced so in a stereotyped way. The latter requires mastering the motor instructions governing the vocal apparatus and the respiratory system.

In this thesis, we analyzed the gestures of air sac pressure involved in the production of adult canary song. Although the canaries studied had been exposed to different tutors, we found the existence of pressure gestures common to them all. Thus, we were allowed to generate a basis of respiratory gestures whose elements are used by canaries to construct the typical song of the species.

The diversity of these pressure gestures can be generated by a simple nonlinear system. On a second stage of this work we looked for a dynamical system capable of generating this diversity in the simplest way. The proposed system is in a minimal: the normal form of a vector field in the vicinity of a forced linear singularity. Given that it is composed by the minimum number of terms needed to generate the diversity of pressure gestures, our system is a restriction for any neuronal implementation that aims to emulate these gestures. Then we proposed a neural model that takes the anatomical properties of neurons in consideration, both excitatory and inhibitory ones that form the RA nucleus (textit Robustus acropalium). This second model is also capable of generating the diversity of pressure patterns and is compatible with the normal form mentioned before.

The ubiquity of some gestures of pressure, even in birds that were not subject to the same auditory experiences led us to wonder about the role of learning in their ontogenesis of them. Thus, young canaries were exposed, at the beginning of the sensory motor period, to a testosterone treatment, known accelerator of song development in juvenile canaries. This treatment resulted in a rapid development of adult song production. After 20 days of treatment, the pressure gestures produced by juveniles were similar to those produced by adults even if the comparison involved subtle morphological properties. Thus we show that an extended period of sensory motor is not required to produce the typical pressure gestures involved in producing this kind of song, one of the two key motor instructions required to control the avian vocal apparatus

keywords: birdsong, testosterone, motor control, non linear models, Serinus Canaria

Agradecimientos

A mi madre Beatriz Chaiquin por ser el viento optimista que empuja mis velas, desde que tengo recuerdo. A mi padre Alfredo Alliende -a quien extraño- por mostrarme el mundo y ser mi ancla para construir el propio.

A mi director Dr. Gabriel Mindlin, por la mano amiga tendida a tiempo, por crear un lugar de trabajo en el que siempre fui tratado como a un par y pude crecer como persona y profesional, por las charlas, discusiones y correcciones múltiples.

A mis compañeros y colegas actuales y anteriores del Laboratorio de Sistemas Dinámicos por hacer que la tarea se desarrolle en un ambiente generoso y ameno: Dr. Marcos Trevisan, Dr. Jacobo Sitt, Lic. Ezequiel Arneodo, Lic. Leandro Alonso, Dr. Jorge Méndez, Dra. Anita Amador, Nicolas Adreani, Rodrigo Alonso, Matías Goldín, Yonatan Sanz Perl.

A mis compañeros docentes: Andrés, Nancy y Patricia quienes me apoyaron en este tramo final supliendo mis ausencias.

A todos los profesores con quienes cursé por lo que me permitieron aprender de cada uno.

A mi esposa Laura. Sin su apoyo, paciencia y amor seguramente todavía estaría escribiendo el segundo capítulo de la tesis y no hubiera dado los finales que me faltaban hace menos de un mes. Gracias Lau.

Índice general

1. Introducción **3**
1.1. Aves canoras como modelo de aprendizaje vocal 3
1.1.1. Producción de canto: protocolo de aprendizaje 3
1.1.1.1. Sistema periférico 4
1.1.1.2. Sistema neuronal 7
1.1.2. Etapas de aprendizaje del canto 8
1.1.3. Correlato entre el desarrollo neuronal y la evolución del canto 10
1.1.4. El rol de la testosterona en la evolución y producción del canto 11
1.1.5. El canto de las aves como sistema objeto de modelado en dinámica nolineal 11
1.1.5.1. Modelado del aparato fonador 12
1.1.5.2. Modelado de sistema neuronal: Interacción entre el sistema neuronal y el sistema periférico 13
1.1.6. Hipótesis de trabajo 13
1.1.6.1. Patrones respiratorios: Similares en diferentes individuos a pesar de distintos protocolos de aprendizaje 14
1.1.6.2. Existencia de un modelo dinámico sencillo que permita generar patrones respiratorios . 14
1.1.6.3. Juveniles y Testosterona: cuantificar qué parte del canto cristalizado se aprende y qué parte necesita maduración 14

2. Materiales y Métodos **17**
2.1. Adquisición de patrones respiratorios 17
2.1.1. Sensor de presión 17
2.1.2. Condicionamiento de la señal 18
2.2. Adquisición del sonido 25
2.3. Conexión del sensor a los sacos aéreos 25
2.4. Los canarios 27
2.5. Gráficos de recurrencia 28

2.6. Envolvente del sonido 29
2.7. Criterio de similitud de los gestos de presión 29

3. Patrones respiratorios en adultos 31
3.1. Similitud de patrones respiratorios 31
3.1.1. Estado de materia 31
3.1.2. Obtención de una muestra completa de repertorio . . 32
3.1.3. Obtención de los gestos de presión 34
3.1.4. Comparación de series temporales de presión. Construcción de una base de patrones. 35
3.1.5. Discretización de las frecuencias silábicas 38
3.2. Generación sintética 39
3.2.1. Modelo minimal para la generación de los gestos de presión 39
3.2.2. Soluciones del sistema forzado: Gestos de presión sintéticos 42
3.2.3. Una posible implementación neuronal 48
3.2.3.1. Modelo neuronal para la generación de los gestos de presión 49
3.3. Síntesis 53

4. Aceleración hormonal de la adquisición de canto en canarios juveniles: gestos de presión y frecuencia silábica 55
4.1. Gestos de presión en canarios juveniles 56
4.1.1. Patrones respiratorios en juveniles no tratados 59
4.2. Evolución temporal de la frecuencia silábica 60
4.2.1. Ontogenia de las frecuencias silábicas 62
4.3. Síntesis 63

5. Conclusiones 67
5.1. Similitud de patrones respiratorios 67
5.2. Generación sintética 67
5.2.1. Implementación neuronal 69
5.3. Juveniles tratados con testosterona 69

Capítulo 1

Introducción

1.1. Aves canoras como modelo de aprendizaje vocal

1.1.1. Producción de canto: protocolo de aprendizaje

Las aves siempre han fascinado al hombre, tanto por su capacidad de volar cuanto por la hermosura de su plumaje y por los bellos sonidos que emiten, es decir, su canto.

Las aves canoras, que pertenecen al orden de los paseriformes —más precisamente al suborden de los oscinos—, necesitan la exposición al canto de un tutor como parte del proceso de adquisición de su canto. Este suborden representa el 40 % de las aves conocidas.

La necesidad de un tutor para lograr las vocalizaciones propias de la especie se observa en muy pocos animales. En los mamíferos se encuentra en el hombre, en los cetáceos (delfines y ballenas) y murciélagos, dentro de la clase de las aves también se da en los órdenes psittaciformes (loros) y apodiformes (colibríes) (Williams, 2004). El tamaño y la fácil adaptación a la vida en cautiverio de las aves propician su observación en el laboratorio, por lo que las hemos seleccionado para nuestro estudio. En el cuadro 1.1 se muestra la clasificación de las aves que interesan en este trabajo.

Tanto el canto de estos pájaros, cuanto el habla humana deben ser aprendidos. Este aprendizaje, en ambos casos, se logra mediante mecanismos similares. En una primera etapa se deben escuchar las vocalizaciones de un adulto y memorizarlas. Luego tiene lugar una segunda etapa de práctica, donde el canto (el habla) es lábil y poco preciso, produciendo sílabas aisladas y muy variables, en las que no se observa —mayormente— reiteración. En esta fase es fundamental la retroalimentación auditiva, proceso mediante el que se compara lo producido con lo memorizado en la primera etapa. Finalmente, una vez perfeccionado el canto, se logra un canto estereotipado.

<table>
<tr><td colspan="4">Reino: Animalia</td></tr>
<tr><td colspan="4">Filum: Chordata</td></tr>
<tr><td colspan="4">Subfilum: Vertebrata (vertebrados)</td></tr>
<tr><td colspan="4">Superclase: Tetrapoda</td></tr>
<tr><td colspan="4">Clase: Aves</td></tr>
<tr><td colspan="4">Orden:
• Psittaciformes (loros)
• Apodiformes (colibríes)</td></tr>
<tr><td colspan="4">• Paseriformes (aves de percha)</td></tr>
<tr><td></td><td>Suborden: Oscinos</td><td colspan="2">Dentro de este suborden existen 60 familias, entre ellas la Fringillidae a la que pertenecen los canarios entre otros</td></tr>
<tr><td></td><td>Suborden: Furnarii</td><td>Dentro de este suborden existen 4 familias entre ellas la Furnariidae, los horneros pertenecen a ella.</td><td rowspan="3">Estos tres subórdenes se agrupan con el nombre de suboscinos</td></tr>
<tr><td></td><td>Suborden: Tyranni</td><td>Dentro de este suborden existe 1 familia</td></tr>
<tr><td></td><td>Suborden: Euryaimi</td><td>Dentro de este suborden existen 4 familias</td></tr>
</table>

Figura 1.1: Clasificación sistemática de las aves que son de interés para este trabajo

Estas características[1] tornan al sistema de las aves en inmejorable para entender los fenómenos del aprendizaje, incluso para dilucidar los mecanismos empleados en el aprendizaje del habla por los humanos.

1.1.1.1. Sistema periférico

En la producción del canto intervienen el sistema nervioso central y el sistema periférico. Dentro del sistema periférico se distinguen el sistema respiratorio y el aparato fonador, llamado siringe. Los músculos inspiratorios, los espiratorios y los sacos aéreos del sistema respiratorio son los responsables de lograr que el aire fluya a través de la siringe. La siringe, se ubica en el saco aéreo interclavicular donde los bronquios primarios se unen para formar la traquea.

En la figura 1.2 se muestra un esquema de la siringe y sus principales músculos. En particular, la siringe de los pájaros canores pertenecientes al suborden de los oscinos es controlada por seis pares de músculos bilaterales, que modifican una estructura consistente en anillos cartilaginosos. En la parte interna de cada uno de los tubos que forman la siringe encontramos tejidos longitudinales blandos a los que llamamos labios. Una de las prin-

[1] Para profundizar acerca de las ver con profundidad las similitudes y diferencias entre el habla humana y el canto ver Doupe and Kuhl, 1999

cipales funciones de los músculos de la siringe es controlar las propiedades biomecánicas de estos labios. La vibración de estos labios mediante el flujo de aire es la responsable de la generación del sonido cuando un ave canta. Para encontrar más detalles sobre el aparto vocal de las aves canoras ver (Suthers and Zollinger., 2004a; Goller and Larsen, 1997; Larsen and Goller, 1999).

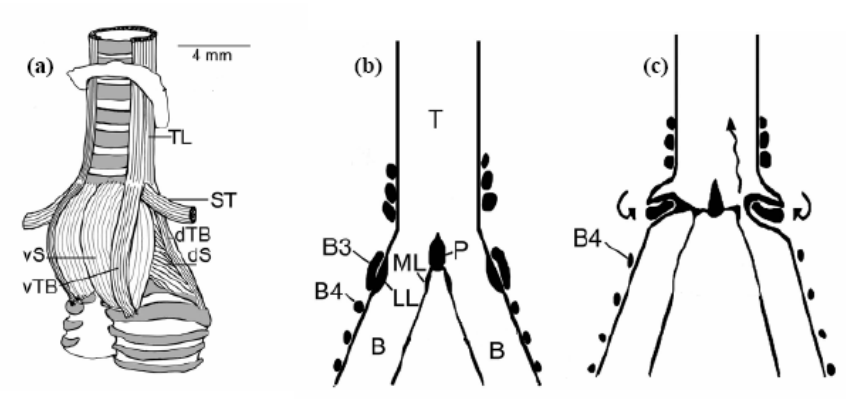

Figura 1.2: La siringe es una estructura doble que se encuentra en la unión de los bronquios y la traquea. (a) Vista ventrolateral de la siringe ilustrando su musculatura. (b) Vista esquemática ventral durante respiración normal. (c) Vista ventral durante fonación en el lado izquierdo mientras el lado derecho esta cerrado. Abreviaciones: T, traquea; ML, medial labium; LL, lateral labium; B, bronquios; TL, m. tracheolateralis; ST, m. sternotrachealis; vS, m. syringealis ventralis; vTB, m. tracheobronchialis ventralis; dTB, m. tracheobronchialis dorsalis; dS, m. syringealis dorsalis; B3 and B4, tercer y cuarto anillo bronquial; P, pecíolo. (Adaptado de (Suthers and Zollinger., 2004a))

El aparato respiratorio de las aves es diferente al de los mamíferos. En los mamíferos las funciones de ventilación e intercambio de gases se comparten en una estructura común: los bronquios, los ductos alveolares y los cientos de miles de alvéolos. En cambio, en las aves las funciones de ventilación e intercambio de gases están completamente separadas; la ventilación está a cargo de los sacos aéreos que actúan como fuelles para ventilar a los pulmones en los que se produce el intercambio de gases. Los sacos aéreos ocupan un 90 % del volumen del aparato respiratorio y el 10 % restante está comprendido por los pulmones —relativamente pequeños y rígidos— que contienen cientos de unidades de intercambio de gases llamadas parabronquios (Powell and Hopkins, 2004). En la figura 1.3 se muestra un esquema del sistema respiratorio de las aves, en el que se distinguen los pulmones y nueve sacos aéreos: uno interclavicular, dos cervicales, dos torácicos anteriores, dos

torácicos posteriores y, finalmente, dos abdominales.

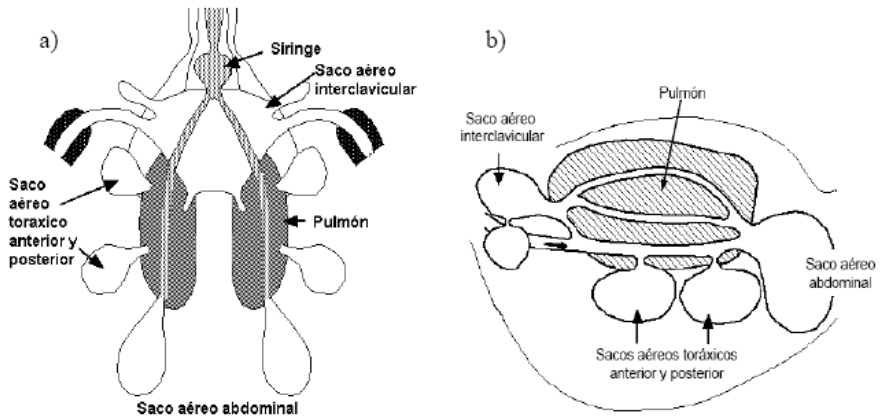

Figura 1.3: Esquema del sistema respiratorio de un pájaro a) vista frontal, b) vista lateral

El sistema de los sacos aéreos permite un flujo unidireccional de aire en los pulmones. De este modo, el aire que llega a los pulmones es más rico en oxígeno. En cambio, en los mamíferos el flujo de aire es bidireccional, por ello dentro de los pulmones hay una mezcla de aire "nuevo" y aire "viejo" de lo que resulta que haya menos oxígeno disponible. Resulta así que el sistema respiratorio de las aves es más eficiente que el de los mamíferos.

La respiración en los pájaros requiere de dos ciclos respiratorios (inspiración, espiración \ inspiración, espiración) para mover el aire a través del sistema respiratorio completo, a diferencia de la de los mamíferos que requiere un solo ciclo. La respiración de las aves y sus ciclos se esquematizan en la figura 1.4.

En la primera inspiración de las aves el aire fluye a través de la tráquea y principalmente a los sacos aéreos posteriores. En la espiración el aire se mueve desde los sacos aéreos posteriores hacia los pulmones. Luego, en la segunda inspiración el aire fluye desde los pulmones hacia los sacos aéreos anteriores. Finalmente, con la segunda espiración el aire sale de los sacos hacia la traquea y de ahí al exterior.

Otra destacable diferencia entre el sistema periférico de las aves y el de los mamíferos, es que en las primeras los músculos inspiratorios y espiratorios realizan un control activo tanto en la respiración normal cuanto durante la producción del canto (Wild et al., 1998), control activo que en la respiración normal de los mamíferos está ausente.

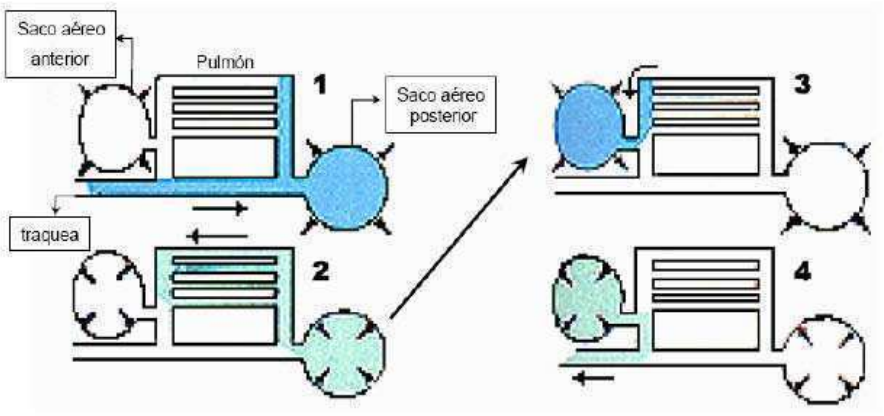

Figura 1.4: Esquema del ciclo respiratorio en la aves. 1) Inspiración, los sacos aéreos se expanden, 2) Espiración, los sacos aéreos se contraen y el aire fluye a través del los pulmones, 3) Inspiración, 4) Espiración. Las flechas hacia afuera (adentro) indican la expansión (compresión) de los sacos aéreos.

1.1.1.2. Sistema neuronal

La adquisición, mantenimiento y producción del canto están gobernados por un grupo de núcleos neuronales, conocido como **sistema de canto**, debido a una traducción directa de la expresión inglesa *song system* (Nottebohm, 2005) —lo hemos llamado en este trabajo sistema neuronal— que ha sido estudiado mayoritariamente en diamantes mandarín y canarios.

El sistema neuronal está formado por un número relativamente pequeño de núcleos cuyas funciones están identificadas, sólo respecto de su diferente agrupamiento y organización, en dos grandes circuitos que denominamos el sistema motor y el AFP (siglas de Anterior Forebrain Pathway). Estos circuitos constituyen dos caminos diversos para la conexión de los núcleos integrantes del sistema neuronal. Cada núcleo neuronal está formado por algunos miles de neuronas. Se ha observado que cada diferente conexión, es decir cada uno de los circuitos se vincula con distintos procesos: el sistema motor se relaciona con la producción del canto —esto es, la emisión del sonido concatenado en que el canto consiste—, y el AFP se vincula al aprendizaje y mantenimiento del canto estereotipado propio de la especie —es decir, la adquisición de la capacidad de emitir un particular sonido que es el canto específico de la especie—.

El sistema motor esta constituido por cinco núcleos:

- el High Vocal Center (HVC), —en la actualidad, la sigla HVC constituye el nombre propio del núcleo anteriormente conocido como High

Vocal Center—, que se supone que yace en lo más alto de la organización jerárquica del sistema de canto,

- el núcleo robusto del acropalio (RA) -que constituye la única salida del telencéfalo-
- el doceavo nervio del núcleo craneal- (nXIIts),
- el retroambigualis nucleus (RAm) y
- el parambigualis nucleus (PAm),

que en conjunto son responsables de la producción del gesto motor requerido para el canto. El circuito se organiza como seguidamente se expone.

El HVC se conecta al núcleo RA, el que inerva al núcleo de neuronas motoras nXIIts que, a su vez, inerva a la siringe y a los núcleos respiratorios RAm y PAm.

Este circuito esta involucrado en el control motor de la producción de canto. Se ha observado que si se lesiona alguno de los núcleos pertenecientes a este circuito, el pájaro deja de emitir canto (Yu and Margoliash, 1996). El AFP esta constituido por núcleos pertenecientes al telencéfalo:

- el HVC, ya nombrado,
- el Área X del cuerpo estriado,
- el núcleo magnocelular lateral de la porción anterior del nidopalio (lMAN),
- el núcleo dorsolateral de la porción medial del tálamo (DLM),

Este circuito se organiza de la siguiente manera: el HVC inerva al Área X, la que a su vez inerva al DLM y este último se conecta al lMAN, que finalmente inerva al RA. El AFP esta asociado con el aprendizaje de canto y el mantenimiento del canto adulto ver figura (1.5). De la descripción de ambos circuitos podemos concluir que existen dos diferentes proyecciones entre el HVC al RA, vinculadas al canto. Es decir que tenemos en las aves un sistema relativamente sencillo donde se puede experimentar sobre el aprendizaje, el control motor y la retroalimentación requerida para generar un comportamiento complejo como es el canto.

1.1.2. Etapas de aprendizaje del canto

Como se ha explicado en el apartado anterior, la adquisición del canto en aves canoras presenta fuertes paralelos con el aprendizaje vocal humano, en cuanto se encuentra dividido en períodos, cuyas duraciones varían entre las especies. Corresponde aquí profundizar la caracterización de las etapas previamente esbozadas.

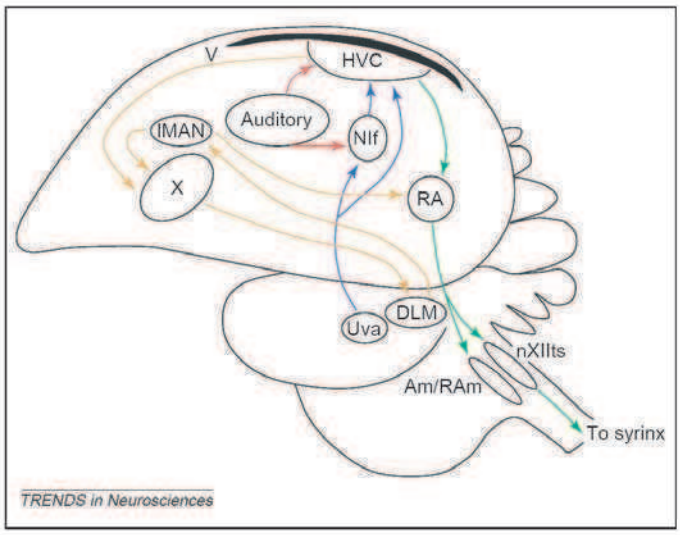

Figura 1.5: HVC. (del ingles High vocal center), RA (núcleo robusto del aquistrato) constituyen el llamado sistema motor del canto, ya que lesiones en los mismos impiden la realización de vocalizaciones. RA proyecta en el núcleo nXIIts que enerva a las neuronas que activan a los músculos siríngeos, y en RAm, que enerva a las neuronas que controlas a los músculos espiratorios. Los demás núcleos están involucrados en distintos aspectos de la coordinación inter hemisférica, integración con el sistema auditivo, y aprendizaje, aunque sus funciones específicas aún no se conocen en profundidad.

Hemos descripto una primera etapa dedicada a la exposición del sujeto del aprendizaje al canto de un tutor —caracterizado en la especie por sílabas, frecuencia, organización y combinación silábica—, durante la cual lo escucha y lo memoriza. En el transcurso de esta etapa el sujeto del aprendizaje emite sonidos de llamada —gritos que no requieren aprendizaje, indicativos de requerimiento de comida, o alerta, por ejemplo—. La memoria desarrollada durante este período se denomina **templado**, y es una memoria a largo plazo. Esta primera etapa se denomina **período sensitivo**.

Hemos también delineado una segunda etapa en la adquisición del canto que se denomina **período sensorial-motor**. Al comienzo de ella, el pájaro juvenil produce vocalizaciones iniciales, que si bien contienen rudimentos de sílabas, se caracterizan por ser muy variables en su estructura, poco repetitivas y de bajo volumen. Este canto producido se conoce como **subcanción**, del inglés *subsong*.

Luego, las sílabas —y el canto producido en su conjunto, como reiteración de ellas— son ajustadas gradualmente —en cuanto a frecuencia, organización y combinación silábica—, produciendo lo que se denomina **canción plástica**, hasta que se asemejan a las memorizadas en el período sensitivo.

La retroalimentación auditiva es crucial para que este ajuste sea llevado con éxito. Se ha observado que al ensordecer sujetos durante esta etapa, ellos no logran producir un canto que se asemeje al del adulto.

Asimismo, hemos referido la existencia de una tercera etapa dedicada a la producción de una canción adulta, cristalizada, que se denomina **etapa de cristalización**. La canción típica estable de los adultos, con sílabas más definidas, y organizadas de acuerdo a dicha tipicidad, llega al tiempo de la maduración sexual del pájaro, cuando está listo para defender su territorio y conseguir pareja.

El inicio y la duración de las etapas varían entre las especies. El diamante mandarín adquiere la canción adulta al cumplir noventa días de vida, el período sensitivo va de los 25 a 65 días de vida y el sensorial motor desde los 30 a los 90, presentándose alguna superposición entre ellos. Para los canarios, en cambio, adquirir el canto adulto les lleva 240 días de vida, el período sensitivo corresponde a los primeros 60 días de vida y los 180 restantes a la etapa sensorial-motora.

1.1.3. Correlato entre el desarrollo neuronal y la evolución del canto

Los períodos de aprendizaje están correlacionados con el desarrollo del sistema de canto (Alvarez-Buylla et al., 1988);(Mooney and Rao, 1994). El HCV —que, como hemos dicho está en la jerarquía más alta del sistema de producción del canto— a los 30 días de vida del canario se puede distinguir como una entidad anatómica discreta. A esa altura del desarrollo tiene 1/8 del volumen que alcanzará en la adultez. Tal como hemos sentado en el apartado 1.1.1.2, el HVC se conecta con el RA y el Área X. Estas conexiones se desarrollan en distintos períodos: brevemente, la proyección del HVC al Área X se desarrolla in ovo, mientras que las proyecciones al RA se desarrollan después del nacimiento. La mayoría de las conexiones entre el HCV y el RA se desarrollan al mismo tiempo que se desarrolla el canto. En el tiempo en el cual un canario está haciendo la transición entre la sub-canción y la canción plástica (60 días de vida), se reclutan muchas neuronas que conectan el HCV y el RA.

Como mencionamos, el canario adquiere las sílabas que utilizará en su canto adulto entre los 90 y 120 días de vida. El desarrollo de estas conexiones es probablemente importante para la adquisición de un programa motor. Entre los 120 y 240 días de vida la sílabas son cada vez más estereotipadas. En este período de consolidación del canto, el reclutamiento de neuronas disminuye, pero aun así continúa el reclutamiento de neuronas aún después de haber cristalizado el canto. Esto está posiblemente relacionado con la facultad de los canarios de adquirir nuevas sílabas año a año, a diferencia de los diamante mandarín que conservan el mismo canto toda su vida (Alvarez-Buylla et al., 1988).

1.1.4. El rol de la testosterona en la evolución y producción del canto

Si bien se puede afirmar que el proceso de memorización de la canción del tutor y la producción de sub canto y canción plástica pueden ocurrir con niveles bajos de testosterona, para la producción de una canción cristalizada se requieren niveles altos de testosterona.

Se ha descubierto que algunos de los núcleos descritos anteriormente sufren cambios anatómicos dependiendo de la estación del año, aumentando su volumen en la estación reproductiva, en la que los niveles de testosterona aumentan. Esto se vincula con el hecho de que estos núcleos poseen receptores de estrógenos y/o andrógenos.

Estudios en distintas especies revelaron que existe una alta correlación entre los volúmenes de los núcleos del sistema de canto, especialmente HVC, RA y Área X, la producción del canto y las fluctuaciones en los niveles de testosterona (Ball et al., 2002). Los cambios en los volúmenes de los núcleos reflejan cambios en el número de neuronas, su tamaño o cambios en los campos dendríticos dentro de cada núcleo (HVC, RA o área X), lo cual afecta la supervivencia de las neuronas. La aplicación de testosterona en pájaros macho castrados restablece la producción de canto (Sartor et al., 2005). En canarios, la aplicación de testosterona en hembras, hace que los núcleos crezcan de tamaño y que las hembras produzcan canto con cierta similitud con el de los machos adultos. Normalmente, las hembras no producen canto, o producen canto poco complejo, no el canto típico de la especie (Nottebohm, 1980). Para el caso de los canarios,los machos aprenden canciones todos los años cuando están fuera de la época de apareamiento. Durante el aprendizaje la canción es variable, los volúmenes de los núcleos son pequeños, y los niveles de testosterona son bajos. Al acercase la época de reproducción, junto con un aumento de los niveles de testosterona, la canción se vuelve más estable y estereotipada. En esta etapa los núcleos HVC y RA aumentan un 99 % y un 76 % respectivamente.

1.1.5. El canto de las aves como sistema objeto de modelado en dinámica nolineal

El estudio del canto de las aves se ha estado desarrollando desde hace más de 50 años y ha recibido contribuciones desde distintas disciplinas. Desde el punto de vista de estudio del comportamiento, tenemos la información de que el canto se produce típicamente para defender el territorio y resulta esencial en el cortejo para el apareamiento.

La fisiología permite saber qué grupos de músculos se activan cuando se produce el canto, tanto en lo que concierne a los músculos espiratorios e inspiratorios como los músculos de la siringe. Desde la neurociencia se conocen los grupos neuronales y los circuitos que se activan durante el canto. Tanto

en las manifestaciones asociadas a la defensa del territorio, como en aquellas orientadas al apareamiento, las vocalizaciones de las aves oscinas son acústicamente complejas, con propiedades acústicas y rítmicas que presentan, en algunos casos, una notable variabilidad. Para lograr la misma, el ave debe ser capaz de generar una igualmente diversa variedad de combinación de gestos motores para controlar el aparato fonador.

Una hipótesis parsimoniosa es que cada sílaba constituyente del canto requiere de una delicada arquitectura neuronal, ajustada específicamente de modo tal que los patrones motores involucrados tenga la morfología adecuada. En esta tesis hemos analizado el problema de la diversidad de gestos motores desde una perspectiva alternativa: siendo las arquitecturas neuronales descriptibles por sistemas no lineales, las actividades neuronales emergentes son capaces de generar soluciones diversas mediante pequeñas variaciones de los parámetros. Por ejemplo, si la actividad rítmica básica necesaria para lograr sílabas repetidas involucra una escala temporal en uno de los núcleos del sistema motor (por ejemplo, el HVC), cuando la misma activa a un segundo núcleo (el RA), el mismo puede responder mediante distintos subarmónicos. El motivo de esta modalidad de respuesta es que, estando formado el RA por neuronas excitatorias e inhibitorias, una segunda escala temporal queda definida.

De este modo, testearemos la hipótesis de que la diversidad de morfologías de los gestos motores asociados a distintas sílabas de los canarios es resultado de responder mediante distintos estados subarmónicos a un forzante ligeramente distinto para distintas sílabas. Este es uno de los roles fundamentales de la dinámica en el marco de este trabajo.

Un segundo modo en el cual la dinámica no lineal juega un rol en el problema del canto de aves, es que siendo la siringe un dispositivo no lineal, aún sometido a instrucciones sencillas (hasta constantes), es capaz de responder en forma compleja, generando sonidos de alto contenido espectral, aún con espectros ruidosos (asociados, en algunos casos, a oscilaciones labiales caóticas). Este aspecto no será discutido en la presente tesis.

1.1.5.1. Modelado del aparato fonador

Desde este punto de vista, se ha realizado el modelado de la siringe cuando se produce canto. En (Gardner et al., 2001) se propone un modelo de la producción del sonido en la siringe y se muestra que gran parte de la complejidad de las vocalizaciones se pueden lograr con variaciones temporales sencillas de las funciones forzantes. En (Laje et al., 2002) se relacionan cualitativamente los parámetros del modelo con parámetros biológicos, en particular con la actividad de los músculos de la siringe. Finalmente en (Mindlin et al., 2003) se realiza una validación experimental del modelo extrayendo los parámetros del mismo de mediciones de variables fisiológicas, como la actividad de los músculos siríngeos y la presión de los sacos aéreos.

Aunque para producir el canto es necesario controlar y coordinar una cantidad importante de músculos, muchas de las propiedades acústicas del canto se pueden reproducir teniendo en cuenta a esos dos parámetros. En particular el músculo siringealis ventralis en algunos oscinos es el responsables del control de la frecuencia fundamental de la sílaba.

1.1.5.2. Modelado de sistema neuronal: Interacción entre el sistema neuronal y el sistema periférico

Otro enfoque complementario al anterior es la construcción de modelos que integren los núcleos involucrados en la producción del canto y el sistema respiratorio. Brevemente, se integra en un modelo la actividad de los núcleos respiratorios y la dinámica de los sacos aéreos. Los sacos aéreos se modelan como un sistema de una masa amortiguada, forzado por los músculos inspiratorios y espiratorios, cuya actividad se supone proporcional a la de los núcleos que los inervan. En los trabajos de (Amador et al., 2005)y (Trevisan et al., 2006a,b), este tipo de modelado permitió generar gestos de presión similares a los experimentales. En ellos se propuso un modelo que sugiere, como explicación de la presencia de diferentes patrones de presión experimentales, que ellos son el resultado de un sistema no lineal forzado, que representa la actividad de los núcleos respiratorios y su interacción con el sistema respiratorio. Al forzar un oscilador no lineal, una respuesta posible —que llamamos armónica— es que el oscilador y el forzante se repitan a si mismos en el período del forzante —las soluciones del sistema están en el caso equivalente al de los sistemas lineales—. La solución también puede ser que el oscilador se repita por primera vez luego de más de un período del forzante —solución subarmónica—. En este contexto la diversidad de los patrones de presión se entiende como las soluciones subarmónicas de un sistema sencillo, es decir respuestas cuyos períodos son un múltiplo del período del forzante (Trevisan et al., 2006a).

1.1.6. Hipótesis de trabajo

En el apuntado contexto, resulta pertinente orientar el presente trabajo a la obtención de un modelo dinámico sencillo que permita generar patrones respiratorios del tipo de los observados durante su curso. Asimismo, devino oportuno profundizar sobre la verificación experimental de la existencia de similitud de patrones respiratorios en diferentes individuos sometidos a distintos los protocolos de aprendizaje, observación que involucrará el tratamiento de canarios juveniles con testosterona, con el objetivo de avanzar en una seria indagación acerca de la parte del canto cristalizado que el sujeto aprende y la parte del mismo que necesita maduración.

1.1.6.1. Patrones respiratorios: Similares en diferentes individuos a pesar de distintos protocolos de aprendizaje

La observación de canarios entre los años 2005 y 2008, en el laboratorio, evidenció que sus gestos de presión fueron similares, aunque ellos no hubieran convivido, ni interactuado entre sí, por haber sido objeto de estudio en distintos momentos. Esta no convivencia implicaba que los distintos animales no habían sido sometidos al mismo tutor, no habían escuchado el canto del otro sujeto, no pudieron aprender la canción del otro y no producían la misma canción —aunque sí cada uno una canción típica de la especie—. Estas diferencias constituían lo que llamamos distintos protocolos de aprendizaje, porque en cada caso los ejemplares provenían de distintos criadores, y aún en los casos en que se adquirieron ejemplares de un mismo criador, las adquisiciones se realizaron en tiempos diversos. Fue así que, en una primera instancia, buscamos verificar la existencia de gestos respiratorios que fueran comunes a todos los individuos, cuantificarlos, y a partir de ellos constituir una base de los patrones respiratorios involucrados en la generación de canto.

1.1.6.2. Existencia de un modelo dinámico sencillo que permita generar patrones respiratorios

Se han propuesto, desde el Laboratorio de Sistemas Dinámicos, distintos modelos que permiten generar sintéticamente los gestos respiratorios observados en los canarios, modelando el RA, o bien la interacción entre los núcleos Pam y Ram y el sistema respiratorio. Estos diferentes modelos integran la actividad de núcleos neuronales y el sistema respiratorio, sugiriendo que los distintos gestos de presión son soluciones subarmónicas de la interacción de ambos elementos y el forzante, en cada caso. La posibilidad de que distintos modelos neuronales dieran las mismas soluciones generó la necesidad de buscar un sistema dinámico minimal que diera cuenta de la morfología y frecuencia de los gestos de presión, con independencia del núcleo neuronal involucrado en el modelo.

1.1.6.3. Juveniles y Testosterona: cuantificar qué parte del canto cristalizado se aprende y qué parte necesita maduración

Los trabajos de (Gardner et al., 2005) y (Korsia and Bottjer, 1991) postulan que, en canarios, una frase de canto normal puede ser rápidamente inducida en pichones mediante su exposición al nivel de testosterona de los adultos y que, en diamantes mandarín, la exposición a testosterona afecta la obtención del canto cristalizado, dependiendo del período del aprendizaje del sujeto en que se aplique. En un anterior trabajo ya se había concluido que la testosterona aplicada en hembras genera un canto adulto, con la particularidad que los gestos producidos en el proceso se pueden caracterizar como

señales armónicas (Mendez et al., 2006). De todo ello surgió la inquietud de confrontar la acción de la testosterona sobre canarios juveniles no sometidos al proceso de aprendizaje completo, observando, especialmente, el efecto que se proyectaba sobre los gestos de presión -además del esperable sobre la frase de canto normal-. Esto, con la finalidad de contrastar los gestos observados con los gestos de presión provenientes de adultos, para así determinar la existencia de similitud entre ellos capaz de dar confianza a la hipótesis de que algunas características del canto provienen de la madurez del circuito neuronal, con independencia del proceso de aprendizaje completo.

Capítulo 2

Materiales y Métodos

El término adquisición de canto se refiere al proceso a través del que el ave logra el canto típico de la especie. El término "adquisición" también se utiliza para describir el proceso de obtención de datos en una investigación. Como en la presente investigación muchas veces el dato adquirido es canto, resulta que la expresión adquisición de canto se utiliza alternativamente para describir ambos procesos diferentes. Es por eso que, sin perjuicio de creer que el contexto es suficientemente orientativo de cada sentido, se ha decido colocar en negrita la expresión **adquisición de canto**, cuando nos referimos al proceso a través del que el ave logra el canto típico de la especie.

2.1. Adquisición de patrones respiratorios

2.1.1. Sensor de presión

Como se ha mencionado en la capítulo anterior, para la realización de este trabajo se ha decidido medir la presión de los sacos aéreos cuando el canario está cantando. Para ello fue necesario un transductor de presión. Este equipamiento convierte la variación de presión ejercida por el sujeto en un voltaje proporcional a dicha variación.

El sensor que se eligió utilizar, es el modelo FHM-02PG; de Fujikura, que ha sido ampliamente usado en este tipo de mediciones (Suthers et al., 1994; Wild et al., 1998). Este es un sensor piezoresistivo. Su reducido peso ($0{,}6g. \pm 5\,\%$) y tamaño (aproximadamente 14 x 8 x 10 mm^3) hacen que sea ideal para trabajar con pequeños animales. En la Figura 2.1 se muestra un esquema del sensor junto con sus longitudes típicas y disposición de sus 6 patas. El transductor FHM-02PG mide variaciones de presión del orden de 13.79 kPa y entrega una diferencia de tensión entre sus patas de salida (patas 1-6 y 3) proporcional a la variación de presión.

La presión de los sacos aéreos de un canario varia entre 0.05 kPa y 0.3 kPa para en la respiración normal y entre 1.5 kPa y 3 kPa durante el canto (Suthers and Zollinger, 2004b). El sensor no cuenta con una amplificación

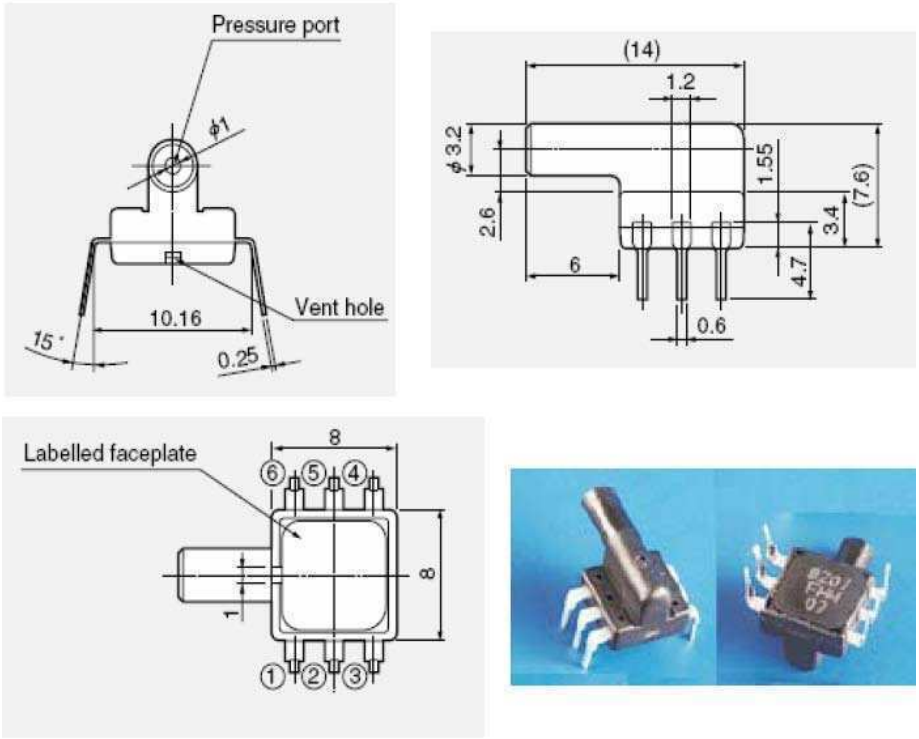

Figura 2.1: Esquema y fotografía del sensor FHM-02PG. Vistas de frente, lateral y desde abajo (las unidades están en mm.)

interna y debe ser alimentado por una fuente externa. El circuito de alimentación se presenta en la Figura 2.2.

El sensor y su circuito de alimentación, ya montados se muestran en la Figura 2.3, vistos desde arriba y desde abajo. Se utilizó un cable plano de cuatro canales -de 0.75 m de longitud- para conectar el sensor con la alimentación eléctrica (+12 volts y tierra) y para llevar las salidas del sensor a la siguiente etapa de amplificación. Este cable tiene una longitud de 0.75 m.

2.1.2. Condicionamiento de la señal

La señal de salida del sensor se conectó a una primera etapa de amplificación. Para ello, se eligió utilizar un amplificador instrumental (IN-AMP). Un in-amp es un circuito cerrado de ganancia, que posee una entrada diferencial y una salida que depende del voltaje de alimentación de referencia. Las impedancias de las entradas están balanceadas y tienen valores altos, típicamente $10^9\Omega$.

Como parte de la selección del equipamiento a utilizarse para cubrir las

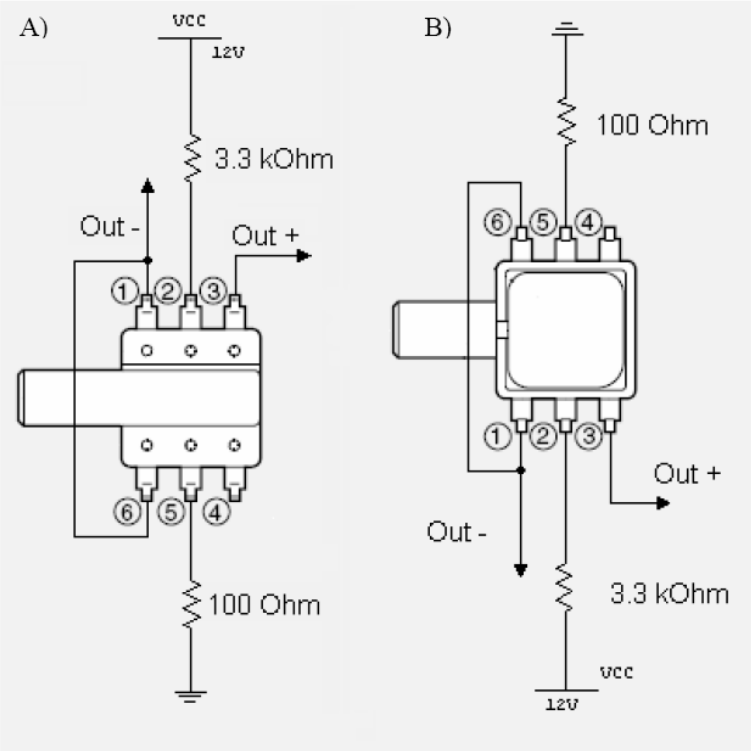

Figura 2.2: Circuito de Alimentación del sensor de presión. (A) Visto desde arriba. (B) Visto desde abajo. Las patas 1 y 6 están conectadas y son la salida negativa (Out -), la pata 3 es la salida positiva (Out +). Las patas 2 y 5 son las que se conectan a la alimentación externa, la pata 4 no requiere conexión.

necesidades de amplificación del experimento, se evaluaron las características técnicas de los amplificadores.

Al igual que en los circuitos op-amps —de los amplificadores operacionales— la impedancia de salida de los in-amp es muy baja, nominalmente de pocos miliohms para bajas frecuencias. A diferencia de los op-amp, para los que la ganancia está determinada por resistencias externas conectadas entre la entrada inversora y su salida, un in-amp utiliza una red interna que está aislada de las señales de entrada. Con la señal de entrada aplicada, la ganancia puede estar preestablecida internamente por el equipamiento, al que se le puede agregar una resistencia externa, también aislada de las señales de entrada.

La función primaria del in-amp es rechazar el voltaje común a ambas entradas y amplificar solamente la señal diferencial, es decir, la diferencia de voltaje entre las dos líneas. Esto lo diferencia de un op-amp que, utilizado como amplificador, también amplificaría el voltaje común a ambas líneas.

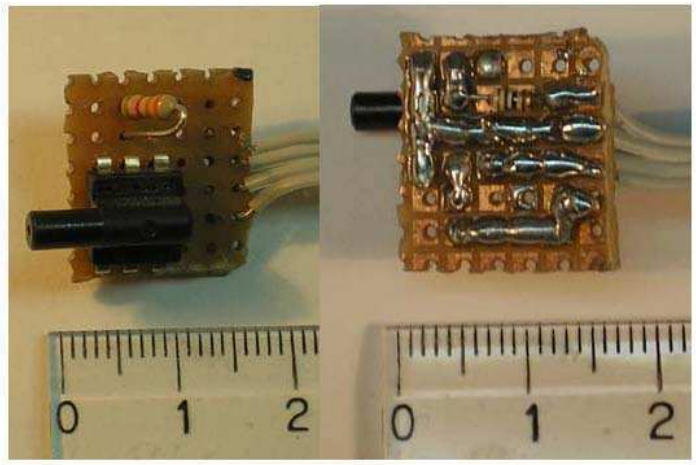

Figura 2.3: Fotografía del sensor de presión montado sobre la placa, visto desde arriba y desde abajo. El cable lleva la alimentación externa (+12 volts y tierra) y las señales de salida de sensor que se conectan a la primera etapa de amplificación

Un in-amp, entonces, amplifica las diferencias entre los voltajes de entrada mientras que rechaza cualquier señal que sea común a ambas. Así, un in-amp es una herramienta que permite extraer pequeñas señales de, por ejemplo, algún tipo de transductor. Funcionando en rechazo del modo común, un in-amp debería ser capaz de amplificar señales del orden del microvolt y rechazar voltajes comunes a las entradas. Todo esto convierte al amplificador in-amp en el equipamiento óptimo para la amplificación de las señales de los transductores de presión cuya señal a la salida es del orden de 10 milivolts, montado sobre un nivel de continua de 2.5 volts.

Dentro de los modelos disponibles en el mercado, para esta primera etapa de amplificación, elegimos utilizar el amplificador instrumental AD620AN, en su presentación de paquete dual en línea (DIP) de 8 patas o terminales. El circuito de la etapa de amplificación —utilizando el amplificador in-amp AD620AN— puede verse en la figura 2.4 junto con el diagramas de conectores del in-amp. El circuito de amplificación se alimentó con una fuente de 12 volts, como se expone seguidamente.

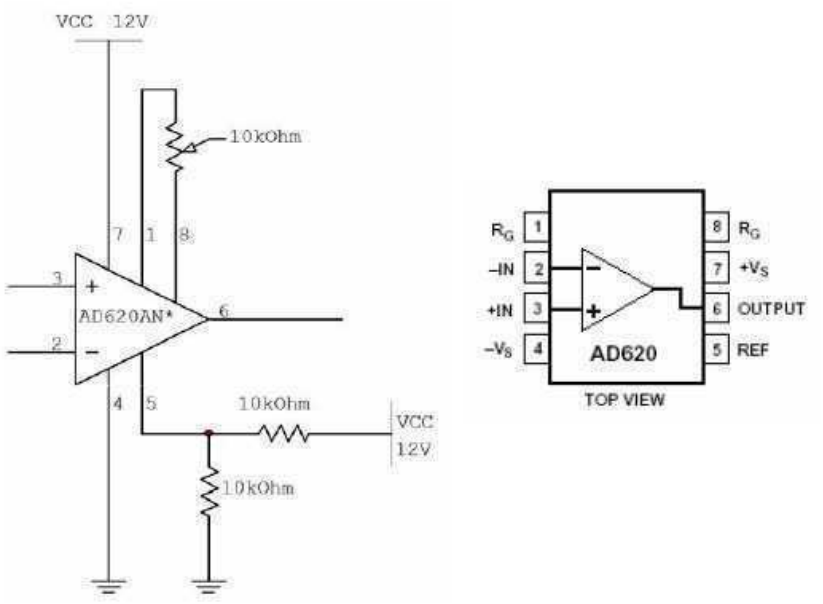

Figura 2.4: Circuito de la primera etapa de amplificación y diagrama de conectores del amplificador instrumental AD620

Las entradas del amplificador, patas 2 y 3, se conectaron a las patas de sali-da del sensor, respetando las polaridades de ambas. La pata 5, de referencia, se conectó a un divisor de tensión conectado a 12 volts, utilizando resistencias de 10 $k\Omega$. Entre la pata 1 y 8 se conectó una resistencia de ganancia variable. La salida, pata 6, se conectó a la siguiente etapa de amplificación. El circuito descripto se basó en las especificaciones brindadas dadas por el fabricante para necesidades de "instrumentación\medicina" (Kitchin and Counts., 2004).

La segunda etapa de amplificación tiene dos objetivos: a) amplificar aún más la señal y b) mediante un divisor de tensión ajustar el nivel de continua de la señal, de modo tal que ésta sea positiva a los fines de facilitar la programación, para así recuperar la señal digitalmente. En esta etapa preferimos utilizar un op-amp, en particular el modelo TL082A. En la figura 2.5 se muestra el circuito de esta etapa.

El amplificador se alimentó con $\pm$ 12 volts. La señal de entrada se conectó a un divisor de tensión, seguido de una resistencia 10 kΩ, seguido de con un potenciómetro de 10 kΩ que fue alimentado entre -12 volts y tierra, todo lo que permitió restar una señal de continua a la señal de entrada. De este modo, fue posible eliminar el nivel de continua que entrega el sensor

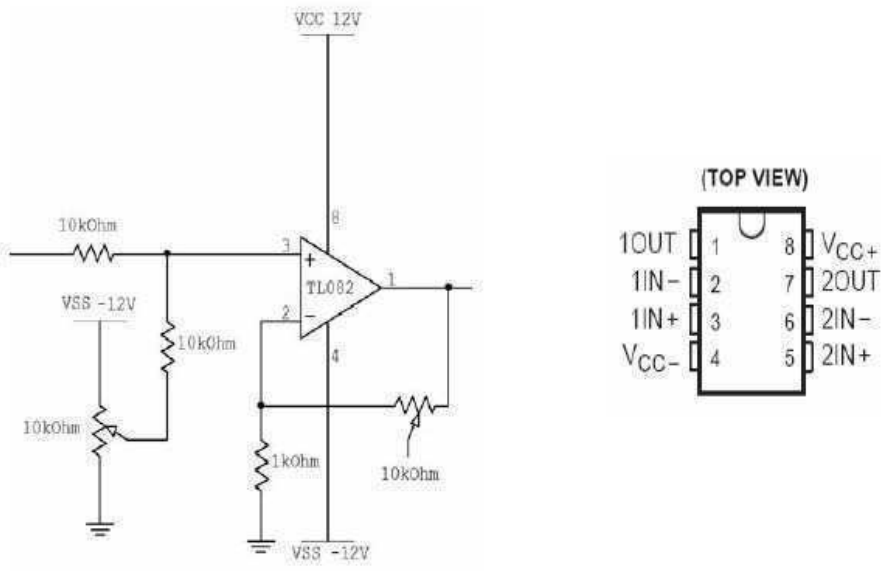

Figura 2.5: Segunda Etapa de amplificación y diagrama de conectores del TL082A

antes de la amplificación, amplificando solamente las variaciones de la señal de presión, que nos interesa.

En la entrada inversora se colocó otro divisor de tensión formado por una resistencia de 1kΩ, seguida de una resistencia variable de 10 kΩ, para, de ese modo, poder ajustar la ganancia. Así, se consiguió que la señal de presión fuera amplificada y que se montara sobre una señal de continua que pueda ser controlada. El control del nivel de continua y de la amplificación son necesarios para contrarrestar las variaciones del nivel respiratorio de los distintos canarios. Llamaremos a la salida de esta etapa *Monitor*.

Para la adquisición de la señal del transductor contamos con una placa de adquisición MAYA 1010, que trabaja con una frecuencia de digitalización de 44.1 kHz. Esta placa tiene ocho canales, lo que permite la adquisición de, cómo máximo, ocho señales. Esto posibilita que al mismo tiempo se registre la presión de los sacos aéreos y el sonido del canto. Esta placa fue diseñada para adquirir señales de sonido, típicamente del orden de los kHz. La frecuencia de la respiración normal de los canarios es del orden de los 5 Hz y durante el canto puede llegar hasta 30 Hz. En este rango de frecuencias la placa MAYA 1010 presenta distorsiones en la adquisición, lo que hizo necesario que se implementara un circuito multiplicador que funcionara como un modulador de amplitud modulada (AM), para así completar el condicionamiento de la señal en lo que hemos denominado *Monitor*, previamente a su entrada en la placa MAYA 1010.

Como base del descripto circuito modulador se utilizó, en este caso, un

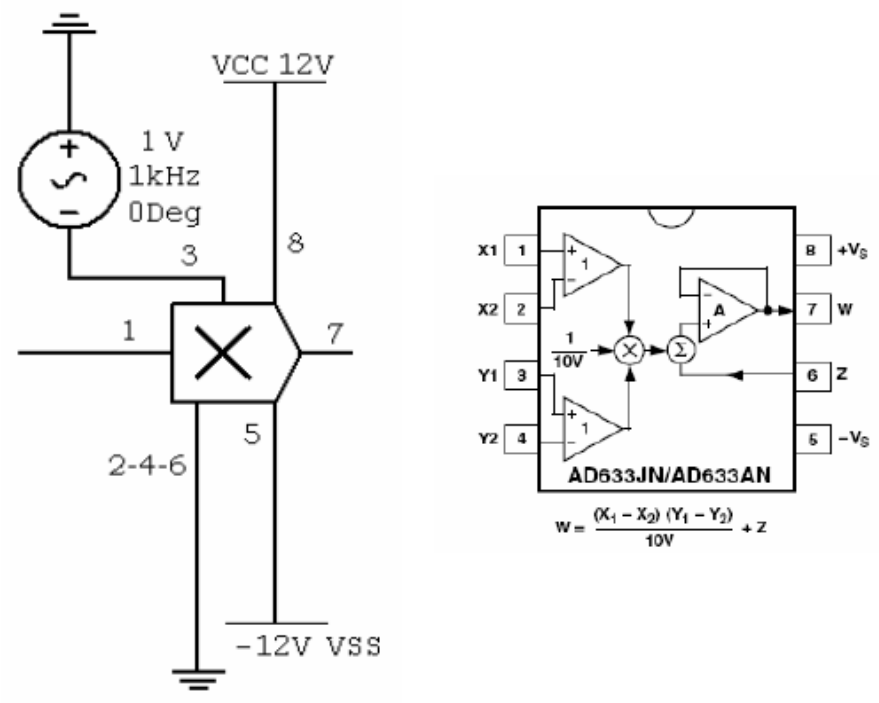

Figura 2.6: Etapa de multiplicación y diagrama de conectores del multiplicador AD633

multiplicador analógico el AD633 —en su presentación DIP de 8 patas o terminales— y, como señal portadora, se utilizó una señal sinusoidal de 1kHz de un volt de amplitud pico a pico, logrando así que la señal de presión module la señal portadora. Se obtuvo una señal modulada emitida en el rango de frecuencias para las que está optimizada la placa MAYA 1010. La salida de la placa MAYA 1010 se conectó a una computadora para grabar la señal de presión.

Una vez adquirida la señal de presión con la PC, se la debíó demodular para obtener la señal original. Esto se realizó mediante una rutina en el programa MATLAB, basado en un circuito RC, es decir un filtro pasabajos. Para esta operación se determinó que la frecuencia de corte fuera de 47 Hz, aproximadamente. En la figura 2.6 se muestra el circuito eléctrico de esta etapa. Se alimentó el multiplicador con ± 12 volts; la señal de salida de la segunda etapa y la señal moduladora se conectaron a las patas 1 y 3 respectivamente, mientras que las patas 2, 4 y 6 se conectaron a tierra. La salida, la pata 7, se conectó a una última etapa de amplificación, en la que nuevamente se utilizó el segundo op-amp del TL082A. La señal proveniente del multiplicador ingresó en la pata no inversora y, en la pata inversora se colocó un divisor de tensión formando por una resistencia de 1kΩ y una resistencia variable de 10 kΩ, con el fin de controlar la ganancia global.

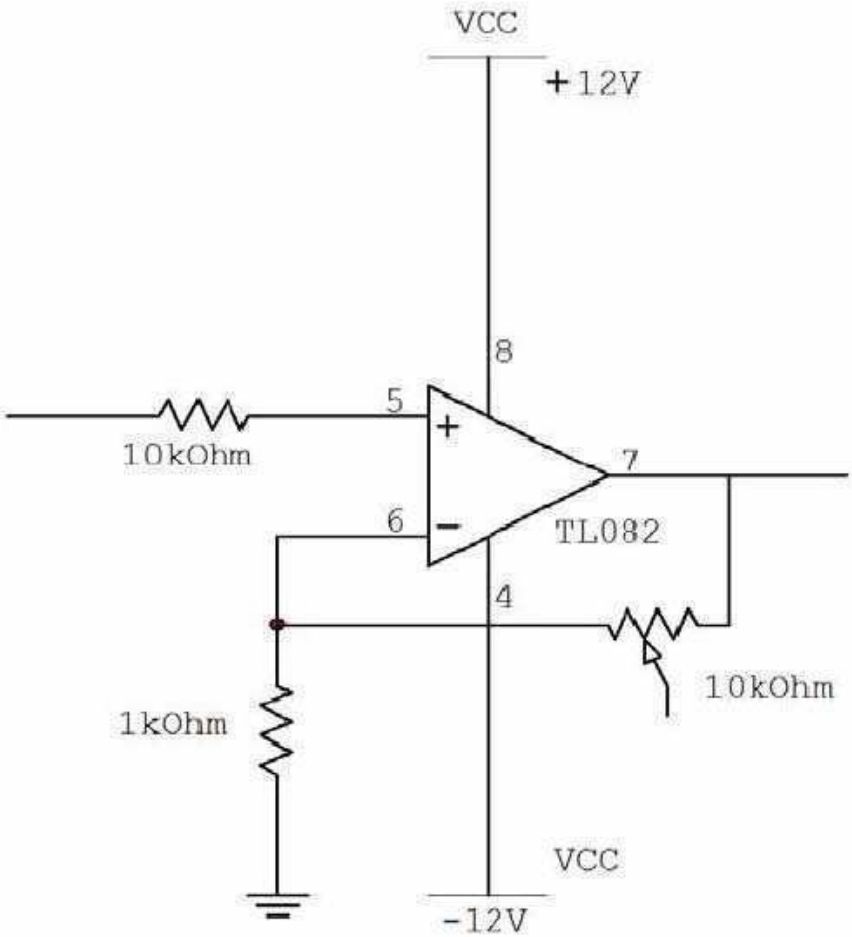

Figura 2.7: Última esta de amplificación

Finalmente, la salida de esta amplificación se conectó con la placa MAYA 1010 que permite la adquisición de la presión de los sacos aéreos en la PC. El circuito de esta última etapa de amplificación se ve en la figura 2.7

Para el procedimiento descripto también podría haberse utilizado, como placa de adquisición, la National Instruments, NI PCI-6251, en sustitución de la utilizada MAYA 1010 —que como se dijo, no está optimizada para adquirir señales de baja frecuencia—, equipamiento que, al momento de realizarse la toma de datos, no estaba disponible.

La placa de adquisición National Instruments, NI PCI-6251 no presenta problemas a la hora de adquirir señales de baja frecuencia, por lo tanto, si se la utilizara en un trabajo como el que nos ocupa, no resultaría necesaria la etapa de modulación anteriormente descripta. En caso de utilizarse esta

placa, se podría adquirir directamente la señal del *Monitor*

2.2. Adquisición del sonido

Frente a cada jaula se colocó un micrófono (TAKSTAR SGC 568) para grabar el canto producido, conectándolo a un preamplificador para micrófono de 4 canales(PR4V SM pro audio). La señal preamplicada del micrófono, se adquirió, conectado la salida del preamplificador a la placa de sonido MATA 1010 o la placa NI-DAQmx —alternativamente, dependiendo de las disponibilidades de equipamiento—, utilizando en ambos casos frecuencia de sampleo de 44.1 kHz.

Corresponde aquí destacar que cuando se graban sincrónicamente el sonido y la presión, ambas señales se deben adquirir con una única placa (ya sea la Maya 1010 o la NI PCI-6251). Tanto para la obtención de los datos de presión y\o el sonido se utilizaron diversos programas comerciales. Se utilizó el *software Avisoft* RECORDER de *Avisoft Bioacoustics*, programa que permite monitorear múltiples canales, y fijar un valor umbral de señal, superado el cual comienza la grabación de los datos. También se utilizó una rutina para obtener datos implementada en el entorno de Matlab *The MathWorks, Inc.*

2.3. Conexión del sensor a los sacos aéreos

El acceso a los sacos aéreos se logra mediante la inserción de una cánula a través de la pared abdominal, justo debajo de la última costilla del sujeto. Se utiliza un catéter endovenoso (Venisystems, Abbocath©-T G715-A01 18G, diámetro exterior 1.3 mm., diámetro interior 1.0 mm.) o un tubo flexible (Silastic laboratory tubing, diámetro exterior 1,65 mm y diámetro interior 0,76 mm).

La cánula se inserta unos poco milímetros dentro del saco aéreo torácico anterior. El extremo libre de la cánula se conecta al sensor de presión. Una vez que se comprueba la penetración del saco aéreo observando la señal que se emite en *Monitor*, a través de un osciloscopio, la cánula se fija al canario con un punto de sutura y con una gota de adhesivo instantáneo a base cianoacrilato. El hilo de sutura utilizado es 6-0 mononylon ethilon de aguja curva de 13 mm.

Para conectar la cánula al transductor de presión, en razón de sus diversos diámetros, es necesario implementar empalmes de tubos plásticos de diámetro creciente, hasta llegar al de la entrada del sensor, si se utilizara el catéter endovenoso. En caso de utilizarse el tubo flexible se lo puede conectar directamente al transductor de presión.

Inicialmente, el sensor de presión se montaba en una lámina de plástico para colocarlo sobre la “espalda” del canario sostenido mediante una mochila

Figura 2.8: Fotografía de un canario con la mochila puesta

de velcro que se sostiene con unas pequeñas cintas ajustadas en las alas. El canario con la mochila puede verse en la siguiente figura 2.8. El sensor junto con la placa pesa 3,5 gr. aproximadamente.

En la lámina de plástico se montaban también las resistencias del circuito de alimentación del sensor, que aumentaban el peso de la mochila. Para mejorar la comodidad del sujeto, se rediseñaron las conexiones del circuito de alimentación del sensor, quitándolas de la mochila, y llevando las aludidas resistencias al lugar en que emplazaba originalmente el circuito de condicionamiento de la señal y amplificación, dentro de un gabinete.

Para la operación en la que se coloca la cánula, el ave es anestesiada mediante una inyección de Midazolam y Ketamina (Paul-Murphy and Fialkowski, 2001) con el siguiente protocolo. Se prepara una mezcla de Midazolam o Xilacina con solución salina en una proporción de 1:9 y otra mezcla de Ketamina también con solución salina en una proporción de 1:19. Luego se prepara una jeringa con 0.32 ml de la solución con Ketamina y 0.1 ml de la solución con Midazolam. La anestesia se inyecta intramuscularmente en el pecho del ave, específicamente a un costado de la quilla, en los músculos pectorales. Se requieren aproximadamente diez minutos para que la anes-

tesia haga su efecto completamente. Una vez que el pájaro se encuentra completamente dormido, se procede a la colocación de la cánula como se describió en el párrafo anterior.

En caso de que la anestesia no fuera suficiente para dormir al ave, se puede inyectar un refuerzo del anestésico en la misma proporción. Una vez finalizada la operación, el canario se recupera luego de transcurridas, aproximadamente, dos horas.

En trabajos anteriores, (Mendez et al., 2006), se utilizaba en las misma proporciones una mezcla de Xilacina y Ketamina. La solución de Midazolam y Ketamina muestra niveles de anestesia equivalentes a la solución de Xilazina y Ketamina, pero con ella se ha observado en el canario y en el diamante mandarín que el tiempo de recuperación es menor que el requerido con la anestesia usada en esos trabajos previos.

2.4. Los canarios

El canario (*Serinus Canaria*) es un ave perteneciente al orden de los passeriformes, suborden oscinos. Es un pájaro originario de las Islas Canarias y Madeira al que se lo ha domesticado desde el año 1600. En la naturaleza su color es verde y gris aunque durante tantos años de cría se ha ido modificando su color según la preferencia de sus criadores. Es un ave pequeña, de 14 a 16 cm de longitud y 16 a 20 gr de peso. La producción del canto en esta especie está diferenciada sexualmente, estando reservada mayoritariamente a los machos. Como hemos dicho en la introducción el aprendizaje del canto en los canarios presenta distintas fases: una sensitiva, una sensora-motora y finalmente la obtención de un canto cristalizado.

La exposición al canto de un tutor, la producción de un canto lábil, moldeable y la retroalimentación auditiva son importantes para la adquisición y producción del canto adulto. Es de esperar que diferentes protocolos de aprendizaje se consoliden y presenten diferencias. Sin embargo, el canto de los canarios presenta características propias que nos permiten identificarlo como tal. Es decir que a pesar de los distintos aprendizajes, existen elementos que son comunes a todos los canarios. Si bien esto se ha caracterizado en las características acústicas (Lehongre et al., 2008), no se sabe qué es lo que sucede respecto de los gestos motores responsables de la generación del canto. Resulta interesante conocer si los gestos motores, en particular los gestos respiratorios, presentan similitudes entre distintos animales que hayan sido sometidos a distintos protocolos de aprendizaje y que hayan escuchado a distintos tutores. Para verificar la existencia de patrones de presión comunes a diferentes canarios sometidos a distintos experiencias durante su aprendizaje, se utilizaron canarios adultos (entre uno y tres años de edad), comprados a distintos criadores, lo que aseguró que estos canarios adultos no hubieran compartido al tutor.

Una vez que se tuvo una base de patrones de presión producida por canarios adultos, se comenzó la siguiente etapa en la que se trabajó con canarios juveniles. En la etapa sensorial-motora el canto producido por los juveniles es lábil y no presenta la repetición de sílabas, característica típica del canto de un canario adulto. El periodo de práctica se extiende por varios meses, en los que el canto va evolucionando hasta que en la primavera siguiente, en la primer época de reproducción, el juvenil produce un canto adulto. La exposición de las canarias —que usualmente no cantan— a testosterona da como resultado que ellas produzcan un canto similar acústicamente al de un macho adulto (Nottebohm, 1980; Mendez et al., 2006). Asimismo juveniles tratados con testosterona rápidamente, alrededor de 15 días después de iniciado el tratamiento, producen un canto similar al de los adultos(Gardner et al., 2005). Sin embargo, no se conoce qué es lo que sucede con las instrucciones motoras en este caso, en particular con los gestos respiratorios. Es pertinente, entonces, estudiar los gestos de presión en juveniles tratados con testosterona. El tratamiento consistió en tratarlos tópicamente con testosterona: $300mg$ de testosterona en gel al 1 % (Androlone, Laboratorios Beta). Esta dosis se aplicó, diariamente, a partir de los 60 días edad y se mantuvo durante la totalidad del experimento. En trabajo anteriores (Mendez et al., 2006) este tratamiento fue exitoso en inducir canto similar al de los canarios adultos machos en canarios hembras adultas.

Todos los pájaros utilizados en este trabajo fueron alojados en jaulas individuales de (30x25x30 cm^3) y se los alimentó con una mezcla de semillas y agua. El alimento y el agua se ofreció ad líbitum y el fotoperíodo estuvo controlado, de modo tal que los pájaros estuvieran expuestos a 14 horas de luz y 10 de sombra (noche). De este modo se simuló la longitud de los días de primavera-verano, que es la época del año en que los machos aumentan la frecuencia en la producción del canto.

En la primer etapa del trabajo se trabajó con 5 canarios adultos, comprados a distintos criadores. Nos referiremos a este conjunto de animales como grupo I. En la segunda etapa del trabajo se adquirieron 11 juveniles y se utilizaron 2 juveniles criados en el laboratorio, descendientes de los adultos adquiridos en la primer etapa. Los juveniles fueron divididos en dos grupos, grupo II y grupo III, formados por cinco y ocho pájaros respectivamente. Los individuos pertenecientes al grupo II fueron tratados con testosterona, como se describe más arriba, mientras que los individuos del grupo III formaron el grupo de control.

2.5. Gráficos de recurrencia

En el campo de la dinámica no lineal, existe una herramienta particularmente apropiada para investigar recurrencias temporales que se presenten en una serie temporal. Esta técnica se conoce como gráficos de recurrencia

(llamados close returns en la literatura (Gilmore, 1998)) que son una representación gráfica de las recurrencias presentes en una señal temporal. Para construir estos gráficos, la serie temporal a analizar se guarda en un vector $v[i]$, $i = 1, \cdots, n$ donde n es el número de muestras. Luego se calcula la distancia $d(i,p)$ entre los valores $v[i]$ y $v[i+p]$ como $d(i,p) = |v[i] - v[i+p]|$ para valores enteros de (i,p). Cuando esta distancia es menor que un cierto valor umbral, se dibuja un punto en las coordenadas (i,p). De este modo, una señal aproximadamente periódica se verá reflejada en el gráfico de recurrencias como una línea recta, con una longitud proporcional al tiempo en el que la señal se mantiene casi periódica.

2.6. Envolvente del sonido

Para obtener la envolvente del sonido producido durante el canto de un canario, los datos fueron filtrados mediante un filtro digital pasabajos. Se tomó como frecuencia de corte a 60 Hz. El filtro digital fue implementado mediante una rutina escrita en el entorno de MATLAB (MATLAB, The MathWorks, Natick, MA). El filtro implementado está basado en un algoritmo que emula un circuito RC integrador. Para evitar que la aplicación del filtro introdujera una fase entre la envolvente del sonido y el sonido mismo, se procedió de la siguiente manera: se filtraron los datos experimentales, luego se inviertió temporalmente la señal filtrada y se volvió a filtrar utilizando el mismo filtro usado anteriormente.

Al resultado de este último filtrado se lo volvió a invertir temporalmente obteniendo la envolvente del sonido que corresponde exactamente con el sonido mismo.

La serie temporal de la envolvente del sonido se guardó para un análisis posterior.

2.7. Criterio de similitud de los gestos de presión

Para cuantificar la similitud entre los gestos de presión, procedimos como se describe a continuación. Primero definimos dos vectores en los que se almacenan los valores de los gestos de presión a comparar. Llamemos a esos vectores a $x[i]$ e $y[i]$, donde $i = 1, \cdots, n$ donde el cociente entre n y la frecuencia de sampleo es la duración del gesto de presión. Luego se grafica $yvs.x$ y a este gráfico (series de datos) se le realiza una regresión lineal. Los gestos respiratorios se consideraron similares cuando se cumplieran los dos criterios siguientes. La primer condición que pedimos es que la pendiente, m, obtenida por la regresión lineal difiera de uno, en menos de cierto valor umbral, i.e $|m-1| < \epsilon$. La segunda condición que pedimos es que la distancia euclídea entre ambos vectores sea menos que otro valor umbral, i.e $D = \sqrt{\sum_{i=1}^{n}(x[i] - y[i])^2} < \delta$. Los valores de ϵ y δ se asignaron de modo tal que

el programa produjera un agrupamiento en clases con base a la similitud, aproximando al que se obtendría realizando dicho agrupamiento mediante inspección directa. Los valores de obtenidos en este caso fueron $(\epsilon, \delta) = (0{,}06, 3{,}5)$.

Capítulo 3

Patrones respiratorios en adultos

3.1. Similitud de patrones respiratorios

3.1.1. Estado de materia

Como hemos mencionado, el canto de los canarios se compone de la repetición de diferentes sílabas tonales. Esta repetición de sílabas se organiza en forma de frases y la combinación de diferentes frases es lo que forma el canto. Dicho de otro modo, el canto de los canarios está formado por la repetición de sílabas estereotipadas que forman una unidad reconocible a la que denominaremos frase (Gardner et al., 2005; Lehongre et al., 2008).

La alternancia entre distintas frases es lo que forma el canto de los canarios. Se puede clasificar a las sílabas que componen las frases de acuerdo a su duración, al rango de frecuencias que barren y a la frecuencia de su repetición, lo que llamamos frecuencia silábica. A grandes rasgos, la duración de las sílabas va de 10 a 300 milisegundos (Hartley and Suthers, 1989). En punto a la frecuencia que barren, podemos distinguir tres tipos de sílabas: aquellas en las que la frecuencia del sonido evoluciona en el tiempo de manera ascendente (en inglés *upsweep*), aquellas en las que lo hace de manera descendente (en inglés *downsweep*) y aquellas que mantienen una frecuencia constante (ver Figura 3.1). La frecuencia de repetición de las sílabas puede variar entre 3 y 60 Hz. Como consecuencia del modo de adquisición del canto de las especies que nos ocupan, vinculado con la imitación, resulta esperable que se verifique similitud de sílabas en cuanto a los parámetros descriptos —ya que ellos constituyen las características del canto y pueden ser aprendidos—, cuando ellas provengan de tutores y sus discípulos, o de canarios que convivieran o compartieran tutor, es decir, que compartieran protocolos de aprendizaje.

3.1.2. Obtención de una muestra completa de repertorio

Hemos observado que algunas de las sílabas que presentan las similitudes anteriormente mencionadas provienen de canarios que no han compartido el tutor durante el período de aprendizaje, o que no han convivido. La mencionada observación se realizó al grabar cantos de distintos canarios en el laboratorio. El proceso de adaptación de cada canario al nuevo hábitat que el laboratorio constituye, si hablamos de canarios no criados en él, involucra los primeros tres días de su estadía, en los que típicamente el ejemplar sólo produce llamadas y no un canto completo. En esta etapa, el trabajo con el ejemplar consiste en mantenerlo limpio y observar que se alimente correctamente. La renovación de la comida, el agua y la limpieza de la jaula se realizan en forma diaria.

Una vez que el canario comienza a producir canto, se lo coloca frente a un micrófono, como se describe en la sección 2.2, de modo de conseguir una muestra completa de de su repertorio de sílabas. Durante este proceso el trabajo con el ejemplar también involucra la configuración de los umbrales de la señal en el programa *Avisoft RECORDER* para la obtención de los datos y evitar grabaciones espurias. Las sesiones de grabación duran entre cuatro y seis horas diarias, dependiendo de la producción de canto del ejemplar.

Las grabaciones se almacenan en archivos de formato WAV, apócope de *WAVEform audio format*,que es un formato de audio digital normalmente sin compresión de datos desarrollado por y propiedad de Microsoft e IBM, y es el que se utiliza para almacenar sonidos en el disco rígido. El sonido se guarda en un archivo al que denominamos *serie temporal* y en cada archivo se tiene la evolución en el tiempo del sonido.

El análisis del sonido se realiza a través de los sonogranas, técnica que permite una representación espectro-temporal del sonido. El eje horizontal del sonograma corresponde al tiempo y el eje vertical a la frecuencia. Una tercera dimensión está caracterizada por el color: en una escala de grises, las zonas más oscuras del sonograma corresponden a regiones con más alta energía. Se utilizó el programa PRAAT de Paul Boersma y David Weenink que es de distribución gratuita (http://www.fon.hum.uva.nl/praat/). Se analizaron diez cantos completos de al menos diez segundos de duración por cada ejemplar, en los que se pudo observar la repetición de sílabas similares provenientes de ejemplares con distintos protocolos de aprendizaje.

No obstante la exposición al canto del tutor, el proceso de vocalización no comienza hasta que el pájaro es capaz de generar una presión respiratoria lo suficientemente alta para permitir que el flujo de aire inicie las oscilaciones de los labios de la siringe, en un proceso similar al de los seres humanos cuando producen vocalizaciones voceadas, produciendo así las distintas sílabas. La generación de las sílabas está altamente correlacionada con la respiración y los gestos de presión en los sacos aéreos.

Los canarios tienen una capacidad respiratoria pequeña, acorde a su

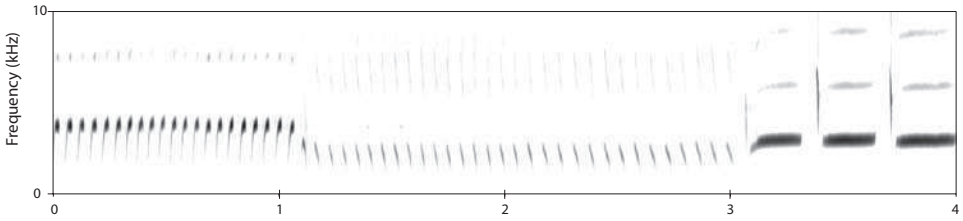

Figura 3.1: Sonograma de un canto de un canario adulto. El primer tipo de sílabas son *upsweeps*, las segundas son *downsweeps* y el tercer tipo de sílabas la mayor parte de la misma es de frecuencia constante.

tamaño — 20 gr. es el peso de un canario promedio —. No obstante, algunos cantan continuamente durante unos 20 segundos. Al tratar de descubrir cómo se realiza tal proeza sin quedarse sin aire, se encontró que existe una compresión y expansión cíclica del tórax, en sincronía con cada sílaba, sugiriendo que la expiración requerida para producir una nota, es inmediatamente seguida por una pequeña inspiración, "mini inspiración", antes de la próxima nota (Hartley and Suthers, 1989).

Atendiendo a la frecuencia de repetición silábica, se puede dividir a las sílabas en dos grandes grupos: el de las sílabas cuya frecuencia de repetición es menor que $30Hz$, y el de las sílabas cuya frecuencia es mayor a dicho valor. Si la frecuencia de la repetición de las sílabas es menor que $30Hz$, luego del pulso espiratorio con el que se genera la sílaba se produce una **mini inspiración**, (*minibreath* en inglés) que reemplaza el volumen de aire exhalado. En cambio, para frecuencias silábicas entre $30-60Hz$ se abandona el patrón motor de las mini inspiraciones por el de una respiración pulsátil. La respiración pulsátil tiene lugar cuando el aire exhalado en la fonación no se reemplaza al finalizar cada sílaba a diferencia de lo que sucede en las mini inspiraciones. En términos de estos gestos, distintos tipos de sílabas se producen con gestos de presión diferentes. En la mini inspiración los músculos espiratorios del sistema respiratorio se contraen para generar pulso, y los inspiratorios expanden el tórax para recuperar el aire exhalado, antes de la próxima sílaba. Durante la respiración pulsátil, los músculos espiratorios mantienen una presión (por encima del nivel de la inspiración) y el tiempo de cada sílaba está determinado por el de fluctuaciones que se producen sobre ese nivel sostenido de presión (Suthers, 1997). En términos de los gestos de presión de los sacos aéreos, diferentes tipos de sílabas se corresponden con distintos patrones respiratorios (Hartley and Suthers, 1989).

Ambos tipos de respiración y de gestos de presión están presentes en las sílabas que conforman la canción adulta estereotipada, típica de los canarios. Como se ha dicho, ellos se observaron en distintos sujetos que no compartieron protocolos de aprendizaje, en el laboratorio.

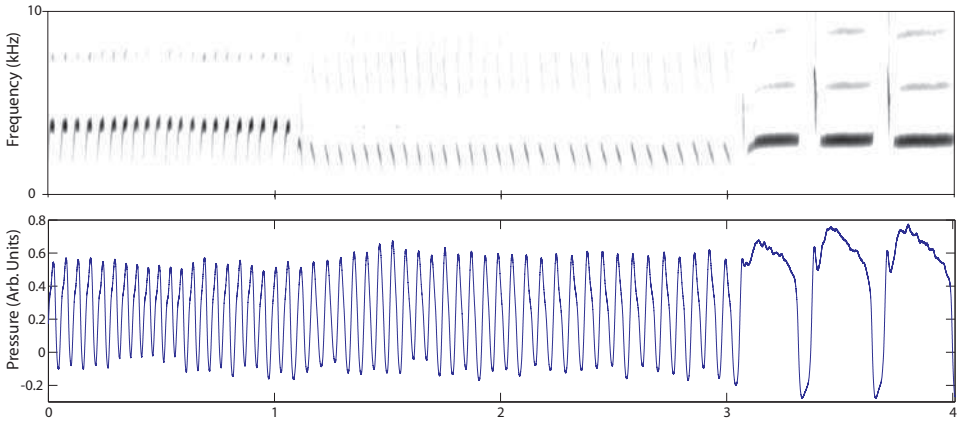

Figura 3.2: En el panel superior se muestra el mismo sonograma anterior. En el panel inferior se muestran los gestos respiratorios utilizados en la producción de las sílabas que se ilustran en el panel superior

3.1.3. Obtención de los gestos de presión

Obtenida una muestra completa que presenta la mayor diversidad de sílabas del repertorio de un ejemplar, se procedió a la inserción de una cánula en uno de los sacos aéreos abdominales como se describe en la sección 2.3. Se retira el alimento del ejemplar a canular una hora antes de realizar el procedimiento. Asimismo se debe preparar con anticipación la anestesia, y tener lista la cánula a insertar en el ave. El procedimiento de la inserción de la cánula dura aproximadamente 30 minutos, los primeros 10 se necesitan para que la anestesia haga su efecto y el ave quede sedada completamente. Luego de insertada la cánula se la conecta a un sensor de presión para controlar que efectivamente se haya llegado a saco aéreo y se observa la señal del sensor de presión en un osciloscopio (Tektronix TDS 5052). Una vez que se observa la señal deseada se finaliza el procedimiento fijando la cánula con un punto de sutura y una gota de adhesivo instantáneo a base de cianoacrilato. Todo el procedimiento se realiza sobre una almohadilla térmica a fin de evitar que el ave sufra de hipotermia. Finalizado el procedimiento el ave se devuelve a su jaula en donde se lo calefacciona mediante una lámpara. Generalmente el pájaro se despierta de la anestesia dos o tres horas luego de la operación. Durante este lapso es necesario vigilar al ave cada media hora a fin de controlar su correcta evolución. Destaquemos que la inserción de la cánula se debe realizar por la mañana a fin de que el ave se despierte de la anestesia en un horario diurno y pueda regularizar su alimentación.

El pájaro vuelve a cantar uno o dos días después de la inserción de la cánula. La cánula se conecta al sensor de presión que se coloca en la mochila de velcro en la espalda del canario, y se finalmente se conecta a la placa de adquisición a fin de adquirir los datos de presión antes de iniciar cada sesión de grabación. Se coloca el micrófono delante de la jaula conectado a

otro canal de la placa de adquisición. Así se adquieren en forma sincrónica el sonido y el gesto de presión durante la producción del canto. La sesiones de grabación conjunta de presión y sonido duran entre 4 y 6 horas diarias. La posibilidad de adquirir los gestos de presión está limitada como máximo a las dos semanas posteriores a la canulación. Ese es el tiempo que suele tardar la cánula en taparse, a raíz del proceso natural de recuperación de los tejidos del saco aéreo. En este caso se determina, en el programa de adquisición, que la grabación comience cuando la presión supere cierto valor umbral, evitando así grabaciones espurias. Durante estas grabaciones hay que revisar, cada media hora, que los cables de conexión del sensor no estén enredados, dificultando la movilidad del canario.

Con este procedimiento se obtuvieron gestos de presión de 5 canarios adultos. Los datos obtenidos también se guardan en el disco rígido en formato WAV. El sonido y la presión se obtienen como archivos separados, que constituyen cada uno una serie temporal, que representa un canto de al menos 10 segundos de duración.

3.1.4. Comparación de series temporales de presión. Construcción de una base de patrones.

Con el criterio de similitud de gestos de presión descripto en el apartado 2.7 fue posible observar que los gestos respiratorios pueden agruparse en distintas clases, dependiendo de la forma de la oscilación que se obtuvo al graficarlos. La clave del reconocimiento de esas clases es que las sílabas acústicamente similares que el canario repite en su canto se corresponden con gestos respiratorios estereotipados. En cada serie temporal de los gestos de presión asociada al canto se determinaron los pulsos espiratorios que están asociados a una sílaba. Estos se identifican como la espiración entre dos mínimos consecutivos de presión. Luego, cada uno de los pulsos de presión asociados a una sílaba se compararon con todos los que se producen en la totalidad del canto de un ejemplar. En la producción total de canto de cada individuo se reconocieron distintos gestos que el sujeto repetía en los distintos cantos que realizaba.

Recordemos aquí que dos pulsos espiratorios se consideran equivalentes, si, al graficarlos uno como función del otro, la relación entre ambos puede aproximarse por una función lineal cuya pendiente difiera de uno en menos que cierto valor ϵ. Mediante esta técnica se analizaron al menos diez cantos de 10 segundos para cada canario.

En un canto podemos comparar todos los gestos realizados entre sí de visualizar y graficar un punto por cada par de patrones reconocidos como similares. En la figura 3.3a se muestra el gesto de presión producido durante un canto y en 3.3b se observa como los puntos que indican cuando dos patrones se consideran similares se organizan en grupos en forma simétrica respecto de la diagonal.

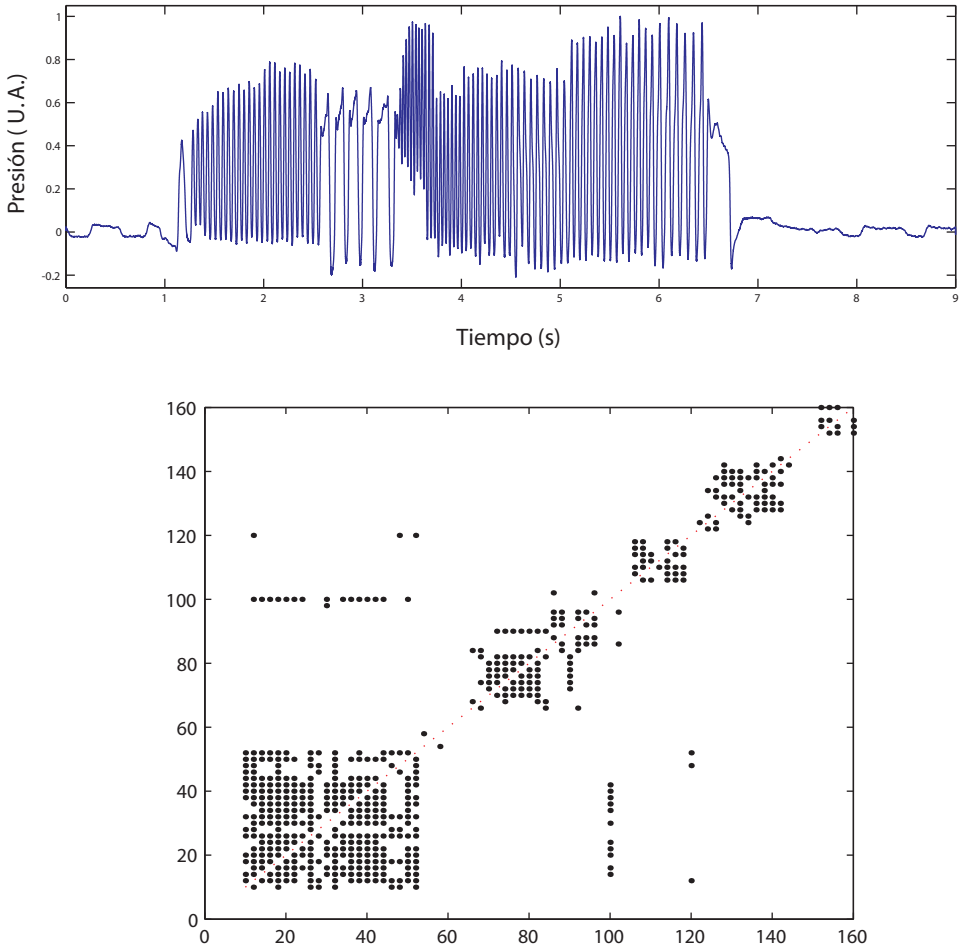

Figura 3.3: a) Gesto de presión de un adulto durante un canto, b) Un punto en la posición (i, j) indica que el patrón i es similar al patrón j

Así, para cada canto podemos extraer un gesto representativo que represente a los patrones de presión empleados. Procediendo de manera análoga con 10 diferentes cantos, se logra encontrar el repertorio completo de los gestos de presión de un canario. Así se procede con todos los canarios adultos. En todos los cantos producidos por los canarios adultos se pudieron observar gestos o patrones de presión que se pueden describir de la siguiente manera.

- el primer patrón se asemeja una oscilación armónica,
- el segundo tipo de patrón presenta dos máximos por período,
- el tercer tipo de patrón que se encuentra genéricamente, consta de un primer pico de presión seguido por un lento decaimiento de su valor de presión,

- el cuarto gesto consiste en oscilaciones rápidas montadas sobre un valor de continua. (ver figura 3.4)

En la figura 3.4 se muestran los patrones respiratorios involucrados en la producción del canto de canarios adultos.

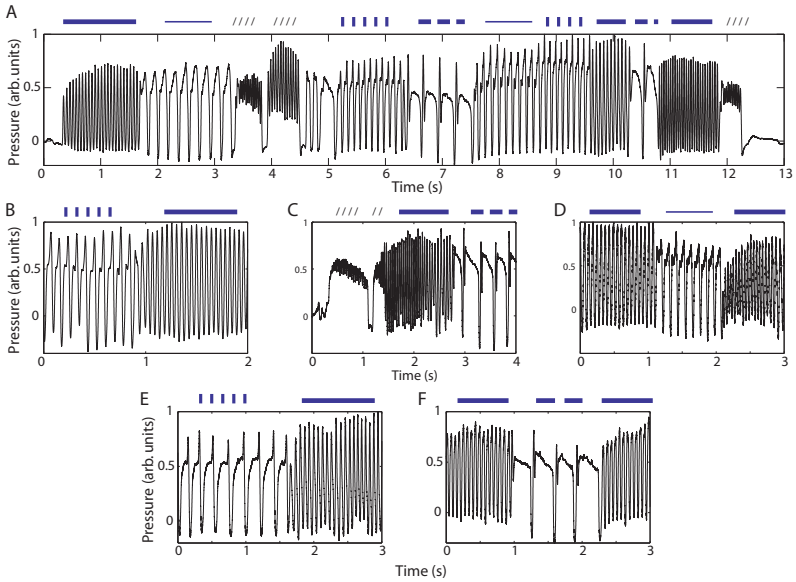

Figura 3.4: En el panel superior se muestran la serie temporal de la presión de los sacos aéreos durante la canción de un adulto (A). Los siguientes 5 paneles (B-F), muestran segmentos de la presión en los sacos aéreos para cantos de 5 canarios adultos. Los segmentos con el mismo tipo de línea arriba de la serie temporal indican patrones de la misma clase. El individuo cuyo gesto de presión se muestra en A presenta las cuatro clases que se encuentran los otros individuos analizados. Es por esta razón que el conjunto de estos cuatro patrones se los considera como una base de los gestos de presión

Se eligió conformar la base de patrones respiratorios de los canarios adultos, con los gestos respiratorios que se muestran en la figura 3.4A. Con el procedimiento descripto anteriormente (ver sección 2.7 y párrafos anteriores) se compararon los gestos de presión de este ejemplar con los gestos de los demás ejemplares de grupo I. De este modo se logró verificar la similitud de gestos de presión entre los individuos del grupo I, canarios adultos sujetos a distintos protocolos de aprendizaje. Al conjunto de patrones prototípicos representativos lo consideramos como una "base" de los gestos de presión en los canarios adultos. Con esta base de patrones individuales se representan los patrones que son comunes a los distintos animales. En este trabajo hemos denominado a los elementos de la base, cada uno de los patrones prototípicos antes descriptos, como P1, P2, P0, P1b respectivamente.

3.1.5. Discretización de las frecuencias silábicas

Como se puede esperar de una simple inspección al gráfico de la serie temporal de la presión, existen intervalos en los que la presión se comporta de manera cuasi periódica. Para encontrar estos intervalos de cuasi periodicidad, utilizamos los gráficos de recurrencia, herramienta de la dinámica no lineal que describimos en el capítulo anterior, (ver sección 2.5), particularmente apropiada para encontrar recurrencias y períodos (o frecuencias) de series temporales. En estos intervalos, un gráfico de recurrencias presentará líneas cuasi horizontales. Sin embargo algo menos evidente se puede observar en estos gráficos de recurrencia: las frecuencias silábicas no son completamente arbitrarias. Por ejemplo, la frecuencia silábica del segundo tipo de sílabas mostrada en la figura 3.5 es tres veces mayor que la de la

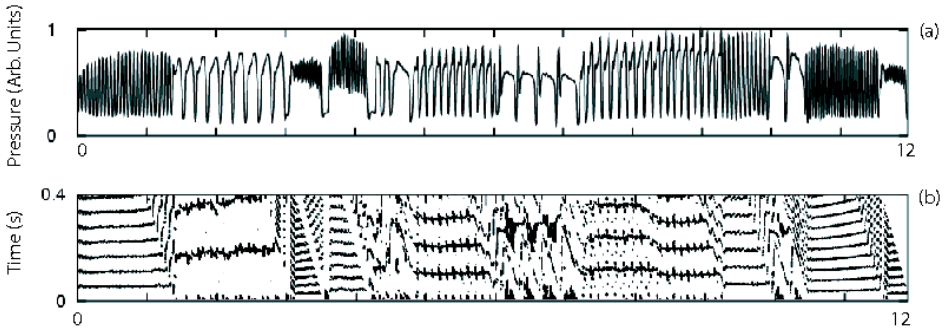

Figura 3.5: El gesto de presión durante un canto completo y su correspondiente gráfico de recurrencias

primer sílaba. Así como encontramos estereotipia en los ritmos entre individuos diferentes, los patrones respiratorios correspondientes a diferentes sílabas presentan características que se encuentran en individuos diferentes.

Así es como dimos el primer paso del primero de los objetivos (1.1.6.1) plateados en la hipótesis de trabajo (1.1.6), toda vez que logramos verificar la existencia de gestos respiratorios que fueran comunes a todos lo individuos del grupo I, aún cuando ellos provenían de distintos protocolos de aprendizaje. La identificación de la similitud de patrones se realizó mediante una técnica sencilla que fue descripta en la sección 2.7 de capítulo anterior.

3.2. Generación sintética

3.2.1. Modelo minimal para la generación de los gestos de presión

Para generar los precisos patrones de presión necesarios para producir el canto, un pájaro, perteneciente al suborden de los oscinos, utiliza una compleja arquitectura neuronal. El sistema motor es un conjunto de núcleos neuronales interconectados (cada uno de ellos formado por unos pocos miles de neuronas) que son indispensables para la generación del canto. Una hipótesis conservadora afirma que un conjunto de patrones de presión que presenta diferentes formas proviene de un sistema también complejo y diversificado. Como alternativa, esta diversidad podría ser entendida como las distintas soluciones que presente, ante distintos parámetros, un único sistema. Si este fuera el caso, el conjunto de las distintas soluciones se vería severamente restringido debido a los mecanismos dinámicos implicados en su generación. El patrón de actividad eléctrica que emerge del sistema motor se traduce, eventualmente, en la actividad de los músculos que controlan los gestos respiratorios. Se han hecho intentos de implementar modelos exhaustivos, es decir modelos que se construyen teniendo en cuenta toda la información neurofisiológica disponible hoy en día (F. C. Hoppensteadt, 1997), para estos sistemas neuronales (Abarbanel et al., 2004). Sin embargo el gran número de neuronas y la complejidad de su red de conexión hacen que su estudio experimental sea difícil. Para testear la hipótesis de que, a pesar de la gran cantidad de grados de libertad en el problema, los patrones medidos son soluciones de un sistema dinámico de baja dimensión, se ha elegido seguir una estrategia diferente. Se construye un sistema dinámico simple cuyas soluciones puedan reproducir a los patrones medidos. Este sistema dinámico es, en algún sentido, mininal: es la forma normal de un campo vector en la vecindad de una singularidad lineal forzada.

Para construir el modelo, observamos uno de los patrones respiratorios de la base, ver Figura 3.6. Este patrón se encuentra en cada canto de cada pájaro analizado. Consiste en un pulso espiratorio largo, asociado con las sílabas emitidas en la frecuencia silábica más baja. La presión comienza cerca del valor promedio de la respiración normal sin canto, rápidamente aumenta hasta que alcanza un valor máximo, que se mantiene por algunos instantes, (típicamente de 200 ms), para finalmente volver a los valores de la presión inicial. Llamaremos al valor inicial de la presión el estado "apagado", mientras que al valor de máximo alcanzado durante la vocalización lo llamaremos el estado "encendido". Hacemos la conjetura de que el sistema dinámico que se busca tiene a estos estados como puntos fijos atractores para diferentes parámetros del sistema . En otras palabras, la situación que proponemos es que el sistema inicialmente está en un equilibrio estable del sistema dinámico buscado (el estado "apagado"). En un momento dado (re-

presentado por (1) Figura 3.6), los parámetros del sistema cambian de tal modo que el estado "apagado" deja de existir y el sistema evoluciona hacia otro atractor (el estado "encendido", representado por (2 en la figura 3.6). Después de que transcurre cierto tiempo los parámetros del modelo se cambian a sus valores originales, el estado "encendido" deja de existir, y el sistema vuelve al punto fijo original que representa el estado "apagado".

Una manera de escribir un sistema dinámico capaz de mostrar tal comportamiento es construirlo de tal modo que presenta una bifurcación cúspide (*cusp bifurcation* en inglés). En esta bifurcación de codimensión dos, (por depender de dos parámetros), dos curvas de bifurcación nodo-silla, se encuentran tangencialmente, en un punto del espacio de parámetro que denomina "punto cúspide". Para una región del espacio de parámetros existen tres puntos fijos: dos atractores, un punto silla. Fuera de esta región del espacio, sólo existe un punto fijo. Si suponemos que nuestro sistema dinámico está cerca del punto cúspide, e inicialmente en parámetros tales que exista un único punto fijo atractor (el estado "apagado"), éste puede saltar a un atractor diferente al mover los parámetros a la zona del espacio de parámetros en la que existen tres puntos fijos. El estado "encendido" nace junto con un punto silla, que colisiona con el estado "apagado" cuando los parámetros se alejan de la zona en la que existen tres puntos fijos. Sin embargo un sistema dinámico de una dimensión no seria el apropiado para reproducir el comportamiento dinámico observado. Nótese que cuando la presión aumenta su valor hacia lo que llamamos el estado "encendido", ésta muestra un par de pequeñas oscilaciones amortiguadas. Entonces podemos conjeturar que el sistema dinámico que estamos buscando sea al menos de dos dimensiones, aun más, el estado que llamamos encendido tiene que ser un atractor que esté, de alguna manera, cerca de una bifurcación de Hopf. En un espacio de parámetros de dos dimensiones, la línea de la bifurcación de Hopf y la línea de la línea de la bifurcación nodo-silla deben encontrarse. Por lo tanto, los parámetros iniciales se eligen de modo que una de la curvas de bifurcación nodo-silla se encuentre con la curva de la bifurcación de Hopf. Construimos la forma normal para esta singularidad lineal como:

$$\begin{aligned} \dot{x} &= y \\ \dot{y} &= x^2 - xy - x^3 - x^2 y, \end{aligned} \tag{3.1}$$

que es la forma normal de la bifurcación de Takens-Bogdanov. Aquí incluimos términos de tercer orden para permitir la existencia de tres puntos fijos. Los signos en la forma normal garantizan la existencia de una bifurcación de Hopf supercrítica y la existencia de dos puntos fijos en cuyo comportamiento se despliega al variar los valores de los parámetros

Sostenemos que los distintos estados que muestra este sistema se alcan-

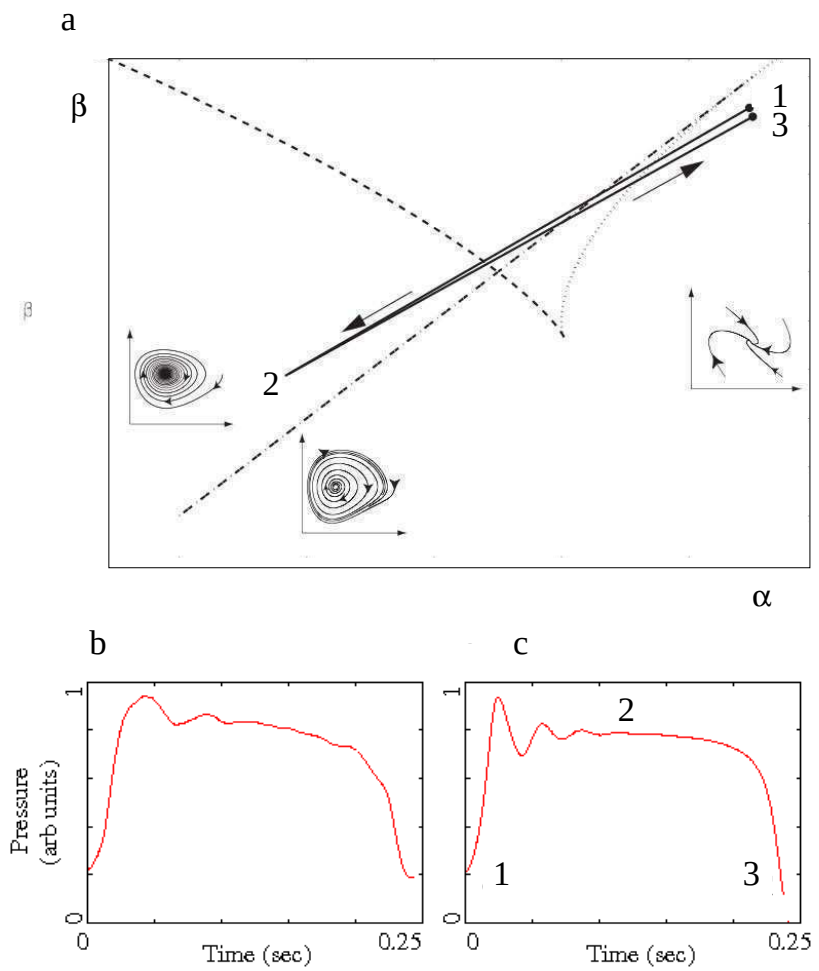

Figura 3.6: El espacio de parámetros para el sistema autónomo propuesto en el texto (c). Las dos curvas que convergen al punto cúspide son curvas de bifurcación nodo silla. En la región acotada por estas dos curvas existen tres punto fijos, dos atractores separados por un nodo silla. La tercer curva en la figura corresponde a una bifurcación de Hopf. Las flechas indican un camino en el espacio de parámetros para generar el patrón de presión experimental que se nuestra en (b). Integrando numéricamente con los patrones dependiendo del tiempo como se indica en la figura se obtiene el gesto sintético mostrado en (c).

zan al variar los parámetros. Por lo tanto, desplegando esta bifurcación con parámetros dependientes del tiempo lleva a

$$\begin{aligned} \dot{x} &= y \\ \dot{y} &= \alpha(t) + \beta(t)x + x^2 - xy - x^3 - x^2y. \end{aligned} \tag{3.2}$$

En la figura 3.6b se muestra la evolución integración numérica de nuestro sistema dinámico, a medida que los parámetros se mueven a lo largo de la trayectoria mostrada en la figura 3.6c. El sistema se inicializa en una región del espacio de parámetros donde existe un punto fijo atractor, a partir de ello se mueven los parámetros hacia una región en donde existe otro punto fijo que tiene autovalores con parte real menor que cero y parte imaginaria distinta de cero y finalmente los parámetros vuelven a sus valores iniciales. Los patrones de presión observados en este modelo se representan por $p(t) = 2 - x(t)$ donde $x(t)$ es una de la soluciones del sistema de ecuaciones 3.2. Con el fin de generar los diferentes gestos de presión, forzamos al sistema con una forma particular de $\alpha(t)$ y $\beta(t)$ de modo que el sistema quede descripto de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} \dot{x} &= y \\ \dot{y} &= \alpha_0 + Acos(\theta)cos(\omega t) + (\beta_0 + Asin(\theta)cos(\omega t))x \\ &+x^2 - xy - x^3 - x^2y. \end{aligned} \tag{3.3}$$

los parámetros α_0 y β_0 se fijaron en 1 y 3 respectivamente y se aplicó el siguiente reescaleo en el tiempo $t = 35\tau$. Estos parámetros se dejaron fijos para todos los pájaros analizados. El parámetro A representa la amplitud del forzante, ω es la frecuencia y θ es la dirección en el espacio de parámetros (α, β) que toma el forzante, como se muestra en la figura 3.6c.

Si estuviéramos interesados en simular numéricamente los patrones de presión donde este gesto básico se repite, como es usual durante el canto, podríamos repetir este forzado. Sin embargo, el nuestro es un modelo no lineal y por lo tanto el rango de frecuencias del forzante para las que el sistema mostraría este comportamiento sencillo está acotado. Para frecuencias más altas del forzante, el sistema puede presentar soluciones que sean subarmónicos del forzante.

3.2.2. Soluciones del sistema forzado: Gestos de presión sintéticos

Un resultado típico se representa en la figura 3.7: se muestran tanto el patrón experimental como el patrón sintético obtenido al integrar numéricamente la forma normal forzada presentada en la sección anterior. El patrón

de presión sintético que emula a un gesto de presión en un canto completo se logra mediante un conjunto de simulaciones numéricas de la forma normal forzada (ecuaciones 3.3). Para simular los distintos gestos de presión que genera un canario al producir canto, se utilizaron distintos valores de los parámetros.

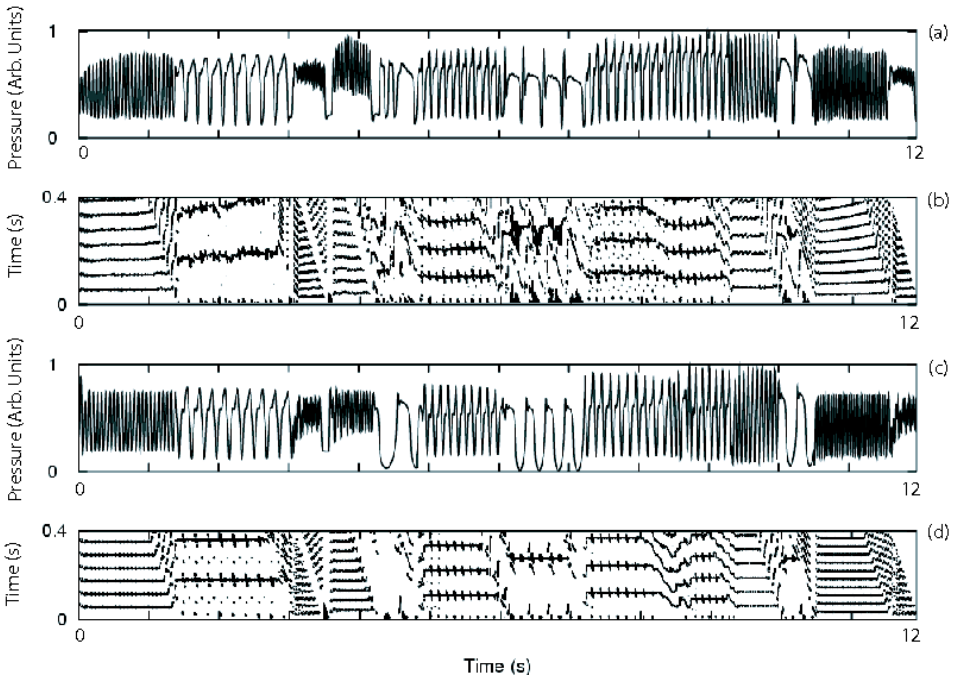

Figura 3.7: La serie temporal de gestos de presión experimentales producidos durante el canto y su correspondiente gráfico de recurrencia(a) y (b), respectivamente. La serie temporal simulada, emulando los gestos de presión, y su correspondiente gráfico de recurrencia (c) y (d), respectivamente.

El panel superior de la figura 3.7 muestra los gestos de presión producidos por un canario al emitir su canto, mientras que en el siguiente panel se muestra un gráfico de recurrencias para esa serie temporal (Mindlin and Gilmore, 1992; Mindlin et al., 1991). Los segmentos casi horizontales sugieren que existen recurrencias en algunos segmentos del canto. Para un dado segmento de la serie temporal que presente recurrencias, la altura la línea horizontal más baja que aparece en el gráfico de recurrencias, indica, aproximadamente, el período de la señal en ese segmento. Sugestivamente, las diversas alturas de las líneas horizontales, que corresponden, a distintos segmentos que tengan una estructura cuasi periódica no son completamente arbitrarias. Por ejemplo las alturas entre los dos primeros segmentos parecen estar en una relación 1 : 3 Este comportamiento sería coherente con

la hipótesis de que estas recurrencias son distintas respuestas subarmónicas obtenidas al forzar periódicamente al sistema con frecuencias similares.

Fueron analizados los gestos de presión correspondientes a distintos cantos, cada uno de ellos fue dividido en segmentos tales que en los gráficos de recurrencias presentaran líneas casi horizontales. Cada uno de estos segmentos corresponde a gestos respiratorios diferentes. De este modo, cada segmento es casi periódico y se buscó reproducirlo como una solución periódica del modelo. La búsqueda de esta solución se logra variando los parámetros del modelo. Los parámetros que se modifican para poder reproducir los gestos respiratorios son la amplitud del fozante, A, su frecuencia, ω, y la dirección, θ, en espacio de fases (α, β) (ver figura 3.6). Como se mencionó anteriormente, el campo vector utilizado para simular los resultados experimentales se inspiró en un patrón específico. Exploramos numéricamente qué distintas soluciones emergen al variar los parámetros del forzante.

Un estudio sistemático de estas soluciones muestra que muchas de las propiedades morfológicas encontradas en los datos experimentales también pueden encontrarse en ellas. En el conjunto de los parámetros del sistema se pudieron encontrar soluciones similares a una oscilación armónica, oscilaciones montadas sobre un nivel de continua, así como soluciones que presentaran dos máximos por período. Los sistemas no lineales pueden clasificarse por la organización topológica de sus soluciones (Mindlin et al., 1990). En otras palabras, no todo sistema dinámico puede presentar un rango de soluciones periódicas que pueda reproducir un conjunto de formas arbitrarias. El hecho de que, al ajustar una solución particular, el modelo propuesto nos permita simular, para los parámetros adecuados, el resto de los patrones experimentales, confiere confianza en él. Más aún, nos lleva a realizar un proceso algorítmico para ajustar los patrones del forzante. Para ajustar los parámetros del sistema de modo tal de reproducir un gesto de presión que presentara recurrencias, periodicidad, el primer paso fue encontrar parámetros que permitieran simular soluciones con características morfológicas similares. Luego un algoritmo computacional varía los parámetros para minimizar la diferencia entre la señal sintética y los datos experimentales.

Para esto definimos una función costo $C(\mathbf{p})$ como sigue:

$$C(\mathbf{p}) = \frac{1}{T_{exp}} \int_0^{T_{exp}} [X(\mathbf{p}, t) - E(t)]^2 dt \tag{3.4}$$

donde $E(t)$ representa los datos experimentales, $\mathbf{p} = (A, \omega, \theta)$, es decir los parámetros del sistema, $X(\mathbf{p}, t)$ es la solución del modelo 3.3 integrado numéricamente con los parámetros $\mathbf{p}$ y condiciones iniciales fijas. T_{exp} es la duración de segmento a analizar. De esta manera lo que se busca es encontrar mininos locales de esta función para determinar los parámetros que permitan generar el patrón simulado que más se asemeje al patrón experimental. Todos los patrones que se muestran en este trabajo corresponden a mínimos locales de esta función.

Comenzamos eligiendo una región del espacio de parámetros tal que estuvieran presentes soluciones subarmónicas que presentaran forma similares a las observadas. Las simulaciones numéricas mostraron que el parámetro θ era crítico: algunas soluciones no se encontraban fuera de un pequeño rango de este parámetro. Una vez que θ toma un valor en el cual se hallaba el comportamiento subarmónico buscado, se implementó una búsqueda del mínimo de la función costo por el método del descenso del gradiente. Una vez encontrado ese mínimo, se observaba si el patrón simulado reproducía las características morfológicas del patrón experimental. Para todas estas búsquedas la condición inicial corresponde a un estado "apagado", en ellas los estados transitorios no se eliminaron de las simulaciones numéricas. Por lo tanto al ajustar un patrón de presión recurrente no sólo se pide que podamos encontrar una solución periódica que tenga la morfología correcta, sino que también sea lo suficientemente estable de modo que el estado "apagado" converja rápidamente al patrón deseado. Esto nos permite reproducir sintéticamente los diversos gestos de presión que se utilizan durante el canto, con una única condición inicial. Para simular el canto solamente se tiene que cambiar en los instantes correctos las características del forzante, sin tener que reinicializar las condiciones iniciales; esto es, para el siguiente segmento se toman como condiciones iniciales los últimos valores de la simulación que ajustó el segmento anterior. Tenemos que destacar que algunos de los patrones experimentales pueden ajustarse con distintas soluciones. Por ejemplo, un patrón dado puede ajustarse como una solución de período tres del sistema con una frecuencia del forzante $\omega_f = \omega/3$ o como una solución de período uno con una frecuencia del forzante $\omega_f = \omega$. Cuando se presenta esta ambigüedad, la solución que minimiza la función costo es la que se elige como la que mejor representa a dicho patrón. Una vez que se encuentra una zona de espacio de parámetros apropiada para buscar la solución que ajuste al patrón experimental calculamos el gradiente de la función costo (3.4) siguiente manera:

$$G_i = C(p + dp_i) - C(p), i = 1, 2, 3 \tag{3.5}$$

donde $dp_i = 0{,}000001$,

Se recorrió el espacio de parámetros de modo que a cada paso, los valores de los parámetros permitieran obtener un valor menor de la función costo. Esto se logra al variar $\mathbf{p}$ en la dirección de $k\text{x}G_i$ con $k = 0{,}001$. El algoritmo finaliza cuando $G_i < \epsilon$ con $\epsilon = 0{,}000001$ garantizando que cualquier una variación dp_i en la solución $X(\mathbf{p}, t)$ resulte en un valor mayor de la función costo. En la figura 3.8 se muestran algunas trayectorias en el espacio de parámetros durante el proceso de ajuste. Para una diversidad de parámetros iniciales, se muestra la evolución de la función costo. Se encuentra un mínimo local donde el gesto se presión simulado se asemeja al experimental.

En las figuras 3.9 y 3.10 se muestran los gestos de presión experimentales

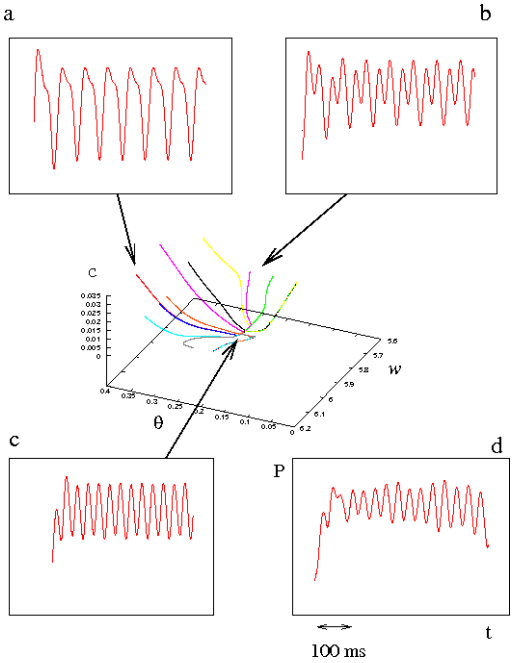

Figura 3.8: Una ilustración del método del descenso del gradiente aplicado al modelo. Los paneles (a)y (b), presentan series soluciones de modelo para distintos valores iniciales. Se comienza la búsqueda de los patrones que minimicen la función costo, $C(\mathbf{p})$,para cada conjunto de inicial de parámetros. En el panel (c) se muestra la solución generada con los parámetros que minimizan la función costo, que aproxima a patrón experimental mostrado en el panel (d)

y los obtenidos mediante la integración numérica para otros dos individuos. Estos patrones fueron reproducidos como se describió anteriormente, sin cambiar la condición inicial.

En la tabla 3.1 se muestran los valores que ajustan a estos gestos de presión en el espacio de parámetros (A, θ, ω). Los parámetros se agrupan cuando se los clasifica por el tipo de patrón que generan (ver figura 3.11). Las líneas en la figura representan los contornos de las regiones del espacio de parámetros donde las soluciones del sistema presentas diferentes subarmonicidades. Estas regiones son una versión tridimensional de lo que en la literatura de las oscilaciones forzadas se conoce como lenguas de Arnold. La compleja estructura que poseen no permite reconocer el agrupamiento de los tipos de punto si solamente se analiza cada uno de los parámetros por separado. En esta figura los patrones 1 y 4 se dibujan juntos pues ambos corresponde a soluciones de período 1 del sistema dinámico forzado (ver ecuaciones (3.3)).

Individuo	A	θ	ω	tipo de patrón
1	55	0.02	4.89	1
1	30	0.03	3.08	1
2	35	0.09	3.1	1
3	35	0.09	4.55	1
3	30	0.1	3.51	1
3	45	0.15	5.72	4
1	42.98	0.16	5.61	4
1	43.03	0.35	4.08	4
3	40	0.5	5.52	2
2	24.88	0.5	2.87	4
2	25.9	0.68	2.13	1
3	14.97	0.72	3.46	3
2	10.85	0.78	2.69	3
1	12.4	0.79	3	3
3	36	0.8	5.69	2
3	36	0.81	5.69	2
1	36.05	0.88	5.67	2
1	23.45	0.92	4.83	3
1	30.4	0.93	5.66	3
2	9.55	0.99	2.44	3
2	9.98	1	2.55	3
1	19.96	1.02	4.4	3
2	15.95	1.07	3.8	3
2	16.1	1.07	3.81	3
2	15.4	1.1	3.69	3

Cuadro 3.1: Parámetros encontrados al ajustar los tres gestos experimentales. Las referencias para el tipo de patrones se muestran en la figura 3.10

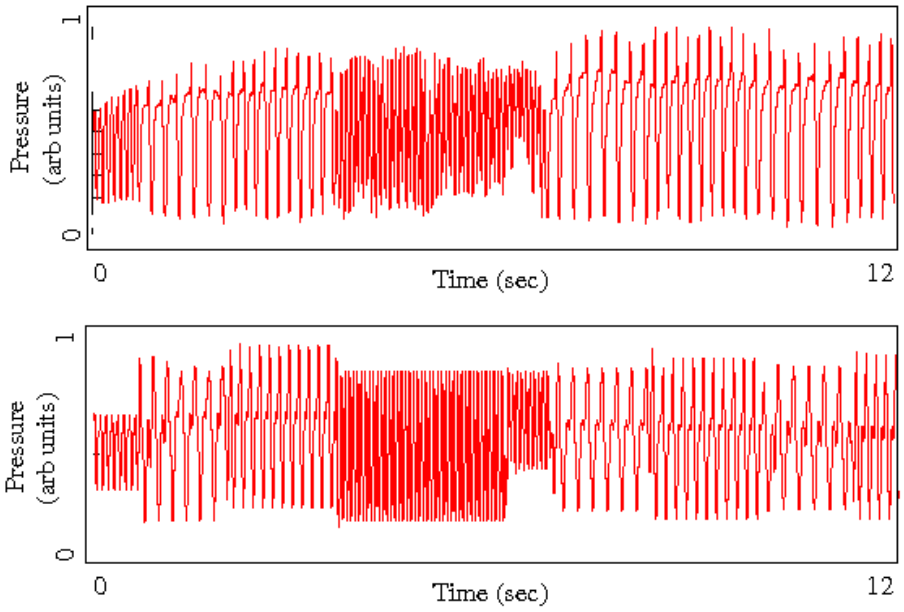

Figura 3.9: Gestos de presión y simulados para el canto completo de un segundo individuo

Destaquemos que los distintos pájaros que no fueron contemporáneos en el laboratorio, fueron comprados de adultos a distintos criadores y por lo tanto expuestos a tutores diferentes. Sin embargo presentan patrones respiratorios que se pueden reproducir con un único sistema dinámico y con parámetros que forman "clusters" o grupos en el espacio de parámetros.

De este modo se encontró un sistema dinámico no lineal, planteado en la hipótesis de trabajo 1.1.6.2, expresado como un forma normal, capaz de generar los gestos de presión producidos por canarios adultos. Al estar expresado en como una forma normal, este sistema dinámico es mínimal. Agregar términos no lineales de hasta tercer orden no agregará mayor complejidad a las soluciones obtenidas. Los diferentes patrones respiratorios experimentales se obtuvieron al ajustar los parámetros (A, ω, θ).

3.2.3. Una posible implementación neuronal

Tal como hemos mencionado anteriormente la producción del canto requiere de un control preciso de los músculos respiratorios y de los músculos de la siringe, que están coordinados por la actividad de un gran número de neuronas. En el cerebro de las aves las neuronas están organizadas en núcleos, (Jarvis, 2004), que forman lo que hemos denominado sistema de canto. Entre estos núcleos se destaca el RA (robustus arcopallialis) que controla los gestos respiratorios y siringeos durante el canto. Su rol es el de transformar la actividad neuronal en una actividad premotora precisa (Yu

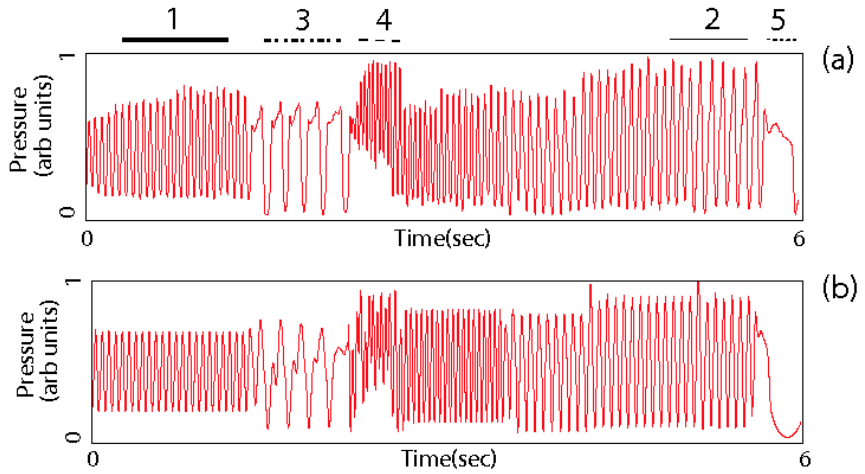

Figura 3.10: Gestos de presión y simulados para el canto completo de un tercer individuo

and Margoliash, 1996). La anatomía del mismo ha sido descripta en (Sturdy et al., 2003) donde se describe que este núcleo posee circuitos neuronales que inervan neuronas asociadas con el control de la respiración y con la actividad del los músculos de la siringe (Spiro et al., 1999). Éste núcleo esta gobernado por el núcleo HVC, que es una estructura de un nivel mas alto, de modo tal de generar las vocalizaciones (Hahnloser et al., 2002). Este delicado mecanismo se ha revelado mediante la medición simultánea un pequeño número de neuronas. Sin embargo el gran número (decenas de miles) de neuronas involucradas, hace que sea complicado asociar la actividad registrada con las características específicas de las instrucciones fisiológicas que controlan la siringe y los músculos respiratorios. Los gestos de presión, que en la sección anterior fueron generados mediante un sistema dinámico minimal, pueden ser simulados como las soluciones subarmónicas de una red neuronal forzada de baja dimensión. Esta red neuronal se construye de modo tal que sea compatible con las características anatómicas del núcleo RA.

3.2.3.1. Modelo neuronal para la generación de los gestos de presión

El núcleo RA, que controla la respiración durante el canto, está constituido, por varias clases de neuronas con propiedades fisiológicas características (Spiro et al., 1999). En la región dorsal del núcleo RA se encuentran neuronas que se proyectan a los núcleos respiratorios PAm Y RAm. En cambio, las neuronas, que se proyectan a la neuronas premotoras que inervan los músculos de la siringe se encuentran en la región ventral del RA. Estas neuronas están interconectadas por neuronas inhibitorias que realizan conexiones de

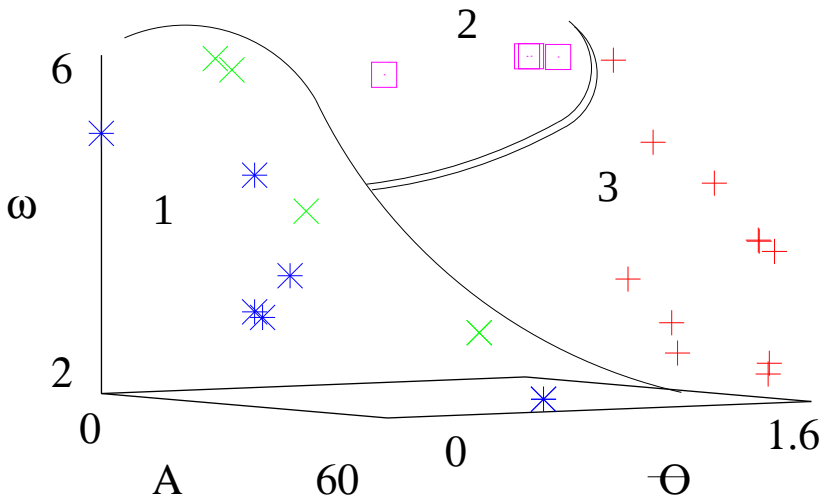

Figura 3.11: Los valores de los parámetros que ajustan a los patrones respiratorios de la tabla 3.1 en el espacio de parámetros (A, θ, ω). Los distintos tipos de puntos se asocian a los diferentes tipos de gestos respiratorios. Se los encuentra dentro de regiones de espacio de parámetros donde el modelo presentas diferentes soluciones subarmónicas. Las líneas continuas ezquematizadas en la figura denotan los bordes de esas regiones. Los patrones del tipo 1 y 4 se dibujan en la misma región ya que ambos son soluciones de período uno de sistema no lineal forzado

largo alcance. Se presume que estas neuronas conectan regiones distantes dentro del RA, de modo de lograr una coordinación en las actividades de las neuronas que se proyectan desde dicho núcleo (Sturdy et al., 2003). Durante el canto las neuronas del RA generan secuencias de potenciales de acción en salva (en inglés *burst*), que típicamente algunas salvas de aproximadamente 10 ms, que están fuertemente correlacionadas con partes de la sílabas emitidas (Chi and Margoliash, 2001). Estudios en los diamante mandarín (taeniopygia guttata) mostraron que durante la producción del canto las neuronas del HVC que se proyectan al RA están activas por breves lapsos de tiempo (alrededor de 6 ms). De este modo las neuronas del RA son excitadas por diferentes neuronas que se proyectan del RA, cada una de ellas actuando en una pequeña ventana temporal. La gran interconectividad en los circuitos neuronales del RA impiden una descripción detallada de la actividad global de núcleo. Por otro lado, la falta de una teoría cualitativa de sistemas no lineales extensos se interpone entre una implementación computacional de este mecanismo (Abarbanel et al., 2004) y el cálculo de

la actividad global de núcleo. A partir de estas consideraciones proponemos que la actividad promedio de este núcleo puede dar cuenta de los patrones respiratorios producidos durante el canto, que los patrones respiratorios se generan a nivel del RA y que esa instrucciones son seguidas por los núcleos respiratorios durante la producción de canto. De este modo, construimos un modelo en el que la repetición silábica, característica del canto de canarios, se genere mediante una fluctuación periódica en la actividad promedio del HVC, que, a su vez, gobierna la actividad del RA. Dado que existen subpoblaciones de neuronas excitatorias e inhibitorias en el RA, diferentes frecuencias de excitación puede dar lugar a soluciones subarmónicas. Las características distintivas de los gestos respiratorios pueden interpretarse como soluciones subarmónicas de las subpoblaciones del RA bajo un forzado periódico. La parte dorsal del núcleo RA posee interneuronas inhibitorias y neuronas excitatorias, estas últimas se proyectan a los núcleos respiratorios (Spiro et al., 1999). En este caso describiremos un modelo computacional para la actividad de estas poblaciones en término de dos variables x e y cuya dinámica estará dada por un modelo aditivo (F. C. Hoppensteadt, 1997)

$$\tau \frac{dx}{dt} = -x + S(\rho_x + 10x - 10y + A\cos(\omega t)) \tag{3.6}$$

$$\tau \frac{dy}{dt} = -y + S(\rho_y + 10x + 2y), \tag{3.7}$$

donde $\rho_x + A\cos(wt)$ y ρ_y representan la actividad de entrada luego de la sustracción de un valor umbral, la función sigmoidea $S(x) = 1/(1+exp(-x))$ simula la saturación en la respuesta de la actividad del núcleo, y los signos en los coeficientes de x e y con compatibles con su naturaleza excitatoria e inhibitoria respectivamente. A y ω representan la amplitud y la frecuencia del forzante respectivamente. La interacción entre el forzante y las subpoblaciones excitatoria e inhibitorias esta esquematizada en la figura 3.12a. Las diferentes soluciones que este sistema puede desplegar sin tener en cuenta la parte temporal del forzado, *i.e* $A = 0$, fueron descriptas por F. C. Hoppensteadt (1997) y se presenta un resumen esquemático en la figura 3.12b. En las regiones fuera de la cuña existe un único punto fijo que de manera análoga al modelo de la sección anterior dependiendo en que zona del espacio de parámetro puede representar un esto apagado, otro encendido y otro oscilatorio. Dentro de la cuña el comportamiento se describe como excitable, pequeñas perturbaciones hacer que tengamos pequeñas oscilaciones alrededor del punto fijo, pero si la perturbación supera cierto valor umbral se da una gran excursión antes de volver al punto fijo. Esperamos que este sistema, al igual que el anterior, presente soluciones subarmónicas al ser forzado periódicamente (Gonzalez and Piro, 1983; Feingold et al., 1988).

En la figura 3.13b se muestran distintas soluciones del sistema forzado para las subpoblaciones inhibitorias y excitatorias, para distintos valores

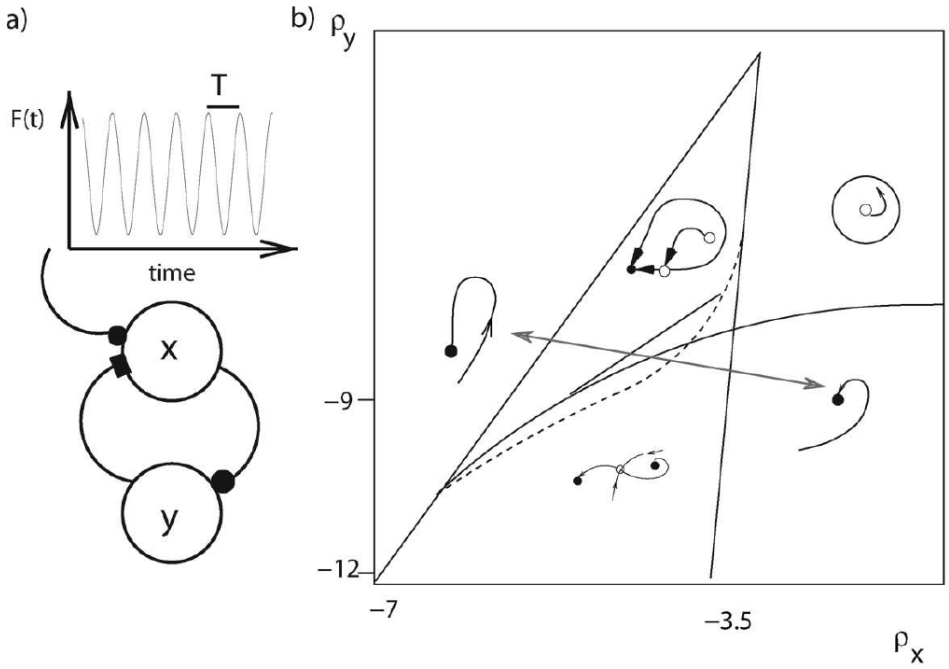

Figura 3.12: Esquema de las subpoblaciones neuronales cuyas actividades se modelan con las ecuaciones 3.6 y 3.7 (a). El espacio de parámetros del sistema autónomo (sin el forzante) se esquematiza en (b). Para distintos valores del los parámetros $(\rho_x; \rho_y)$, existen soluciones cualitativamente distintas, separadas por líneas de bifurcación. Las flechas indican un camino posible para generar un gesto de presión de baja frecuencia de repetición.

del forzante A, ω. Los gestos respiratorios experimentales se muestran en la 3.13a, a modo de permitir la comparación entre los gestos simulados y los experimentales. Las distintas soluciones se pueden caracterizar en términos de su periodicidad en unidades del período del forzante. La solución del primer panel es lo que se denomina una solución de período 1 (*i.e.* se repite a un tiempo igual al período del forzante). En cambio, la solución mostrada en el segundo panel es una solución de período 2. De este modo, una frecuencia de repetición silábica más baja se logra a través de un aumento en la amplitud del forzante. La solución mostrada en el tercer panel requiere un frecuencia del forzante muy baja. Dado que la frecuencia del forzante es baja (comparada con los tiempo característicos del sistema sin forzar) podemos interpretar la forma de la solución con la ayuda del diagrama de bifurcaciones. La solución comienza en el punto fijo donde la variable x no está activada. A medida que el forzante se incrementa, el sistema desarrolla un foco atractor y, por lo tanto, la solución presenta algunas oscilaciones,

que son la evidencia de un decaimiento transitorio al estado activado. Cuando el forzante decrece, este punto fijo es aniquilado y el sistema vuelve a sus estado inactivo. Las flechas en la figura 3b ilustran esta excursión en el espacio de los parámetros. Destaquemos que distintas soluciones se obtienen al cambiar los parámetros del forzante de la misma estructura neuronal.

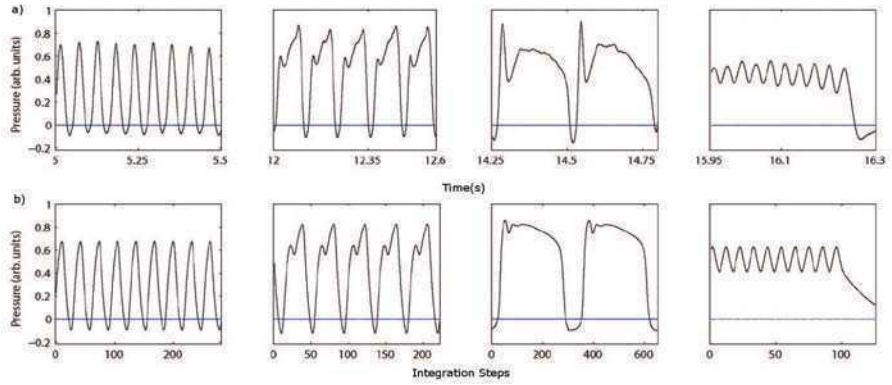

Figura 3.13: En los cuatro paneles superiores se presentan gestos de respiratorios medidos durante la producción de canto (a). En los cuatro paneles inferiores se presentan los gestos de presión sintéticos generados mediante la integración numérica del sistema dinámico descripto por las ecuaciones 3.6 y 3.7. Los valores de los parámetros del forzante $(A, \omega, \rho_x, \rho_y)$ para cada uno de los cuatro paneles son de izquierda a derecha: (2.4,30,-4,-8.5), (2.1,23,-3.7,-9.5), (7,1.5,-6,-9.5),(2,60,-3.7,-7.5).

Esta implementación neuronal basada en la observación de que el RA está formado por subpoblaciones de neuronas inhibitorias y excitatorios, tienen un diagramas de bifurcaciones que presenta las mismas características que el sistema dinámico que se presentó en la sección anterior. Esta implementación neuronal también es capaz de simular los gestos respiratorios de los canarios.

3.3. Síntesis

En este capítulo hemos mostrado, mediante un técnica sencilla, que existen gestos respiratorios que son comunes a todos los canarios, a pesar de haber sido expuestos a distintos tutores. A partir de los elementos comunes a distintos individuos construimos una base de gestos respiratorios prototípicos. Además hemos encontrado un modelo no lineal minimal que puede reproducir no solo las formas de los gestos de presión sino que también reproduce la organización temporal del canto. Destaquemos que el modelo propuesto, ver ecuaciones 3.3, es mínimo en el sentido que es una forma normal, es decir que lo términos no lineales del modelo son los mínimos necesarios para reproducir los gestos de presión. Dado que la forma normal propuesta

es lo más general posible, cualquier interpretación e implementación neuronal tendrá que presentar características similares al modelo propuesto y que cualquier modelo que quiera reproducir los gestos de presión tendrá se ser compatible con el diagrama de bifurcaciones de este modelo. En esa dirección se ha introducido la implementación de un modelo neuronal sencillo en el que se tuvo en cuenta la existencia de poblaciones de neuronas excitatorias e inhibitorias en el núcleo RA.

Capítulo 4

Aceleración hormonal de la adquisición de canto en canarios juveniles: gestos de presión y frecuencia silábica

Establecida la similitud entre los patrones respiratorios de canarios adultos sometidos a distintos protocolos de aprendizaje, se procede investigar el efecto de la testosterona en los gestos de presión producidos por canarios juveniles. Los canarios pertenecientes a los grupos II y III son juveniles que están por comenzar la etapa en la que se realiza la práctica del canto, la transición de la subcanción a la canción plástica, que ocurre aproximadamente a los 60 días de vida. Así el canto que comienza lábil y poco preciso, se perfecciona a lo largo de 180 días para obtener un canto estereotipado en la primavera.

Los juveniles fueron adquiridos a distintos proveedores a los treinta días de edad, edad en la que los juveniles comienzan a alimentarse por si mismos. Los pichones adquiridos se observan por los siguientes treinta días en los que se los va agrupando según la cantidad de práctica activa de canto realicen. De este modo se logra distinguir cuales son los machos y cuales las hembras, sin necesidad de realizar estudios invasivos, ya que en general las últimas sólo producen llamadas y eventualmente algún canto muy simple. Durante el proceso de identificación de los machos mediante la producción de canto los ejemplares son alojados en jaulas individuales y sus vocalizaciones grabadas. Algunos de los juveniles fueron identificados como machos por los proveedores pero de todos modos existió algún margen de error. Una vez identificados los machos de los dividió en dos grupos. El grupo II que será tratado con testosterona y el grupo III que será el grupo control.

Se sometió a los ejemplares del grupo II a un tratamiento hormonal con testosterona que en un trabajo previo, resultó exitoso para la obtención

de canto similar al de un macho adulto en hembras adultas (Mendez et al., 2006). El tratamiento consiste de aplicación diaria de 300 mg de testosterona en gel al 1 %, equivalente a 3 g de testosterona, a partir de los 60 días de vida, y se sostuvo el ritmo de aplicación durante todo el experimento. Este gel se coloca en los músculos pectorales, corriendo las plumas que los cubren para asegurarse que el gel esté en contacto con la piel. Esta aplicación debe realizarse con guantes de látex para evitar el contacto con la piel de la persona que está realizando la aplicación, requiere 2 a 4 minutos por ejemplar y se realiza siempre a la misma hora, típicamente por la mañana. El tratamiento fue bien tolerado por los animales que, además del aumento en la producción del canto, presentan un nivel mayor de agresividad.

Al inicio del tratamiento se realizaron grabaciones del sonido de los ejemplares pertenecientes a los grupos II y III (el grupo III es el grupo de juveniles que no está tratado con testosterona). Se realizaron grabaciones diarias de 6 a 8 horas de duración. Se requieren sesiones más largas que las realizadas con adultos pues los juveniles producen menos canto. Al inicio del tratamineto la producción de canto fue similar entre los ejemplares de los grupos II y III. A medida que se sucedieron las aplicaciones los juveniles tratados aumentaron su producción de canto respecto de lo que producían los juveniles no tratados. Las grabaciones de sonido de los ejemplares de ambos grupos se realizó como se describe en 2.2. El sonido producido por cada ejemplar se almacena en un disco rígido para un posterior análisis. Una vez que los pichones tratados producen canto similar al de un adulto, a los 20 días de tratamiento, se procede a canularlos para poder adquirir los gestos de presión de la misma manera que se hizo con los adultos (ver sección 2.3 y 3.1.3). A los pichones no tratados se los canuló a los ochenta días de vida. Si bien el procedimiento de canulación no afectó a la mayoría de los de los adultos ni a los pichones tratados con testosterona, canular a un pichón no tratado afectó notablemente su producción del canto. La mayoría de los pichones no tratados no retomó su canto luego de la canulación, no obstante, tuvieron una buena recuperación y se alimentaban normalmente luego de ella. Algunos de los juveniles no tratados retomaron la producción del canto cuando se les quitó la cánula y el sensor de presión.

4.1. Gestos de presión en canarios juveniles

Tomados, como se describe en el apartado anterior, los registros de canto y presión de los juveniles tratados —luego de veinte días de tratamiento— se obtuvieron gestos que están organizados en frases, formadas, a su vez, por la repetición de un gesto estereotipado. En la Figura 4.1A se muestran dos gestos de presión durante la producción de canto.

Los patrones de presión de 4 canarios juveniles, integrantes del grupo II, tratados con testosterona se compararon con los producidos por canarios

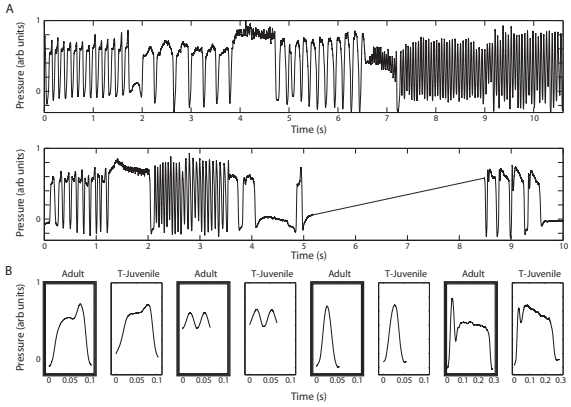

Figura 4.1: Gestos de respiratorios producidos por un canario juvenil tratado con testosterona durante 20 días(A). El canto está constituido por segmentos que se asemejan a las formas que hemos denominado la base. Cada pulso respiratorio se compara con el correspondiente elemento de la base(B).

adultos de manera similar a la descripta en (3.1.4), conforme se exhiben en la figura 4.1B. La Figura 4.2 presenta los patrones generados por los juveniles tratados reconocidos como similares a los de los adultos, organizados de modo tal que para cada patrón respiratorio generado ubicuamente por los adultos, mostramos los generados por los juveniles hormonalmente tratados. También fueron comparadas las series temporales correspondientes a los gestos de presión producidos por los pichones tratados con testosterona con los patrones prototípicos de los adultos. Para cada ejemplar perteneciente al grupo II se analizaron 10 series temporales de los gestos de presión

En cada una de esas series temporales se seleccionaron los pulsos espiratorios asociados a las diferentes sílabas. Estos gestos se compararon con los gestos prototípicos de los adultos. El criterio de similitud empleado en la comparación fue descripto en la sección 2.7 y fue utilizado en el capítulo anterior para determinar la existencia de una base de patrones respiratorios. Una vez seleccionado uno de los patrones de la base para efectuar la comparación, se lo parangonó con los producidos por los juveniles tratados con testosterona, de modo tal que cada uno de los patrones denominados como P1, P2, P0 y P1b, se comparó con los pulsos de presión producidos por los pichones tratados con testosterona, lográndose así encontrar similitud en los gestos de ambos grupos. En la figura 4.2A se muestra que los

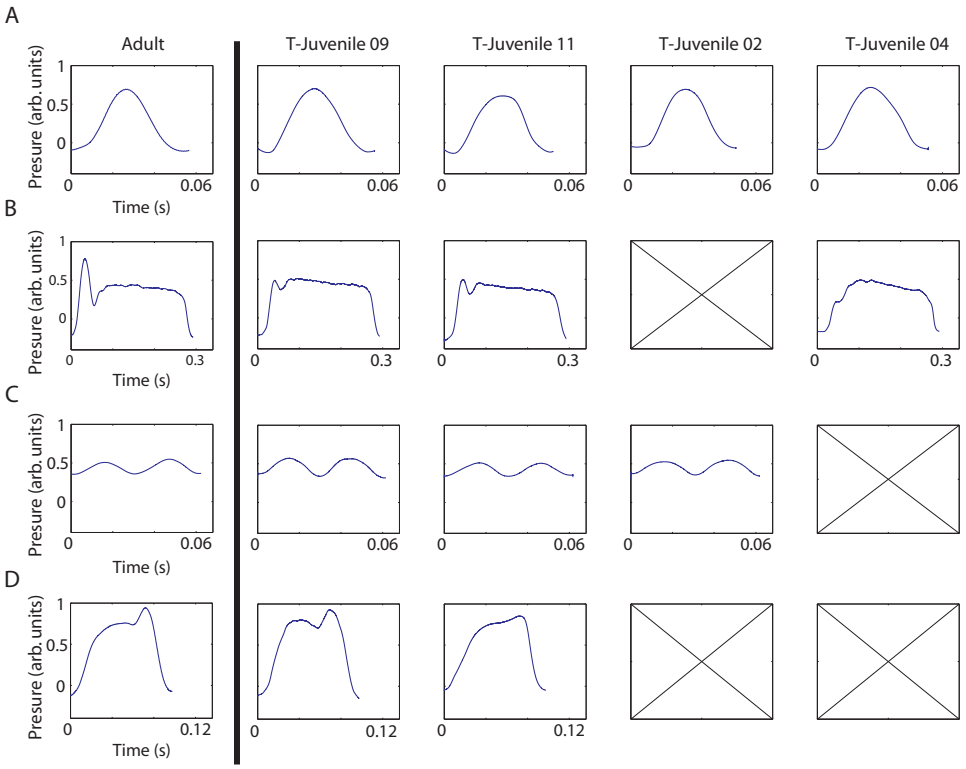

Figura 4.2: Los pulsos de presión de un adulto que se eligieron como base se muestran en la primer columna. Estos fueron generados por juveniles tratados con testosterona luego de 20 días de tratamiento. Dos de los pájaros presentaron todos los patrones mientras que los otros dos presentaron un subconjunto de los mismos.

patrones que se pueden describir como una oscilación armónica (patrones tipo P1) están presentes en los cuatro individuos. En la figura 4.2B el patrón respiratorio que consiste en un primer pico de presión para luego decaer lentamente (patrones tipo P0) se reconocen en tres de los individuos. Aunque el primer pico es más chico para los juveniles 9 y 11, y aunque para el juvenil 04 está apenas insinuado, el criterio que utilizamos para caracterizar la similitud fue cumplido. Destaquemos que también en los adultos la altura de este pico presenta una gran variabilidad, aún considerando al canto de un mismo individuo (ver figura 3.4 paneles A,C y F). En la figura 4.2C se reconocen las espiraciones pulsátiles para tres de los cuatro individuos. Finalmente, en la figura 4.2D, el cuarto patrón (tipo P2) fue reconocido en dos de los individuos. Los gestos de presión producidos por los juveniles tratados con testosterona pueden describirse, al igual que para los adultos, como dos grandes grupos; el programa de las mini inspiraciones y el de las espiraciones pulsátiles.

4.1.1. Patrones respiratorios en juveniles no tratados

El procedimiento descripto en el apartado 2.7 se siguió tambien para investigar los gestos de presión en juveniles que no fueron tratados con testosterona. En la figura 4.3 comparamos las series temporales representativas de los gestos de presión de un adulto del grupo I, un juvenil tratado con testosterona (del grupo II) y un juvenil no tratado hormonalmente (del grupo III). El sonograma del canto producido por el juvenil sin tratar se muestra debajo del panel en que se se muestra la serie temporal de la presión de los sacos aéreos asociada a ese canto. Tanto los juveniles tratados como los sin tratar tenían 80 días de vida al tiempo de la comparación.

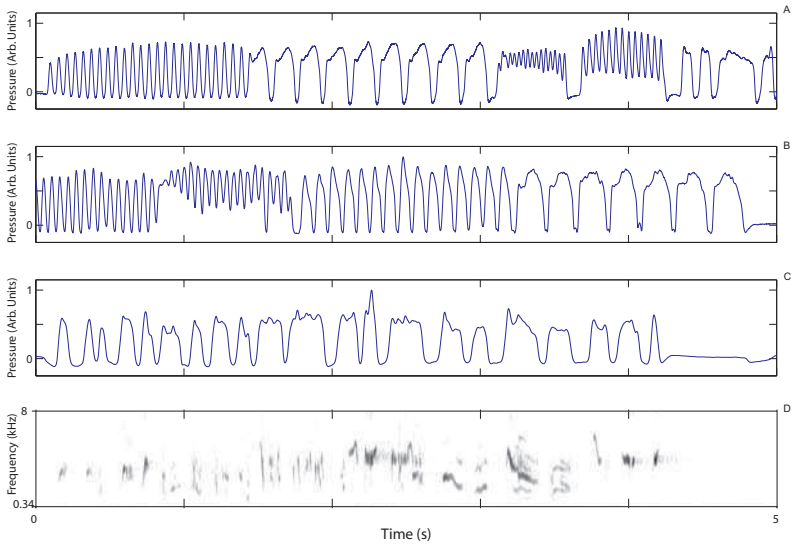

Figura 4.3: Los gestos respiratorios de un canario adulto (A), un juvenil tratado con testosterona (B) y un juvenil no tratado (C). Los juveniles tienen aproximadamente 80 días de edad; al inicio de la etapa sensorial-motora. Tanto el adulto cuanto el juvenil tratado con testosterona, presentan patrones estereotipados y repetitivos mientras que esto no se observa el el juvenil no tratado. En el panel (D) se muestra el sonograma correspondiente al canto producido por el juvenil no tratado

Al comparar con los gestos de presión de los adultos o los juveniles tratados con testosterona de la figura 4.3A y B con el proveniente del grupo III (juveniles sin tratar, cuyos patrones se muestran en el panel C del figura 4.3C), notamos que el último no presenta los gestos repetitivos presentes en los anteriores, y que los gestos individuales —pulsos espiratorios— resultan de díficil comparación con los elementos de la base de gestos protótipicos de presión obtenida en el capitulo 3.

Para analizar la estereotipia de los patrones de presión, comparamos

cada gesto de presión individual con todos los gestos de presión producidos durante un canto. Se dibujó un punto en la posición (i, j) cuando los pulsos de presión i y j se reconocían como similares. En la figura 4.4 se analizó el gesto de presión de la figura 3.4A. La estereotipia de los gestos de presión se ve reflejada en los agrupamientos de puntos alrededor de la diagonal. El mismo análisis se realizó para un canto de un juvenil hormonalmente tratado y para siete cantos consecutivos de un juvenil sin tratar. La ausencia de agrupamientos de puntos alrededor de la diagonal en el análisis de gesto de presión del juvenil perteneciente al grupo de control es una señal de la falta de estereotipia y repetición, típicas del canto adulto de un canario.

En términos de la morfología de los gestos de presión, comparamos dos elementos de la base con los patrones respiratorios de un canario perteneciente al grupo control. El juvenil sin tratar hormonalmente produce gestos sencillos como los que llamamos P1. Sin embargo, estos duran significativamente más (ver 4.4D y E). También se observaron soluciones con dos máximos, pero ninguno de ellos cumplió con los criterios de similitud. El gesto respiratorio pulsátil no se observó en los individuos del grupo de control.

Hemos atendido la inquietud del apartado 1.1.6.3 de la hipótesis de trabajos al encontrar que los gestos de presión producidos por los canarios juveniles tratados con testosterona producen gestos similares a los de los adultos. La similitud encontrada entre los gestos que utilizan los pichones tratatados y los elementos de la base que son comunes a todos los canarios dan confianza a la hipótesis de que algunos de los elementos del canto, más específicamente la morfología de los gestos respiratorios, no requieren un aprendizaje sino que se pueden adquirir gracias a la maduración del circuito neuronal..

4.2. Evolución temporal de la frecuencia silábica

El sonido emitido por los juveniles de los grupo II y III fue grabado durante los primeros 14 días de tratamiento. Este sonido fue analizado como se expone seguidamente. Primero se obtiene la envolvente del sonido como se describió en la sección anterior. Con la finalidad de encontrar durante el canto la producción de alguna forma de repetición, realizamos un gráfico de recurrencias para la serie temporal de la envolvente del sonido para cinco cantos de cada pájaro por cada día de tratamiento. Para encontrar la tasa de repetición de los gestos de presión, es decir la frecuencia silábica, realizamos un histograma con los puntos del gráfico de recurrencias.

Más concretamente, tomamos un intervalo en el gráfico de recurrencia $[t_1, t_2]$ y se realizó un histograma por los períodos. Si en ese intervalo que estamos analizando hay una señal que es casi periódica con cierto período τ, obtendremos una distribución de frecuencias con máximos en τ, 2τ, $\cdots$. Si la señal no presenta ninguna periodicidad, no encontraremos estos máximos.

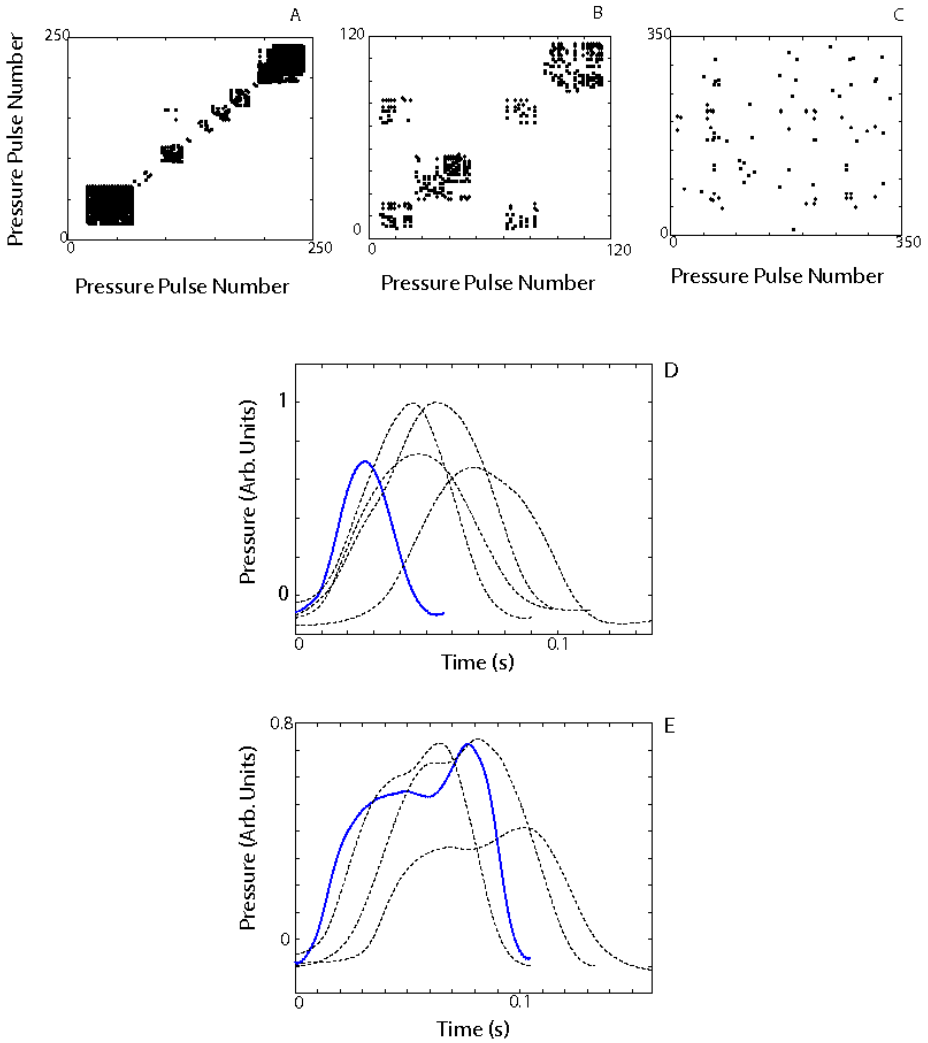

Figura 4.4: Los puntos alrededor de la diagonal en (A) reflejan la estereotipia y la estructura repetitiva de los gesto de respiratorios de un adulto. Cada gesto de presión se compara con todos los gestos de presión producidos durante el canto y un punto es dibujado en la posición (i,j) cuando los pulsos comparados son reconocidos como similares.El mismo análisis se realiza para dos juveniles , uno tratado con testosterona(B) y el otro no(C). La ausencia de puntos que se agrupen alrededor de la diagonal refleja la ausencia de estereotipia y patrones que se repitan en un juvenil no expuesto a la testosterona. Se muestran pulsos respiratorio individuales producidos por un juvenil no tratado (línea punteada) comparados con el elementos de la base respectivo (línea sólida).

El primer máximo, si existe, nos indica el período de la señal en ese intervalo de tiempo. De este modo, podemos obtener la frecuencia silábica como la recíproca del período. Para poder calcular la frecuencia silábica requerimos que el patrón se repita al menos 4 veces. Este criterio no se utilizó para las sílabas más lentas en las que se calculó la frecuencia silábica aún en el caso de que el patrón se repitiera una vez. Este procedimiento se repite a lo largo de todo el canto para el que se seleccionó el intervalo, luego también para los restantes cantos del mismo día. Así, para cada día todas las frecuencias silábicas fueron calculaban y luego graficadas en función del día de tratamiento. A través de este procedimiento se pudieron detectar toda las frecuencias silábicas presentes en el canto cristalizado.

4.2.1. Ontogenia de las frecuencias silábicas

Además de la inducción de gestos de presión luego de pocos días de tratamiento con testosterona encontramos, como se reporta en Gardner et al. (2005), que el arreglo temporal de las sílabas del adulto también emerge rápidamente. Recordemos que se realizaron grabaciones del sonido producido por estos individuos desde el primer día de tratamiento. En éstas, la ontogenia de la frecuencia silábica se estudió para tres individuos del grupo II. En el primer día de tratamiento, a los 60 días de vida, el sonido producido por pájaros de los grupos I y II se puede caracterizar como un estadio temprano de canto plástico o sub canto. Las vocalizaciones son variables, de bajo volumen y la repetición de sílabas está ausente. Esto se puede ver en la figura 4.5A y B. Los sonogramas de un canto de práctica para un juvenil en el grupo de control y para un juvenil tratado con testosterona (paneles superiores) así como los gráficos de recurrencias para la envolvente del sonido, se muestran en la figura 4.5A y B. Tanto para el individuo tratado como para el individuo de control, la ausencia de líneas rectas en los gráficos de recurrencias revelan la ausencia de repeticiones.

En los días subsiguientes al tratamiento la estructura del canto evoluciona y para el catorceavo día de tratamiento, es juvenil tratado con testosterona presenta un canto similar al de un adulto. En la figura 4.5D se muestra el sonograma de un juvenil tratado con testosterona (panel superior). En esta etapa del tratamiento, el canto producido presenta las características típicas del canto adulto: el canto se organiza en frases, cada frase está formada por la repetición de una sílaba estereotipada. El gráfico de recurrencias 4.5D (panel inferior) presenta una estructura de líneas horizontales donde la envolvente del sonido es casi periódica. Las distintas alturas en las que se forman esta líneas horizontales revelan el período de cada frase. Y de este modo estimamos la frecuencia silábica como la recíproca del período. Los pequeños paneles a la derecha de los gráficos de recurrencias presentan una estructura de máximos y mínimos bien definida. Por otro lado, el pájaro de control continúa presentado una canción plástica sin que se observara

una repetición de sílabas. En el gráfico de recurrencias no se observa una estructura de líneas horizontales y por lo tanto la estructura de máximos y mínimos tampoco se observa el pequeño panel a su derecha. Finalmente se realiza el mismo análisis en la figura 4.5E para el canto de un adulto. Los juveniles pertenecientes al grupo II adquirían un canto similar al de los adultos al catorceavo día de tratamiento. La variedad de frecuencias silábicas emergió gradualmente y diferenciadamente con el tratamiento con testosterona. No todas las frecuencias silábicas aparecen al mismo tiempo durante el tratamiento. La evolución de las frecuencias silábicas para tres individuos del grupo I se muestra en la figura 4.6. Las primeras frecuencias silábicas aparecen al segundo o tercer día de tratamiento. Éstas varían entre los 13 y los 22 Hz. Los pájaros pertenecientes al grupo II aumentaron la diversidad de frecuencias silábicas al tercer o cuarto día. Las frecuencias silábicas más rápidas asociadas a las espiraciones pulsátiles fueron detectadas al octavo día para dos de los pájaros mientras que el restante produce sílabas con una alta tasa de repetición al cuarto día. Al llegar el onceavo día de tratamiento estos individuos presentaban un rango completo de frecuencias silábicas similar a las de los adultos. En los días subsiguientes no se agregaron frecuencias silábicas al repertorio de los cantos producidos por lo juveniles tratados con testosterona. Se realizó una clasificación de estas frecuencias silábicas a partir del rango de frecuencias al que pertenecieran. Esta clasificación se realizó observando los gestos respiratorios de generados por los juveniles tratados hormonalmente y los de los adultos. Frecuencias silábicas que variaran entre $13 \pm 2Hz$ a $25 \pm 2Hz$ pueden ser asociados gestos respiratorios del tipo P1. Un segundo grupo de frecuencias silábicas tales que su frecuencia varíe entre $8 \pm 2Hz$ a $12 \pm 2Hz$ pueden asociarse a los gestos respiratorio del tipo P2. Para las frecuencias de repetición más bajas, entre $2Hz$ y $5Hz$, encontramos generalmente los gestos del tipo P0. Finalmente las frecuencias silábicas altas, entre $27 \pm 4Hz$ y $35 \pm 5Hz$ se pueden asociar con los patrones respiratorios pulsátiles, los llamados P1b.

Las frecuencias silábicas que emergen en los juveniles tratados con testoterona presentan rangos que son similares a los que se encontraron los adultos. Esto sugiere que los rangos de frecuencias silábicas tampoco requieren un aprendizaje sino que surgen de la maduración de sistema neuronal.

4.3. Síntesis

En este capítulo hemos mostrado que la aplicación de testosterona induce la producción de canto adulto en juveniles, induce sílabas similares a la de los adultos, y también los gestos motores similares a los de ellos. Esta similitud no solo se da en la organización temporal de canto sino también en la morfología de los patrones respiratorios. En particular, los pichones tratados con tesosterona desarrollaron rápidamente gestos descriptos como los

gestos respiratorios prototípicos, que agrupamos en lo que llamamos base de gestos de presión en el capítulo anterior. Esto sugiere que algunos elementos del canto producido por los adultos (organización temporal y morfología) requieren, para su aparición, la maduración del sistema neuronal y no la presencia de un delicado proceso de aprendizaje mediante la prueba y corrección.

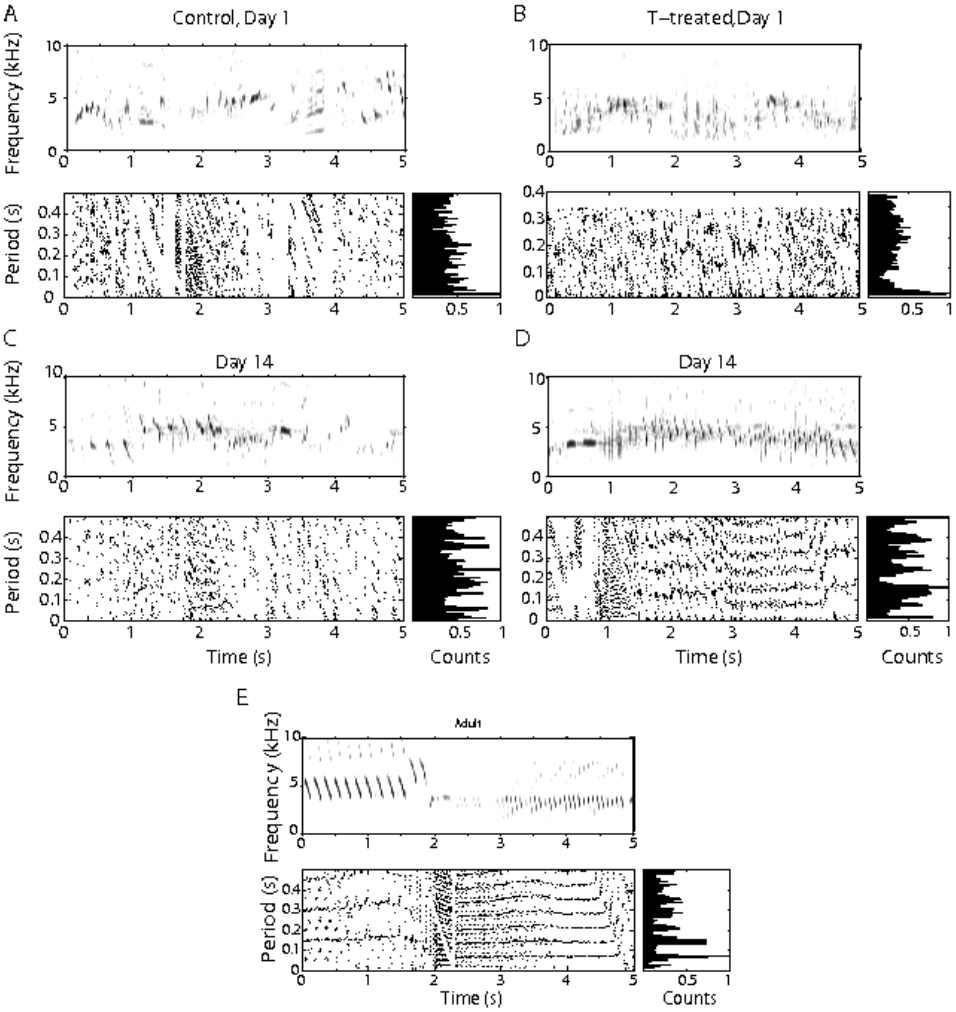

Figura 4.5: Sonogramas (paneles superiores) y gráficos de recurrencia (paneles inferiores) de uin juvenil de control(A) y de un juvenil tratado con testosterona(B) en el primer día de tratamiento. Sogramas y graficos de recurrencia para el mismo pájaro mostrado en (A) 14 dias depués (C) y el mismo juvenil tratado con testosterona luego de 14 días de tratamiento. El mismo análisis para un adulto no tratado se muestra en (E). Los paneles superiores muestras los sonogramas de las vocalizaciones. Los inferiores muestran los gráficos de recurrencia que es una representación gráfica de la recurrencias presentes en el canto emitido. Los pequeños paneles al lado de cada gráfico de recurrencia muestran la cantidad de puntos para cada valor de periodo. De este modo un conjunto de picos bien definidos revela la existencia de recurrencias. Mientras que no se observa un estructura de estos picos en un juvenil no tratado si se la observa en un juvenil tratado con testosterona luego de 14 días de tratamiento (comparar (C) y (D)).

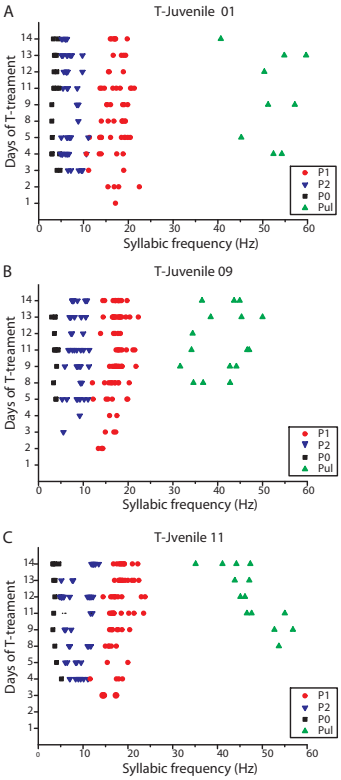

Figura 4.6: Para tres individuos (A-C) se muestran la evolución de las frecuencias silábicas se muestran la evolución de las frecuencias silábicas(eje horizontal) de los distintos patrones de sonido en función del tiempo (eje vertical). Los distintos tipos de puntos denotan distintos de envolventes del sonido, que emulan los patrones de presión medidos para los pájaros luego de 14 días de tratamiento.Para tres pájaros tratados con testosterona, la primera envolvente de sonido que se identifica claramente en un gráfico de recurrencia es una solución del tipo P1 ente los 12 y 25 Hz que aparece tempranamente, al segundo día de tratamiento.Para el cuarto día de tratamiento, las soluciones del tipo P2 y P0 son claramente reconocibles en los gráficos de recurrencia. La soluciones pulsátiles se encuentran sin ambigüedad al octavo día de tratamiento. Al catorceavo día de tratamiento, los patrones se observan bien definidos. Las distintas formas de las envolventes del sonido se encuentran en rangos de frecuencias silábicas que son las mismas que las que se observan en los patrones de presión de los adultos no tratados. Luego de pasados los 14 días de tratamiento no se encontró una estructura similar a las descriptas en los sonidos producidos por lo pájaros perteneciente al grupo de control

Capítulo 5

Conclusiones

El aprendizaje del canto típico de la especie en las aves que pertenecen al suborden de los oscinos es un proceso complejo. También lo es su producción, en la que intervienen el sistema nervioso central (el sistema de canto) y el sistema periférico (principalmente la siringe y el sistema respiratorio). Sin embargo en este trabajo encontramos que algunos aspectos del canto pueden inducirse rápidamente mediante la aplicación de una hormona y que la complejidad de los gestos respiratorios puede reproducirse sintéticamente con modelos no lineales sencillos.

5.1. Similitud de patrones respiratorios

En una primera etapa del trabajo encontramos que diferentes canarios sometidos a distintos tutores y protocolos de aprendizaje utilizan patrones respiratorios similares al producir canto. Esto es, se verificó la existencia de gestos de presión producidos para el canto que son comunes a todos los canarios estudiados, a pesar de que ellos poseyeran distintas historias de aprendizaje. Es posible entonces afirmar la presencia, en el canto de los canarios, de algunos gestos de presión cuyo aprendizaje previo no es requerido. A partir de esta similitud verificada pudimos construir una base de patrones comprensiva de elementos cuya presencia se puede afirmar en el canto de todos los canarios.

5.2. Generación sintética

Se buscaron de manera sistemática los parámetros para reproducir los patrones respiratorios presentes en la producción del canto de tres canarios adultos, utilizando un modelo dinámico. Se propuso un sistema de ecuaciones diferenciales acopladas de baja dimensión para simular los patrones respiratorios en los sacos aéreos durante la producción del canto de canarios (*Serinus Canaria*). A pesar de la complejidad que exhiben estos patrones, en

el modelo fue posible encontrar soluciones que presentan sus características principales. Para proponer este modelo, se comenzó analizando un patrón particular y se construyó un sistema dinámico que permitiera una transición entre distintos estados de modo de generar una serie temporal similar a los patrones experimentales. El sistema dinámico propuesto presenta como elementos: dos estados, uno apagado y otro encendido, cuya transición se encuentra cercana a una bifurcación de Hopf, de modo tal de permitir la existencia de oscilaciones. Se buscó que este sistema fuera lo más sencillo posible, esto es que se pudiera escribir como una forma normal. Sorprendentemente, cuando este sistema fue explorado numéricamente, para distintos parámetros se encontraron soluciones similares a las series temporales de los otros patrones respiratorios experimentales, para los que el modelo no estaba,a esta altura, optimizado. La similitud entre los patrones respiratorios simulados y los experimentales fue cualitativa y cuantitativa. Para ajustar los parámetros del sistema dinámico propuesto, se utilizó el método de descenso por gradiente. Al hacerlo, se encontró que distintos ejemplares presentaron patrones respiratorios suceptibles de ajustarse por parámetros que pueden agruparse diferenciadamente. Este agrupamiento se debe a que los distintos patrones fueron simulados como las soluciones subarmónicas de un sistema no lineal forzado. Distintas soluciones subarmónicas se presentan en regiones acotadas del espacio de parámetros. Es por esto que al ajustar patrones similares los parámetros que logren las soluciones numéricas más aproximadas podrán agruparse en dichas regiones. Es importante destacar que no cualquier serie temporal se puede aproximar mediante un único sistema dinámico de baja dimensión. Los sistemas dinámicos se pueden clasificar por la organización topológica de sus soluciones (Mindlin et al., 1990). En un sistema no lineal de tres dimensiones, la organización de los números de conexiones (enlaces, en inglés *linking numbers*), entre los distintas soluciones periódicas (los números propios de conexión, en inlglés *self linking number*) de una única orbita o un tipo de nudo (Mindlin et al., 1991), tiene que satisfacer un conjunto de condiciones específicas. La existencia un modelo de baja dimensión capaz de generar los diferentes patrones respiratorios que utilizan los canarios al producir su canto sugiere que, a pesar de su complejidad al generar las instrucciones fisiológicas que subyacen al mismo, la arquitectura neuronal del canario puede estar actuando en forma colectiva, de modo de traducir esa complejidad en una instrucción de baja dimensión.

Es necesario destacar que a pesar de la observada reducción de dimensionalidad, la diversidad de patrones generados sintéticamente es muy grande y sugiere la existencia de una estrategia —en los cantos experimentales— para lograr un comportamiento complejo: el uso de la subarmonicidad de un sustrato neuronal no lineal. Ya que diferentes arquitecturas neuronales podrían ser capaces de desplegar un comportamiento complejo similar al estudiado, será importante para la implementación matemática de cualquier estructura neuronal que se proponga explicar el comportamiento observado,

que los elementos dinámicos requeridos por el modelo —de forma normal, y de complejidad mínima— estén presentes.

A fin de acotar correctamente el resultado obtenido en punto a la generación sintética explicada en el presente apartado, corresponde señalar que no todas las aves pertenecientes al suborden de los oscinos genera un canto consistente en sílabas repetidas. El diamante mandarín (Taeniopygia guttata), —uno de los exponentes del orden de los oscinos más estudiados— construye su canto mediante una secuencia estereotipada de sílabas que presenta una amplia gama de propiedades acústicas. Por ello es posible esperar que su estrategia de generación de patrones de presión sea diferente a la aquí descripta. No obstante ello, resulta interesante una exploración acerca de si otras especies que construyen su canto con frases o sílabas repetidas, también utilizan la subarmonicidad para generar la diversidad de sus patrones respiratorios con un sustrato minimal no lineal.

5.2.1. Implementación neuronal

Se implementó un sistema dinámico que fuera compatible con la arquitectura neuronal de uno de los núcleos de sistema motor, el RA. Este sistema tiene en cuenta la interacción entre subpoblaciones excitatorias e inhibitorias que están presentes en este núcleo las cuales a su vez reciben instrucciones del núcleo HVC. Con este modelo también es posible reproducir los patrones respiratorios utilizados por los canarios al producir su canto. La falta de una teoría cualitativa de sistemas no lineales extensos impone la necesidad de elegir (*a priori*) una escala para describir la acción colectiva de las miles de neuronas involucradas en el control de una tarea compleja como la producción del canto. Elegimos formular una implementación neuronal en términos de la actividad promedio de unas pocas subpoblaciones neuronales. Con este nivel de descripción es posible dar cuenta de las características relevantes de las instrucciones fisiológicas necesarias para el control del sistema periférico responsable del comportamiento estudiado. Este sistema presenta los elementos dinámicos que se tuvieron en cuenta para generar el sistema minimal descripto anteriormente. Nuevamente, las características morfológicas de los patrones respiratorios se pueden generar como soluciones subarmónicas de este sistema inspirado en la estructura anatómica del núcleo RA, proveyéndonos de un modelo no lineal simple, que emula una arquitectura neuronal sencilla, capaz de generar la diversidad de los patrones respiratorios.

5.3. Juveniles tratados con testosterona

Mostramos que luego de unos poco días de tratamiento con testosterona, canarios juveniles desarrollan una estructura similar a la de los adultos y que luego de 20 días, los patrones respiratorios del canto ya son estereotipados.

Los gestos respiratorios utilizados para producir diferentes sílabas concuerdan con los que se identificaron en la canción adulta. Como los gestos de presión pueden asociarse a los tipos de sílabas, el surgimiento de la estructura del canto adulto pueda seguirse del sonido que ya estaba presente en el catorceavo día de tratamiento hormonal. La emergencia de patrones respiratorios similares a los de los adultos provee una validación para un modelo que sugiere un sustrato neuronal forzado periódicamente para la generación de los distintos patrones respiratorios producidos durante el canto. Estos resultados muestran que no se requiere un período de práctica extenso, durante la fase sensorial-motora para el surgimiento de la estructura del canto adulto y sus respectivos patrones respiratorios. En lo que sigue se discutirán estos resultados a la luz de los efectos que produce la testosterona en el sustrato neuronal asociado a la producción de canto y cómo estos resultados pueden elucidar la naturaleza del programa respiratorio para la producción de canto y su aprendizaje.

Un modelo propuesto para el control neuronal de los gestos respiratorios del canto propone un circuito no lineal con neuronas excitarorias e inhibitorias que están forzadas periódicamente ((Trevisan et al., 2006a) y sección 3.2.3.1). Se puede especular que este circuito está en el núcleo RA o en el núcleo RA y las áreas a las que se proyecta, las áreas respiratorias pre motoras (núcleos RAm y PAm). El forzante a este circuito se origina en el HCV o en el circuito de los ganglios basales del telencéfalo (conectándose desde el núcleo magnocelular lateral de la porción anterior del nidopalio (LMAN) al RA). Con este modelo, ver ecuaciones 3.3, cambios sencillos en el fozante son suficientes para producir salidas cualitativamente diferentes, correspondientes a los patrones respiratorios ya descriptos. Las formas que reconocemos y usamos como base no son un conjunto arbitrario: presentan las características morfológicas de las soluciones de un sistema no lineal de baja dimensión (ver sección 3.2.1 y (Alonso et al., 2009)). Las soluciones sintéticas de este modelo matemático no sólo dan cuenta de las formas de los patrones respiratorios sino también de los tiempos relativos de las sílabas modeladas y por lo tanto de la estructura temporal del canto.

Utilizando este modelo, los resultados de esta parte del trabajo llevan a conclusiones en el contexto de los efectos de la testosterona en los mecanismos de control neuronal. Los cambios en el sistema de canto durante el desarrollo y durante los ciclos estacionales coinciden con cambios en los niveles de testosterona (ver por ejemplo (DeVoogd, 1991)). En el cerebro la testosterona circulante se convierte en estradiol a través de la aromatasa y muchos de los cambios neuronales se efectúan por acción de esta última. A medida que los niveles de testosterona circulante aumentan, el número de conexiones entre el HVC y el RA aumenta, y las propiedades electrofisilógicas de las neuronas del RA cambian así como lo hacen las propiedades de sus tasas de disparo (Meitzen et al., 2007b,a, 2009). El aumento en las tasas de disparo espontáneas puede ser el resultado de las alteraciones en las

propiedades celulares, el cambio de la conectividad de este núcleo y el cambio entre las conexiones entre el HCV y el LMAN. La testosterona también afecta las estructuras periféricas involucradas en la producción del canto (Luine et al., 1980; Bleisch et al., 1984; Lohmann and Gahr, 2000). El efecto mejor documentado en aves es una proliferación de la musculatura siringea. Hay evidencia en mamíferos de que la testosterona también afecta otros a tejidos y que probablemente esto ocurra también en pájaros (Abitbol et al., 1999; King et al., 2001; Cynx et al., 2005). Sin embargo, actualmente no existe evidencia sobre el efecto de la testosterona en lo labios de la siringe. Los efectos de la testosterona en las estructuras que componen el sistema motor son coherentes con los cambios observados en el comportamiento y en los patrones respiratorios dentro del marco del modelo neuronal. Existen dos posibilidades, no necesariamente excluyentes, de cambios en el circuito neuronal que podrían dar cuenta del surgimiento de todas los elementos de la base de los gestos de presión adultos luego de unos pocos de días de tratamiento con testosterona. Primero, cambios en el forzante del circuito no lineal puede permitir el surgimiento de nuevos patrones para un mismo circuito. Este cambio en el forzante podría implementarse a traves de un cambio de la entrada al RA, en vez de estar forzado por el AFP y se considera como entrada al RA, mediante una conexión reforzada, el HVC (Mooney and Rao, 1994). Existe evidencia de que esta conexión se fortalece durante el proceso de aprendizaje (véase por ejemplo (Bottjer and Arnold, 1997; Alvarez-Buylla et al., 1994)). Más aun, existe un cambio en la influencia del AFP, de ser el forzante para la producción de la sub-canción, sin la necesidad del HVC (Aronov et al., 2008). Este circuito se vuelve innecesario para la producción de canto en el adulto (ver por ejemplo (Scharff and Nottebohm, 1991)). El tratamiento con testosterona puede acelerar este cambio y al juzgar por estos resultados, pueden pasar entre 5 y 8 días después de comenzado el tratamiento. Notablemente, el surgimiento de las formas específicas de los gestos de presión y la reestructuración de la secuencia del canto en frases, ocurren simultáneamente. Segundo, las propiedades del la red neuronal no lineal cambian a medida que los niveles de testosterona aumentan. Fortalecer las conexiones excitatorias e inhibitorias dentro de la red neuronal o aún aumentar sus conexiones, puede modificar sus respuestas; ya no se encuentran solamente formas simples como las que llamamos P1 sino que se observa el despliegue de todos los elementos de la base adulta en el canto de pichones tratados con testosterona. Grabaciones electrofisiológicas de las neuronas del RA sugieren que estos cambios en la red neuronal ocurren en él durante la ontogenia del canto. La exposición al canto y la subsiguiente producción del canto coincide con un cambio en la tasa espontanea de disparo de la neuronas del RA (Shank and Margoliash, 2009). Los cambios estacionales en las propiedades electrofisiológicas y en las tasas de disparo de las neuronas del RA sugieren que niveles elevados de testosterona podrían inducir cambio en la red que conforma el RA (Meitzen et al., 2007a). El aumento de

la conectividad dentro del núcleo RA (Spiro et al., 1999) favorece la acción sincronizada, la cual es compatible con un sistema de baja dimensión. Los cambios biológicos que ocurren durante la ontogenia del canto que siguen las fluctuaciones de los niveles de la testosterona, sugieren que ambos mecanismos están involucrados en el rápido surgimiento de patrones de presión similares a los de los adultos, en canarios juveniles tratados con testosterona. El cambio acelerado en la estructura del canto sugiere que el cambio del forzantes y la reestructuración de la red neuronal ocurren rápidamente. Es plausible conjeturar que ese desarrollo es tan rápido pues los cambios en la neuronas del RA y en la red que lo forma ocurren rápidamente (Adret and Margoliash, 2002; Shank and Margoliash, 2009). En este contexto los gestos o patrones de presión de juveniles no tratados son interesantes. Los gestos de presión producidos son del tipo P1 de una frecuencia baja y no están organizados en frases. Estas características respiratorias están de acuerdo con la hipótesis de que el modelo está forzado de manera lenta e individual. La ausencia de periodicidad en la señal del forzante podría explicar la alta variabilidad de los gestos de presión y la falta de organización de las sílabas en frases. Al mismo tiempo, la reducida conectividad en la red no lineal puede dar cuenta de la organización temporal y de la estructura de estos gestos de presión. Ambos aspectos son coherentes con los cambios propuestos en el sustrato neuronal para la producción del canto durante la ontogenia o durante los cambios estacionales. La administración de testosterona a canarios hembra induce la producción del canto, que sólo ocurre esporádicamente en hembras no tratadas (Leonard, 1939). Sin embargo los gestos de presión producidos por hembras tratadas con testosterona sólo presentan dos tipos de los gestos de presión que se encuentran en la base, los que hemos denominado P1 y P1b. Ambos oscilaciones consisten en funciones casi sinusoidales; el primero dentro del gesto motor de las mini-inspiraciones y el segundo en el gesto motor pulsátil. Sin embargo, el resto de los gestos de presión no fueron observados (Mendez et al., 2006). La ausencia de gestos de presión más complejos podría ser el resultado de una menor amplitud del fozante. Mientras que los gestos del tipo P1 se pueden realizar con una amplitud del forzante baja, los otros P2 y P0, sólo surgen para amplitudes más altas. La administración de testosterona a canarias hembra no logra una masculinización completa del sistema de canto. Por ejemplo, el volumen del HVC y del RA para hembras tratadas con testosterona son significativamente más pequeños que sus correspondientes volúmenes en machos adultos (Appeltants et al., 2003). Es por lo tanto plausible que un número menor de neuronas resulte en una conectividad menor entre el HCV y el RA, lo cual es coherente con una amplitud menor de la señal del forzante. El hecho de que canarios juveniles desarrollen todas las categorías de los gestos respiratorios luego de unos pocos días de tratamiento con testosterona impone la pregunta de cuál es el rol que juega una prolongada etapa sensorial-motora. Este período es considerado una práctica motora durante la cual el canto se va mejoran-

do gradualmente hacia el canto de un adulto, tanto en su calidad acústica como en su estructura temporal (ver por ejemplo (Brainard and Doupe, 2002)). Los efectos de la manipulación del período de práctica motora sobre la canción adulta no apoyan unívocamente a esta interpretación: ya que mientras que la "cristalización" inducida por el tratamiento con testosterona causó déficit en el canto adulto de algunas especies, al iniciársela en una etapa temprana, (Korsia and Bottjer, 1991; Titus et al., 1997; Whaling et al., 1995), no se observaron déficits duraderos en el canto del diamante mandarín luego de una alteración reversible de su retroalimentación auditiva durante largos periodos de la fase sensorial-motora (Pytte and Suthers, 2000). Tal vez la temprana administración de testosterona induce cambios en el circuito neuronal que afecta la integración entre la adquisición del templado y la fase sensorial-motora. Es posible, entonces que el déficit no se deba a un tiempo reducido de practica. El surgimiento de todas la categorías de los gestos respiratorios en canarios juveniles de 70 días es consistente con esta última posibilidad. Sin embargo no controlamos cuan similar es el repertorio de los juveniles tratados con testosterona respecto de aquel de un adulto. Sin embargo, en un desarrollo normal, una extensa fase de práctica sensorial-motora no se requiere para que surjan los gestos respiratorios de similares al de un adulto. Tal vez sí sea necesaria para algún tipo de corrección fina en los gestos motores de cada sílaba individual y para la generación de un repertorio de gran cantidad de sílabas. Para concluir, la observación del surgimiento de gestos respiratorios similares a los de un macho adulto en canarios juveniles tratados con testosterona es coherente con un modelo neuronal en el que la diversidad de patrones respiratorios surgen de una red neural no lineal forzada periódicamente (Trevisan et al., 2006a; Arneodo et al., 2008). Niveles altos de testosterona, ya sean naturales o inducidos experimentalmente, inducen cambios neutrofisiológicos y neuroanatómicos en los núcleos del telencéfalo que forman el sistema de canto de los oscinos. Estos cambios son coherentes con el surgimiento de una red neuronal no lineal y un forzante. Aunque la ubicación de esta red es aún un supuesto, evidencias provenientes de estudios comportamentales, fisiológicos y anatómicos apuntan a la existencia de un mecanismo neuronal sencillo para generar los diversos patrones respiratorios y vocales.

Como se expresó en diversas partes de esta tesis, el canto de las aves es un excelente sistema animal para dilucidar los mecanismos por los cuales un sistema nervioso se reconfigura a partir de la experiencia con el fin de lograr un comportamiento, esto es, los mecanismos en juego durante el aprendizaje. Nuestra experiencia como físicos nos ha hecho explorar este problema desde la periferia hacia el sistema nervioso. Así, identificamos a la presión de los sacos aéreos y a las actividades de los músculos siríngeos como las variables fisiológicas de mayor peso a la hora de generar el canto. Fue natural entonces preguntarse cuántas de las propiedades de estos gestos están, de algún modo programadas, al punto de poder ser provocadas hormonalmente, esto es, sin necesidad de un largo período de práctica, Para nuestra sorpresa, aún requiriendo finas propiedades morfológicas inspiradas en la descripción de series temporales generadas por sistemas no lineales, muchas propiedades de uno de estos gestos pudieron obtenerse por medio de la aplicación de testosterona. Este trabajo, así, no agota la exploración de cuánto se aprende y cuánto está ya codificado en el sistema del canto, pero acota la pregunta y propone un programa claro para investigaciones futuras.

Bibliografía

Abarbanel H, Gibb L, Mindlin GB, Talathi S (2004) Mapping neural architectures onto acoustic features of birdsong. *J. Neurophysiol* 92:96–110.

Abitbol J, Abitbol P, Abitbol B (1999) Sex hormones and the female voice. *Journal of voice* 13:424–446.

Adret P, Margoliash D (2002) Metabolic and neural activity in the song system nucleus robustus archistriatalis: effect of age and gender. *The Journal of Comparative Neurology* 454:409–423.

Alonso L, Alliende J, Goller F, Mindlin G (2009) Low-dimensional dynamical model for the diversity of pressure patterns used in canary song. *Physical Review E* 79:41929.

Alvarez-Buylla A, Ling C, Yu W (1994) Contribution of neurons born during embryonic and adult life to the brain of adult canaries: Regional specificity and delayed birth of neurons in the song-control nuclei. *The Journal of Comparative Neurology* 347.

Alvarez-Buylla A, Theelen M, Nottebohm F (1988) Birth of projection neurons in the higher vocal center of the canary forebrain before, during, and after song learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85:8722–8726.

Amador A, Trevisan M, Mindlin G (2005) Simple neural substrate predicts complex rhythmic structure in duetting birds. *Physical Review E* 72:31905.

Appeltants D, Ball G, Balthazart J (2003) Song activation by testosterone is associated with an increased catecholaminergic innervation of the song control system in female canaries. *Neuroscience* 121:801–814.

Arneodo E, Alonso L, Alliende J, Mindlin G (2008) The dynamical origin of physiological instructions used in birdsong production. *Pramana* 70:1077–1085.

Aronov D, Andalman A, Fee M (2008) A specialized forebrain circuit for vocal babbling in the juvenile songbird. *Science* 320:630.

Ball G, Riters LV, Balthazart J (2002) Neuroendocrinology of song behavior and avian brain plasticity: multiple sites of action of sex steroid hormones. *Frontiers in Neuroendocrinology* 23:137–178.

Bleisch W, Luine V, Nottebohm F (1984) Modification of synapses in androgen-sensitive muscle. I. Hormonal regulation of acetylcholine receptor number in the songbird syrinx. *Journal of Neuroscience* 4:786–792.

Bottjer S, Arnold A (1997) Developmental plasticity in neural circuits for a learned behavior. *Annual review of neuroscience* 20:459–481.

Brainard M, Doupe A (2002) What songbirds teach us about learning. *Nature* 417:351–358.

Chi Z, Margoliash D (2001) Temporal presicion and temporal drift in brain and behavior of zebra finch song. *Neuron* 32:899–910.

Cynx J, Bean N, Rossman I (2005) Testosterone implants alter the frequency range of zebra finch songs. *Hormones and Behavior* 47:446–451.

DeVoogd T (1991) Endocrine modulation of the development and adult function of the avian song system. *Psychoneuroendocrinology* 16:41.

Doupe AJ, Kuhl PK (1999) Birdsong and human speech: common themes and mechanisms. *Annual Review of Neuroscience* 22:567–631.

F. C. Hoppensteadt EMI (1997) *Weakly connected neural networks* Springer-Verlag New York, Inc.

Feingold M, Gonzalez D, Piro O, Viturro H (1988) Phase locking, period doubling, and chaotic phenomena in externally driven excitable systems. *Physical Review A* 37:4060–4063.

Gardner T, Cecchi G, Magnasco M, Laje R, Mindlin G (2001) Simple motor gestures for birdsongs. *Physical Review Letters* 87:208101.

Gardner TJ, Naef F, Nottebohm F (2005) Freedom and rules: The acquisition and reprogramming of a bird's learned song. *Science* 208:1046–1049.

Gilmore R (1998) Topological analysis of chaotic dynamical systems. *Rev. Mod. Phys* 70:1455–1529.

Goller F, Larsen ON (1997) A new mechanism of sound generation in songbirds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:14787–14791.

Gonzalez DL, Piro O (1983) Chaos in a nonlinear driven oscillator with exact solution. *Phys. Rev. Letts.* 50:870.

Hahnloser RH, Kozhevnikov AA, Fee MS (2002) An ultra-sparse code underlies the generation of neural sequences in a songbird. *Nature* 419:65–70.

Hartley R, Suthers R (1989) Airflow and pressure during canary song: evidence for mini-breaths. *J Comp Physiol [A]* 165:15–26.

Jarvis ED (2004) *Brains and birdsong, Nature's Music: The Science of Birdsong*, chapter 8 Elsevier Academic Press.

King A, Ashby J, Nelson C (2001) Effects of testosterone replacement on a male professional singer. *Journal of Voice* 15:553–557.

Kitchin C, Counts. L (2004) *A DESIGNER'S GUIDE TO INSTRUMENTATION AMPLIFIERS 2º Ed* Analog Devices, Inc.

Korsia S, Bottjer S (1991) Chronic testosterone treatment impairs vocal learning in male zebra finches during a restricted period of development. *Journal of Neuroscience* 11:2362–2371.

Laje R, Gardner T, Mindlin GB (2002) Neuromuscular control of vocalizations in birdsong: a model. *Physical Review E* 65:51921.

Larsen ON, Goller F (1999) Role of syringeal vibrations in bird vocalizations. *Proc. R. Soc. Lond. B* 266:1609–1615.

Lehongre K, Aubin T, Robin S, Del Negro C (2008) Individual signature in canary songs: Contribution of multiple levels of song structure. *Ethology* 114:425–435.

Leonard SL (1939) Induction of singing in female canaries by injections of male hormone. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 41:229–230.

Lohmann R, Gahr M (2000) Muscle-dependent and hormone-dependent differentiation of the vocal control premotor nucleus robustus archistriatalis and the motornucleus hypoglossus pars tracheosyringealis of the zebra finch. *Journal of Neurobiology* 42.

Luine V, Nottebohm F, Harding C, McEwen B (1980) Androgen affects cholinergic enzymes in syringeal motor neurons and muscle. *Brain research* 192:89.

Meitzen J, Moore I, Lent K, Brenowitz E, Perkel D (2007b) Steroid hormones act transsynaptically within the forebrain to regulate neuronal phenotype and song stereotypy. *The Journal of Neuroscience* 27:12045–12057.

Meitzen J, Perkel D, Brenowitz E (2007a) Seasonal changes in intrinsic electrophysiological activity of song control neurons in wild song sparrows. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 193:677–683.

Meitzen J, Weaver A, Brenowitz E, Perkel D (2009) Plastic and Stable Electrophysiological Properties of Adult Avian Forebrain Song-Control Neurons across Changing Breeding Conditions. *Journal of Neuroscience* 29:6558.

Mendez JM, Alliende JA, Amador A, Mindlin GB (2006) Dynamical systems techniques reveal the sexual dimorphic nature of motor patterns in birdsong. *Phys. Rev. E* 74:041917.

Mindlin GB, Gilmore R (1992) Topological analysis and synthesis of chaotic time series. *Physica D* 58:229–242.

Mindlin GB, Hou X, Solari H, Gilmore R, Tufillaro NB (1990) Classification of strange attractors by integers. *Phys. Rev. Lett* 64:2350.

Mindlin GB, Solari HG, Natiello MA, Gilmore R, Hou XJ (1991) Topological analysis of chaotic time series data from the belousov zhabotinskii reaction. *Journal of Nonlinear Science* 1:147–153.

Mindlin G, Gardner T, Goller F, Suthers R (2003) Experimental support for a model of birdsong production. *Physical Review E* 68:41908.

Mooney R, Rao M (1994) Waiting periods versus early innervation: the development of axonal connections in the zebra finch song system. *Journal of Neuroscience* 14:6532–6543.

Nottebohm F (1980) Testosterone triggers growth of brain vocal control nuclei in adult female canaries. *Brain Research* 189:429–436.

Nottebohm F (2005) The neural basis of birdsong. *PLoS Biol* 3:759–761.

Paul-Murphy J, Fialkowski J (2001) *Recent Advances in Veterinary Anesthesia and Analgesia: Companion Animals.*, chapter Injectable Anesthesia and Analgesia of Birds. www.ivis.org.

Powell FL, Hopkins SR (2004) Comparative physiology of lung complexity: implications for gas exchange. *News in Physiological Science* 19.

Pytte C, Suthers R (2000) Sensitive period for sensorimotor integration during vocal motor learning. *Journal of Neurobiology* 42:172–189.

Sartor J, Balthazart J, Ball G (2005) Coordinated and dissociated effects of testosterone on singing behavior and song control nuclei in canaries (serinus canaria). *Hormones and Behavior* 47:467–476.

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. *Journal of Neuroscience* 11:2896–2913.

Shank S, Margoliash D (2009) Sleep and sensorimotor integration during early vocal learning in a songbird. *Nature* 458:73–77.

Spiro J, Dalva M, Mooney R (1999) Long-range inhibition within the zebra finch song nucleus RA can coordinate the firing of multiple projection neurons. *Journal of neurophysiology* 81:3007–3020.

Sturdy CB, Wild JM, Mooney R (2003) Respiratory and telencephalic modulation of vocal motor neurons in the zebra finch. *J. Neurosc.* 23:1072–1086.

Suthers RA (1997) Peripheral control and lateralization of birdsong. *J. Neurobiology* 33:632–652.

Suthers RA, Goller F, Hartley RS (1994) Motor dynamics of song production by mimic thrushes. *J. Neurobiology* 25:917–936.

Suthers RA, Zollinger. SA (2004a) Producing song: The vocal apparatus. *New York Academy of Sciences* 1016:109–129 Behavioral Neurobiology of Bird Song. H.P.Zeigler and P. Marler, Eds. Annals.

Suthers RA, Zollinger SA (2004b) Producing song: The vocal apparatus. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 1016:109–129.

Titus RC, Ketterson ED, Nolan V (1997) High testosterone prior to song crystallization inhibits singing behavior in captive yearling dark-eyed juncos (junco hyemalis). *Hormones and Behavior* 32:133–140.

Trevisan MA, Mindlin GB, Goller F (2006a) Nonlinear model predicts diverse respiratory patterns of birdsong. *Physial Review Letters* 96:58103.

Trevisan M, Mendez J, Mindlin G (2006b) Respiratory patterns in oscine birds during normal respiration and song production. *Physical Review E* 73:61911.

Whaling C, Nelson D, Marler P (1995) Testosterone-induced shortening of the storage phase of song development in birds interferes with vocal learning. *Developmental psychobiology* 28.

Wild JM, Goller F, Suthers RA (1998) Inspiratory muscle activity during bird song. *J Neurobiology* 36:441–453.

Williams H (2004) Birdsong and singing behavior. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1016:1–30.

Yu AC, Margoliash D (1996) Temporal hierarchical control of singing in birds. *Science* 273:1871–1875.