



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
Departamento de Ciencias Biológicas Animales



**DIRECCIONALIDAD DE RESPUESTAS NEURONALES
MESENCEFÁLICAS EN *Eupsophus calcaratus*.
(AMPHIBIA- LEPTODACTYLIDAE)**

ANDREA CUELLAR FERRADA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

PROFESOR GUIA: MARIO PENNA V

Santiago, Chile

2009

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
AGRADECIMIENTOS.....	3
1.- RESUMEN.....	4
2.- INTRODUCCIÓN.....	6
3.- REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	9
3.1 Aspectos generales de la localización de sonidos.....	9
3.2 Respuestas conductuales a señales acústicas en anuros.....	9
3.3 Localización del sonido en anuros.....	10
3.4 Diseño del sistema auditivo en anuros.....	12
3.4.1 Sistema auditivo periférico.....	12
3.4.2 Sistema auditivo central.....	14
3.5 Procesamiento de la dirección del sonido en el sistema auditivo.....	18
4.- HIPOTESIS.....	20
5.-OBJETIVOS.....	20
5.1 Generales.....	20
5.2 Específicos.....	20
6.-MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
6.1 Sujetos experimentales.....	21
6.2 Cirugía e instrumentación.....	21
6.3 Estímulos acústicos.....	23
6.4 Procedimiento de registro y protocolo experimental.....	25
6.5 Análisis de datos.....	26
7.- RESULTADOS.....	29
7.1 Características generales de las respuestas neuronales.....	29
7.2 Direccionalidad de las respuestas neuronales.....	32
8.- DISCUSIÓN.....	40
8.1 Características generales.....	40
8.2 Direccionalidad de las respuestas neuronales.....	41
8.3 Comparación de estudios neurofisiológicos y conductuales.....	44

9.- CONCLUSIONES.....	46
10.- BIBLIOGRAFIA.....	47

AGRADECIMIENTOS

A mi profesor guía Mario Penna por toda su buena disposición, comprensión y paciencia durante todo este tiempo para enfrentar los problemas.

A mis compañeros de laboratorio Nelson Velásquez y Maricel Quispe por su buena voluntad y disposición para aclarar mis dudas y ayudarme en lo que fuera.

A José Bravo por ser el cómplice de rabias, penas y alegrías.

A Aníbal por ser la voz de la experiencia y entregarle al laboratorio ese aire familiar.

A mis hermanos, por darme el apoyo, comprensión, protección y las más grandes de las fuerzas para lograr mis objetivos.

A mis padres, porque se esfuerzan día a día para ser quien soy hoy, dejándose de lado ellos mismos.

A mi Abuelita Eliana, que me ha ayudado tantos años y se preocupa por mi sin que yo ni nadie se lo pida.

A mi abuelo, que sé que me cuida desde donde quiera que esté.

A Denis Alegría y Carlita Betanzo, por ser ese tipo de amigas que no importa lo que pase, sabes que estarán ahí contra viento y marea, amigas incondicionales, que te hacen valorar las cosas por su esencia misma.

A todas aquellas personas, que estuvieron conmigo en las buenas y en las malas (Ex compañeros de Colegio, de Universidad y de la vida)

1.- RESUMEN

Los anuros utilizan señales acústicas extensamente; la localización de la fuente sonora permite a las hembras acercarse a los machos y también facilitaría a los machos responder a rivales. Sin embargo, en experimentos de campo, los machos de *Eupsophus calcaratus* responden indistintamente a estímulos provenientes de diferentes localizaciones. En esta memoria se estudió la direccionalidad de las respuestas de neuronas auditivas mesencefálicas y se comparó la actividad neural con la ausencia de direccionalidad conductual observada en el campo.

Se registraron las respuestas de 61 neuronas auditivas mesencefálicas en 17 individuos (9 machos y 8 hembras) a estímulos provenientes de 7 ángulos en el plano horizontal, desde la posición 90° contralateral hasta 90° ipsilateral, respecto al hemisferio de registro, en intervalos de 30°.

Las propiedades generales de respuesta de las neuronas mostraron que un 80,3 % respondieron con frecuencias características bajas, con un promedio de 200 Hz y un rango entre 100 y 400 Hz, y sólo un 19,7 % presentaron frecuencias características altas, con un promedio de 1400 Hz y un rango entre 1300 y 1700 Hz. Según el tipo de descarga en respuesta a los tonos puros, las neuronas registradas mostraron dos patrones temporales. Un grupo correspondió a neuronas tónicas, que respondían durante toda la presentación del estímulo (n=49; 80,3%). El otro grupo correspondió a neuronas fásicas, que descargaban con una o unas pocas espigas, generalmente al comienzo del estímulo (n=12; 19,7%).

No hubo diferencias significativas en la direccionalidad de respuestas entre machos y hembras, por lo que los datos para ambos sexos fueron analizados en conjunto. Al presentar una llamada de advertencia sintetizada de la especie, consistente en un tono puro, 52,5 % de las neuronas respondió con más descargas a posiciones contralaterales, 36,1 % respondió con más descargas a posiciones laterales en ambos lados que a la posición frontal, y solo un 4,9 % respondió de manera no direccional. En respuesta a la llamada agresiva sintetizada, consistente en un estímulo pulsado, sólo 36,0 % de las neuronas

respondió preferencialmente a la posición contralateral, 32,0 % respondió con más descargas a ambas posiciones laterales en relación a la posición frontal y ninguna neurona respondió en forma no direccional. En respuesta a estímulos con igual estructura temporal al tono y al estímulo pulsado, pero sintetizados con ruido pasabanda en lugar de tonos, las neuronas respondieron en forma contralateral en una proporción similar al tono, pero la proporción de neuronas que respondieron preferencialmente a ambas posiciones laterales fueron alrededor de la mitad que en respuesta a los estímulos tonales y también la proporción de neuronas no direccionales fue baja, no sobrepasando un 10,0 % de la población registrada.

La direccionalidad de las respuestas neuronales obtenidas en laboratorio, contrasta con la ausencia de direccionalidad en las respuestas conductuales observadas en el campo. Estos resultados indican que los machos de *E. calcaratus* están dotados de una capacidad auditiva que les permite localizar a potenciales rivales, pero responden similarmente a cantos provenientes de distintas posiciones, manteniendo una actividad vocal que facilitaría la atracción de hembras. Estas también poseen neuronas con respuestas direccionales que les facilitarían la localización de machos en las áreas reproductivas.

2.- INTRODUCCIÓN

Se considera que existe comunicación cuando la apariencia o acciones de un animal influyen sobre el comportamiento de individuos de su misma o diferente especie. La comunicación se establece mediante señales visuales, táctiles, químicas, eléctricas o acústicas (Bradbury y Vehrencamp, 1998). Esta última modalidad tiene diversas ventajas: puede ser usada en la comunicación a distancia, en ausencia de visibilidad y en ambientes de topografía compleja. Las señales acústicas se propagan en distintas direcciones, pueden cesar rápidamente en caso de la presencia de algún depredador, son moderadamente fáciles de localizar y el costo energético de producirlas es relativamente bajo (Rand, 1988).

Una gran variedad de animales se comunican mediante sonidos (Bradbury y Vehrencamp, 1998). Los anfibios anuros usan extensamente este canal de comunicación, siendo los machos los que producen señales acústicas denominadas llamadas de advertencia, que atraen a las hembras y evocan respuestas vocales en otros machos. La localización de estas señales permite a las hembras reconocer y localizar a los machos coespecíficos y permite a otros machos evaluar la calidad y localización de posibles competidores (Gerhardt y Huber, 2002).

Los anuros poseen ventajas para el estudio de la comunicación sonora, ya que tienen un número reducido de vocalizaciones que inducen respuestas simples en el receptor. Las ranas y sapos producen, además de la llamada de advertencia, vocalizaciones que pueden ser clasificadas en diferentes categorías funcionales, dependiendo de las condiciones en las cuales son emitidas, conociéndose cantos de apareamiento, agresividad, rechazo sexual y de peligro (Gerhardt, 1988). Además, los cantos de las diferentes especies se diferencian en su contenido de frecuencias o en sus patrones temporales (Rand, 1988).

Los machos de algunas especies de anuros se orientan hacia los cantos de los coespecíficos para iniciar interacciones agresivas y en la rana toro de Norteamérica, los machos además alteran sus vocalizaciones cuando son estimulados con una llamada proveniente de una ubicación no habitual (Bee y Gerhardt, 2001).

La localización de sonidos que realizan los anuros depende de propiedades del sistema auditivo periférico y central. En el centro auditivo del mesencéfalo de anuros, el *torus semicircularis*, alrededor de un 80% de las neuronas son excitadas en forma máxima por tonos provenientes del lado opuesto al hemisferio registrado. Otras en tanto, responden en forma máxima a estímulos provenientes del frente del animal (Feng, 1981).

Diversos animales emiten sonidos desde el interior de cavidades y estas guaridas amplifican sus señales, facilitando su propagación a distancia (Lardner y bin Lakim, 2002). Sin embargo, las cavidades desde las cuales vocalizan los sapos machos del género *Eupsophus* en el sur de Chile tienen otro efecto acústico, ya que al interior de estas estructuras se amplifican las llamadas de otros machos que cantan en las proximidades, incrementado la recepción de señales de los vecinos por parte del macho residente. Al interior de estas cavidades se genera un ambiente acústico de ondas estacionarias, evidenciado en las propiedades resonantes de estos conductos (Penna, 2004). En estos ambientes, la dirección de proveniencia de sonidos externos no sería detectable, ya que la resonancia del sonido al interior de los tubos es invariable (Kinsler *et al.*, 1982)

Los machos de *E. calcaratus* responden a imitaciones de sus llamadas de apareamiento con respuestas vocales evocadas que consisten en notas únicas de alrededor de 250 ms de duración, con una frecuencia dominante de alrededor 1700 Hz (Márquez *et al.*, 2005). Además, los machos producen ocasionalmente un canto agresivo, consistente en pulsos breves de 5 ms emitidos a una tasa de alrededor de 100 pulsos/s (datos no publicados). En un estudio reciente se ha determinado que los machos de esta especie responden de manera similar a imitaciones de la llamada de advertencia provenientes de parlantes ubicados al frente, derecha o izquierda del sujeto (Penna y Quispe, 2007). Esta independencia de las respuestas vocales de la dirección del sonido es consistente con el ambiente de ondas estacionarias que existe al interior de las cavidades desde donde estos anuros vocalizan.

Resulta contrastante que, estando el sistema auditivo de anfibios dotado de especializaciones para la localización de sonidos como en otros vertebrados, los machos de *E. calcaratus* no discriminen entre estímulos provenientes de distintas direcciones.

El estudio de las respuestas neuronales de *E. calcaratus* a la dirección del sonido permitirá establecer si las propiedades de direccionalidad del sistema auditivo de esta especie presentan, en relación a otros anuros estudiados previamente, restricciones concordantes con el ambiente acústico en que la especie se comunica.

3.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aspectos generales de la localización de sonido.

La comunicación por sonido opera principalmente entre individuos distantes, condición que impone la necesidad de localizar la fuente sonora con el fin de responder adecuadamente a la señal detectada (Bradbury y Vehrencamp, 1998). Además requiere que los animales detecten y reconozcan señales acústicas, así como localizarlas en las tres dimensiones espaciales. Esta capacidad de localización de la fuente de sonido está basada en el procesamiento del sistema auditivo de disparidades en las propiedades de los sonidos que llegan a ambos oídos principalmente en los tiempos de llegada e intensidad. Estas diferencias se generan en una importante proporción en interferencias generadas por la estructura de la cabeza del individuo receptor (Yost, 2007). Además, la capacidad de localización de sonidos se ve en general dificultada por la presencia de ruido ambiente de origen biótico y abiótico y por la degradación que afecta a las señales al ser transmitidas en diversos ambientes (Wiley y Richards, 1981).

3.2 Respuestas conductuales a señales acústicas en anuros.

Los anuros presentan ventajas para el estudio de la comunicación sonora, dado que tienen un limitado número de vocalizaciones que inducen respuestas simples en el receptor. Las ranas y sapos producen cantos que pueden ser clasificados en diferentes categorías funcionales, dependiendo del contexto en el cual son producidas, existiendo llamadas de apareamiento, agresividad, rechazo sexual y peligro (Gerhardt, 1988).

El canto de apareamiento es producido exclusivamente por los machos y constituye un mecanismo de aislamiento reproductivo, ya que los cantos de las distintas especies difieren en su composición espectral o contenido de frecuencias y en sus patrones temporales, como el número de notas (Rand, 1988), previniendo apareamientos ínterespecíficos. Las hembras responden a estas señales orientándose hacia la fuente sonora, prefiriendo características espectrales o temporales dentro del rango de las llamadas coespecíficas (Gerhardt y Huber,

2002).

Las respuestas vocales de los machos también dependen de las características de las vocalizaciones de los vecinos coespecíficos con los que interactúan. En algunas especies por ejemplo, los machos responden más activamente a llamadas de frecuencia dominante más baja (Bosch y Márquez, 1996) o más alta (Bosch *et al.*, 2000), lo cual indica que éstos pueden evaluar las características constitucionales de sus oponentes a través de las señales acústicas, y adecuar su respuesta a la competencia vocal.

3.3 Localización del sonido en anuros.

La localización de las señales de coespecíficos en anuros es especialmente importante para las hembras, que en agregaciones reproductivas se orientan hacia los machos. En diversas especies se ha visto que las hembras receptoras se orientan hacia un parlante que reproduce el canto de la propia especie, corrigiendo la orientación del cuerpo a medida que se aproximan a la fuente sonora. Se ha observado que los sujetos realizan movimientos laterales de orientación con la cabeza entre los desplazamientos de aproximación al parlante que emite el estímulo (Rheinlander y Klump, 1988). Esta estrategia facilita acercamientos a la fuente sonora con desviaciones de alrededor de 15 ° del eje del cuerpo del sujeto respecto al parlante (Klump y Gerhardt 1989; Gerhardt y Huber, 2002). Esta conducta ha sido descrita para las ranas arborícolas *Hyla cinerea* (Feng *et al.*, 1976; Rheinlander *et al.*, 1979), *Hyla gratiosa* (Feng *et al.*, 1976) e *Hiperolius marmoratus* (Passmore *et al.*, 1984).

La localización del sonido por el sistema auditivo depende de diferencias temporales y diferencias de intensidad entre los sonidos que llegan a ambos oídos. La magnitud de estas diferencias binaurales depende de la frecuencia de la señal y el tamaño del animal, el cual determina la separación entre sus oídos y el grado de difracción del sonido que el cuerpo y otras estructuras producen (Gerhardt y Huber, 2002). Es particularmente notable que los anuros localicen sonidos con precisión, ya que debido a los pequeños tamaños de sus cabezas, las diferencias de tiempos e intensidad binaural con que llega el sonido a cada

tímpano son muy pequeñas, de aproximadamente 10 μ s y 1 dB, respectivamente (Michelsen *et al.*, 1986). Además, la precisión de localización es similar en especies de distintos tamaños, como *Hiperolius marmolatus* e *Hyla cinerea* (Rheinlander y Klump, 1988).

Los machos de algunas especies también pueden orientarse hacia otros individuos que vocalizan, ya sea para iniciar interacciones agresivas (Harrison y Littlejohn, 1985) o para interceptar a hembras que son atraídas por un macho que canta activamente (Perril *et al.*, 1982). Recientemente, se ha encontrado que los machos de *Rana catesbeiana* modifican sus respuestas vocales evocadas al cambiarse la posición de un parlante con que se reproduce una imitación del canto natural de la especie (Bee y Gerhardt, 2001).

En contraste con ese trabajo, un estudio reciente ha mostrado que los machos de *E. calcaratus*, sapo del bosque templado del sur de Chile, dan respuestas vocales similares a estímulos presentados desde distintas posiciones respecto a los sujetos experimentales (Penna y Quispe, 2007). Sin embargo, este sapo, canta desde el interior de cuevas, por lo que la ausencia de direccionalidad de sus respuestas podría deberse al ambiente acústico resonante que hay en estas cavidades, según han demostrado estudios de campo previos (Penna, 2004).

Por otro lado, experimentos de campo realizados con el anuro *Pleurodema thaul* han mostrado resultados similares a los de *E. calcaratus*, ya que los machos de esta especie de la zona central también responden indistintamente a estímulos que provienen de distintas ubicaciones (Pérez, 2008). En el caso de *P. thaul*, la similitud de las respuestas no es atribuible a efectos de resonancia, ya que esta especie canta en espacios abiertos, desde la superficie del agua en arroyos y lagunas. Sin embargo, un estudio neurofisiológico reciente ha mostrado que las neuronas auditivas mesencefálicas de esta especie sí presentan respuestas diferentes a sonidos provenientes de distintas direcciones en el plano horizontal (Bravo, 2008).

3.4 Diseño del sistema auditivo de los anuros.

3.4.1 Sistema Auditivo Periférico.

Los anuros son los primeros vertebrados que desarrollan un sistema de detección de señales sonoras de transmisión aérea. Ellos, a diferencia de otros vertebrados, carecen de oído externo, de modo que el sonido llega directamente a la membrana timpánica, siendo transmitido a través de estructuras óseo-cartilaginosa hasta la ventana oval, llegando a estimular los receptores del oído interno (Mason, 2007). La cavidad del oído medio en anuros está comunicada con la cavidad bucal a través de la Trompa de Eustaquio (Mason, 2007) (Fig. 1).

El sonido en anuros también se transmite hacia el oído interno por vías extratimpánicas que implican otras estructuras del cuerpo menos especializadas, como las paredes laterales del tórax. Desde acá el sonido se propaga aparentemente por el pulmón, glotis y cavidad bucal hasta el oído interno. Este mecanismo está presente también en especies de anuros que carecen de tímpano. En *Rana pipiens*, la transmisión extratimpánica es más efectiva que la transmisión timpánica para frecuencias bajas (inferiores a 200 Hz). Entre 200 y 1000 Hz, ambas vías son similarmente efectivas, en tanto que por sobre 1000 Hz la ruta timpánica es mucho más efectiva (Mason, 2007).

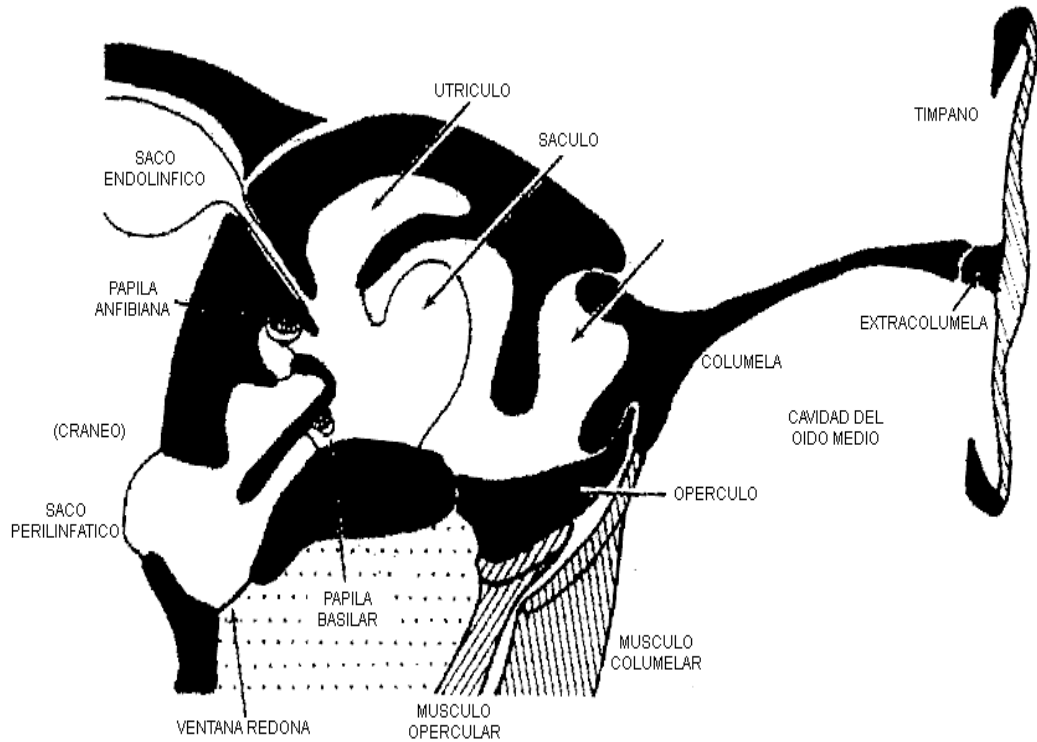


Figura 1: Diagrama esquemático del oído medio e interno de anuros mostrando los órganos auditivos papila basilar y papila anfibia (modificado de Wilczynski y Capranica, 1984).

Los anuros son los únicos vertebrados que poseen dos superficies receptoras de sonido en el oído interno, que surgen como evaginaciones de la pared del sáculo. La papila anfibia es sensible a frecuencias bajas (inferiores a 1000 Hz, dependiendo de la especie) y la papila basilar responde a frecuencias más altas (superiores a 1000 Hz). Ambas estructuras poseen un epitelio de células ciliadas que están en contacto con una membrana tectorial (Lewis y Narins, 1999).

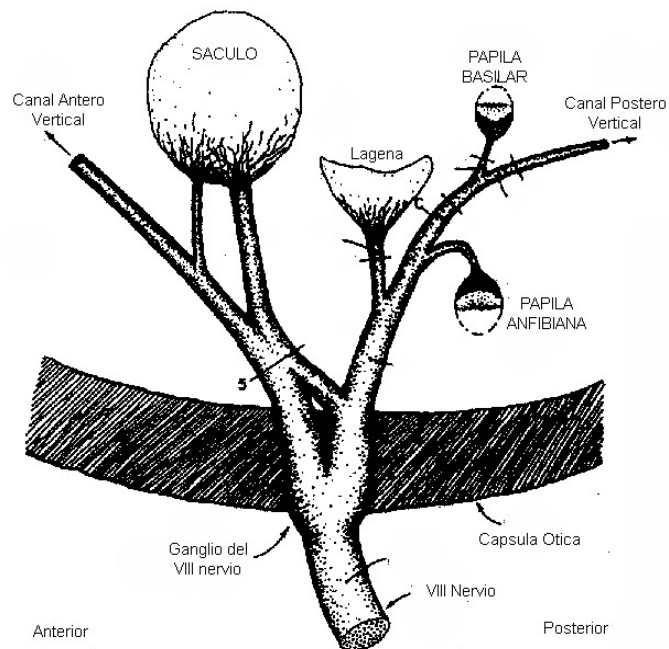


Figura 2: Inervación de los receptores del oído interno (modificado de Feng *et al.*, 1975).

Las células ciliadas están inervadas por fibras nerviosas del VIII nervio craneano (Fig. 2) y responden con descargas de potenciales de acción que son proporcionales a la intensidad del estímulo, en un rango de 20-60 dB. Cada fibra nerviosa está sintonizada a un rango de frecuencias, teniendo curvas de sensibilidad umbral con forma de “V”. La frecuencia a la que una neurona es más sensible es denominada frecuencia característica (Simmons *et al.*, 2007).

3.4.2 Sistema Auditivo Central.

La organización de la vía auditiva de los anfibios anuros es similar a la de otros vertebrados tetrápodos. Las aferencias viajan por el VIII nervio craneal, terminando ipsilateralmente en neuronas del núcleo medular dorsal, junto a fibras del sistema vestibular (Wilczynski y Endepols, 2007).

Al núcleo medular dorsal llegan fibras nerviosas ascendentes o aferentes provenientes de la

papila basilar y anfibia, encontrándose en la parte ventral las fibras que responden a bajas frecuencias y hacia dorsal las que responden a altas frecuencias (Rose y Gooler, 2007).

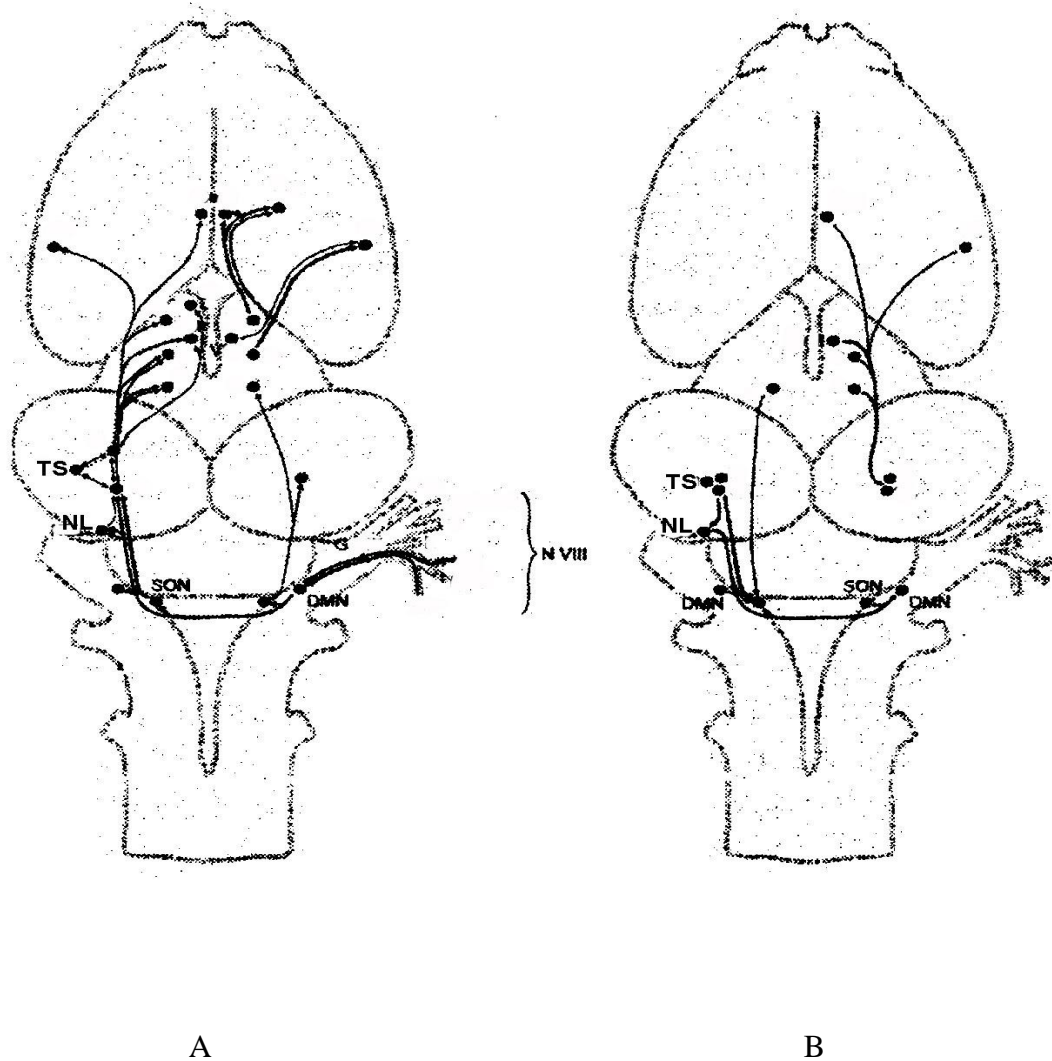


Figura 3 : Diagrama esquemático de las vías auditivas. (A) Vía auditiva ascendente, (B) Vía auditiva descendente. Abreviaciones: SON núcleo olivar superior, DMN núcleo medular dorsal, TS *torus semicircularis*, NL lemnisco lateral.

El núcleo medular dorsal establece conexiones bilaterales con el núcleo olivar superior y también con el *torus semicircularis* contralateral en el cerebro medio (Fig. 3A). También hay conexiones recíprocas comisurales entre el núcleo medular dorsal izquierdo y derecho (Fig. 3B). Las conexiones descendentes que llegan al núcleo medular dorsal (Fig. 3B), provienen de tres grandes centros auditivos, el *torus semicircularis*, el núcleo olivar

superior, y el núcleo del lemnisco lateral. Estas conexiones descendentes son mayoritariamente ipsilaterales. (Feng, 1986a)

El núcleo olivar superior se ubica a nivel de la entrada del VIII nervio craneal, en la parte ventral de la medula (Wilczynski y Endepols, 2007), recibiendo proyecciones bilaterales del núcleo medular dorsal. Estas conexiones son predominantemente contralaterales (Feng, 1986b). En el núcleo olivar superior también hay una representación tonotópica, esto es, que las neuronas que responden a bajas frecuencias se ubican dorsolateralmente y las que responden a altas frecuencias en la zona ventromedial. La sintonización a frecuencias de estas neuronas es menos esquemática que las del núcleo medular dorsal, su sensibilidad a frecuencias no está centrada simétricamente en una frecuencia y las curvas de sensibilidad son más complejas (Feng y Capranica, 1978; Fuzessery y Feng, 1983)

El *torus semicircularis* es el centro auditivo del mesencéfalo y constituye uno de los núcleos más importante en el procesamiento de la información auditiva. El *torus semicircularis* se ubica ventral respecto al tectum óptico y al ventrículo tectal, siendo homólogo al colículo inferior en los mamíferos. El *torus semicircularis* está compuesto por cinco núcleos de los cuales tres: el principal, el laminar y el magnocelular, están relacionados con el procesamiento del sonido. El núcleo laminar está ubicado directamente bajo el ventrículo tectal y cubre casi completamente la superficie dorsal y rostral del *torus semicircularis*, el núcleo principal está ubicado en posición ventrocaudal respecto al núcleo laminar y el núcleo magnocelular está ubicado en la zona caudal del *torus* ventral (Wilczynski y Endepols, 2007). La sensibilidad a frecuencias a este nivel es más compleja, existiendo alrededor de un 10 % de las neuronas que responden con igual sensibilidad a frecuencias bajas y altas (Rose y Gooler, 2007).

A nivel del *torus semicircularis* no existe una tonotopia sistemática, sin embargo, existe una mayor proporción de neuronas que responden a frecuencias bajas hacia posiciones más caudales y de frecuencias altas hacia posiciones más rostrales (Fuzessery, 1988). A nivel del tálamo, el núcleo posterior recibe proyecciones del núcleo laminar del *torus semicircularis* y el núcleo central recibe principalmente proyecciones del núcleo principal y

magnocelular (Feng y Schellart, 1999). A nivel de los núcleos talámicos existe una importante proporción de neuronas (30 % aproximadamente) que responden sólo si son estimuladas por frecuencias bajas y altas simultáneamente (Fuzessery, 1988).

Las descargas de potenciales de acción con que las neuronas responden a tonos puros, difieren en los distintos niveles de la vía auditiva. A nivel de las fibras nerviosas del VIII par, las neuronas responden con descargas mantenidas durante toda la duración del estímulo (neuronas de descarga tónica), sin embargo, a partir del núcleo medular dorsal aparecen neuronas que descargan con una o unas pocas espigas que son producidas en general, al comienzo del estímulo (neuronas de descarga fásica) (Rose y Gooler, 2007).

Además, las neuronas del *torus semicircularis* tienen patrones temporales de descarga a tonos puros que pueden clasificarse en tres categorías: tónicas, fásicas y fásico-tónicas (Rose y Gooler, 2007); las proporciones relativas para cada clasificación son 67%, 19%, 14%. Las neuronas fásicas responden mejor a tiempos cortos de ascenso del tono, en tanto que las tónicas no son selectivas al tiempo de ascenso (Penna *et al*, 2001). Las neuronas de respuesta tónica codifican la duración del tono en la duración de la respuesta, en tanto que las respuestas de neuronas fásicas son independientes de la duración del tono. Aproximadamente, un 20% de las neuronas del *torus semicircularis* responden en forma selectiva a la duración del sonido, de modo que la máxima respuesta al tono puro se produce cuando el estímulo tiene una duración específica (Penna *et al.*, 1997).

En el sistema auditivo central también existen neuronas que presentan selectividad a parámetros temporales de los estímulos. Algunas de estas neuronas son sensibles a la pendiente de ascenso del estímulo, descargando con más espigas a pendientes más rápidas. También en el sistema auditivo central hay neuronas que responden selectivamente a la duración de los estímulos y a la frecuencia de pulsos del estímulo. En general estas respuestas están en correspondencia con las características de las vocalizaciones que cada especie emite (Rose y Gooler, 2007).

3.5 Procesamiento de la dirección del sonido en el sistema auditivo de anuros.

Los anuros carecen de pabellón auricular que les facilite la localización de sonidos, sin embargo la membrana timpánica de anuros responde de manera direccional al sonido. La conexión del oído medio con la cavidad bucal mediante la Trompa de Eustaquio aumenta la sensibilidad direccional de cada oído, creando un detector de gradiente de presión (Rheinlaender *et al.*,1979). Debido a esta configuración, el sonido alcanza tanto la superficie externa como interna de la membrana timpánica, siendo la fuerza que produce el movimiento de la membrana proporcional a la diferencia de la presión entre ambos lados. De esta manera, resultan amplificadas las diferencias de amplitud y de tiempo de llegada del sonido a la membrana timpánica (Christensen-Dalsgaard, 2005).

A nivel del nervio auditivo, diversos estudios han mostrado que las respuestas de las fibras auditivas son también influenciadas por la dirección del sonido (Feng, 1980; Lin y Feng, 2001). A este nivel las fibras de alta y baja frecuencia presentan direccionalidades distintas, respondiendo las fibras de baja frecuencia con mayor número de descargas a estímulos provenientes de localizaciones ipsi y contralaterales que a estímulos provenientes de enfrente del sujeto. En cambio, las fibras de frecuencias altas responden máximamente a estímulos provenientes de posiciones ipsilaterales. El patrón de respuesta de las fibras de frecuencias altas es similar a la direccionalidad de la respuesta vibratoria de la membrana timpánica, en cambio el patrón de respuestas de las fibras de frecuencias bajas correspondería a vías de conducción extratimpánicas (Wang *et al.*,1996).

A nivel del sistema nervioso central, el núcleo más estudiado respecto a la direccionalidad de las respuestas neuronales es el *torus semicircularis*. Estudios con estimulación binaural, es decir, en que se estimula mediante audífonos separadamente a ambos oídos, han mostrado que alrededor de un 40% de las neuronas auditivas registradas en este centro son sensibles a la estimulación proveniente de ambos oídos (Kaulen *et al.*,1972; Hermes *et al.*,1982). Mediante estimulación de campo abierto, es decir a través de un parlante ubicado a distintos ángulos en el plano horizontal en relación a la cabeza del sujeto experimental, se ha demostrado que en *Rana pipiens*, alrededor de un 80% de las neuronas del *torus*

semicircularis responden con mayor número de descargas a estímulos provenientes del lado contralateral al sitio de registro.

Una proporción menor de neuronas, aproximadamente un 8%, responden máximamente a estímulos provenientes de ambos lados o a estímulos provenientes de posiciones frontales, el 9% restante no muestran cambios con la dirección del sonido (Feng, 1981). Esta especialización funcional es similar en las especies de anuros en que se ha explorado (Feng y Schellart, 1999) y también común a otros vertebrados (Bradbury y Vehrencamp, 1998), lo que indica un diseño conservativo del sistema nervioso central. No existe, sin embargo, un mapa espacial en el *torus semicircularis* como ha sido descrito por ejemplo en lechuzas y murciélagos (Suga, 1990; Konishi, 1994), por lo que la localización de sonidos en anuros probablemente depende de la actividad conjunta de distintas poblaciones neuronales (Feng y Schellart, 1999).

Estudios más recientes han demostrado que la dirección del sonido influencia la selectividad espectral y temporal de una proporción importante de neuronas del *torus semicircularis*. En particular, cuando la posición del parlante cambia de contralateral a ipsilateral, la selectividad a frecuencias y parámetros temporales de sonido aumenta progresivamente (Cooler *et al.*, 1993; Xu *et al.*, 1996). Este incremento en la selectividad espectral y temporal dependiente de la dirección del sonido, contribuiría al reconocimiento de señales de significado biológico en ambientes acústicos complejos (Feng y Schellart, 1999).

4.- HIPÓTESIS

Las neuronas auditivas mesencefálicas de machos de *E. calcaratus* que cantan desde el interior de cavidades, presentan respuestas direccionales de menor magnitud que las de especies que cantan en espacios abiertos estudiadas previamente.

5.- OBJETIVOS

5.1 Objetivo General.

Determinar el efecto de la dirección del sonido en las respuestas de neuronas auditivas mesencefálicas de machos del anuro *E. calcaratus*, que canta desde el interior de cavidades en pantanos y discutir la relevancia de estas respuestas para la comunicación en ambientes acústicos cerrados.

5.2 Objetivos Específicos.

1.- Determinar la direccionalidad de las respuestas de neuronas auditivas mesencefálicas de machos de *E. calcaratus* a estímulos con características temporales similares al canto de apareamiento y al canto agresivo de la especie.

2.- Discutir la relevancia de la direccionalidad de las respuestas neuronales para los resultados de experimentos comportamentales previos, que han mostrado una ausencia de direccionalidad en las respuestas vocales de esta especie.

3.- Comparar la direccionalidad de las respuestas neuronales de *E. calcaratus* con la de las respuestas neuronales de especies que se comunican en espacios abiertos estudiadas previamente.

6.- MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Sujetos experimentales.

Los ejemplares utilizados en este estudio fueron capturados en la X Región en la localidad de La Picada (Lat. 41°05'S, Long 72°30'W), entre el 29 y 30 de Junio de 2007. Los animales se encontraron bajo piedras y troncos en áreas de bosque templado y fueron transportados en un recipiente con aislación térmica al Laboratorio de Neuroetología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Los animales fueron ubicados en grupos de a 3 en terrarios debidamente identificados, que contenían sustrato del lugar de captura, al interior de una cámara con temperatura constante de 8 °C y ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas, siendo alimentados una vez por semana con larvas de tenebriónidos. Una vez utilizados, los animales fueron ubicados en acuarios individuales hasta que la herida operatoria cicatrizó, en el plazo de una semana aproximadamente.

6.2 Cirugía e instrumentación.

Se utilizaron 9 machos y 8 hembras de *E. calcaratus* cuyo peso corporal fluctuó entre 1,6 y 5,6 g. La identificación de sexo fue hecha por inspección quirúrgica de las gónadas después de haber realizado los registros neurofisiológicos, debido a que esta especie no presenta dimorfismo sexual evidente. Los animales fueron anestesiados por inmersión durante 2 a 3 minutos en una solución de metanosulfonato de tricaina (MS-222) al 0,6 %. Bajo el efecto de la anestesia, se procedía a perforar la pared dorsal del cráneo con una fresa dental bajo un microscopio quirúrgico hasta exponer el encéfalo, escindiendo las membranas encefálicas. Se permitió a los animales recuperarse de la anestesia durante 12 a 24 horas y luego los animales fueron inmovilizados con una inyección de d-tubocuranina (6 µg/g de peso corporal). Para realizar los registros neurofisiológicos, los sujetos fueron colocados sobre una placa de Peltier que mantenía la temperatura corporal entre 7 y 8 °C. Este dispositivo se encontraba sobre una mesa con amortiguación hidráulica, ubicada al centro de una cámara anecoica aislada, que tenía paredes cubiertas con cuñas de espuma de 50 cm. de largo. El registro de neuronas se realizaba en sesiones de seis a ocho horas de

duración. El animal era posicionado en el centro de rotación de un radio de 1 m de un parlante de 10 cm de diámetro. Sobre la cabeza del animal y con una separación de 1-2 mm de la superficie dorsal del cráneo se ubicaba el micrófono de un sonómetro (Bruel and Kjaer 2238) orientado hacia el frente del animal. Este instrumento permitía monitorear la presión de sonido de los estímulos dados desde distintos ángulos alrededor del animal y mantener constante la presión de sonido de los estímulos presentados desde estas direcciones, mediante un atenuador (PA 4, Tucker-Davis Technologies).

En el presente estudio con *E. calcaratus*, se registraron 61 neuronas (2 a 7 por animal). Se consideraron como unidades experimentales las neuronas individuales, debido a que sus propiedades de respuestas son altamente variables, sin embargo las proporciones de distintos tipos morfológicos y fisiológicos neuronales han resultado siempre similares en diferentes estudios realizados en una misma especie (Wilczynski y Endepols, 2007). Dada la dificultad de aislar una neurona en el mescencéfalo (tres neuronas por animal en promedio), durante un tiempo limitado por la inmovilización y la viabilidad del animal, los investigadores de esta área han convenido utilizar un rango arbitrario del número de neuronas registradas en el *torus semicircularis* de anuros que varía entre 40 (Penna *et al.*, 2001) y 80 (Gooler *et al.*, 1993).

6.3 Estímulos acústicos.

Los estímulos usados fueron generados por el programa SigGen y controlados por un computador Pentium III. Se presentaron 4 tipos de estímulos: el primero, denominado tono, correspondió a una imitación de la llamada de advertencia de la especie y consistía en un tono puro de 250 ms de duración y de frecuencia igual a aquella a que la neurona registrada era más sensible (frecuencia característica). El segundo estímulo, denominado estímulo pulsado, correspondía a una imitación de la llamada agresiva de la especie que fue sintetizado de acuerdo a los valores promedios de las características temporales de esta señal. Este estímulo estaba compuesto por tres notas, cada una de las cuales se componía de 8 pulsos de 5 ms de duración repetidos con intervalos de 10 ms. La amplitud del primer y último pulso era de 35%, el segundo y penúltimo pulso 50% y el tercer y antepenúltimo pulso 80% respecto a la amplitud de los dos pulsos centrales. La duración total de este estímulo era de 250 ms, y era sintetizado a partir de un tono con la frecuencia característica de la neurona registrada. Además de los dos estímulos tonales, se utilizaron dos estímulos de iguales características temporales al tono y al estímulo pulsado, pero en lugar de ser sintetizados a partir de un tono puro de frecuencia característica, fueron sintetizados en base a un ruido pasabanda, que contenía frecuencias entre 50 y 3050 Hz, y que por lo tanto, cubría todo el rango auditivo de la especie en estudio. Estos estímulos denominados ruido y ruido pulsado, respectivamente, fueron utilizados como controles de las diferencias espectrales inherentes a las distintas estructuras temporales de los estímulos tonales. En la Figura 4 se presentan oscilogramas y espectros de los cuatro estímulos. En los espectros se aprecia la mayor uniformidad entre los estímulos de ruido en relación a los estímulos tonales.

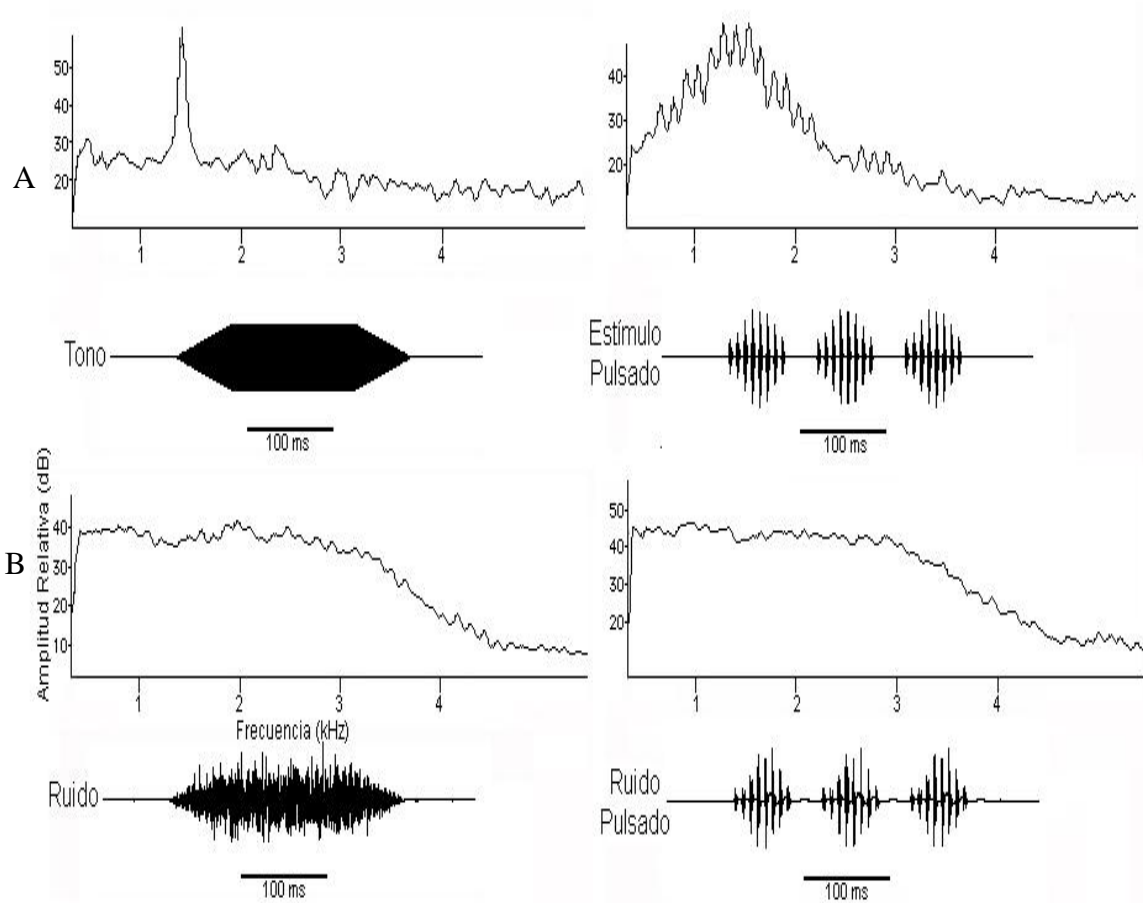


Figura 4: Estímulos utilizados en los experimentos de direccionalidad de respuestas neuronales en *E. calcaratus*. Los estímulos tonales (A) fueron sintetizados a partir de un tono de 1600 Hz y los estímulos de ruido (B) fueron sintetizados a partir de un ruido pasabanda que contenía frecuencias entre 50 y 3050 Hz.

Los sonidos fueron amplificados con un amplificador (NAD 3020i) y reproducidos por un parlante rotatorio de 10 cm de diámetro, desde el que se emitieron los estímulos, en distintas posiciones, separadas cada 30° en el hemisferio anterior del plano horizontal a un radio de 1 metro de distancia del sujeto experimental, como se muestra en la Figura 5.

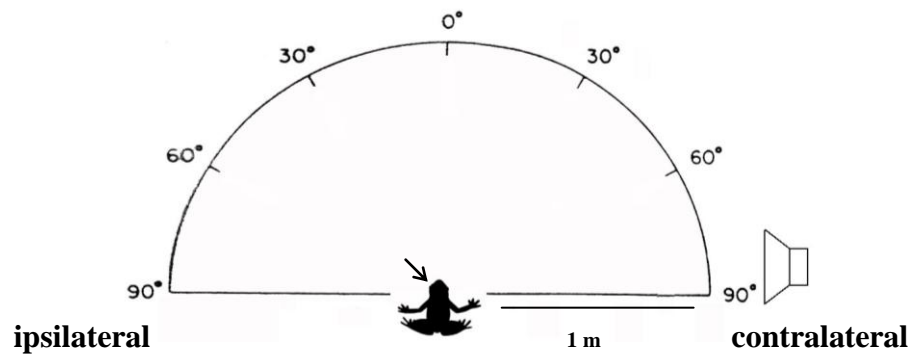


Figura 5: Ángulos de presentación de los estímulos en los experimentos de direccionalidad de respuestas neuronales en *Eupsophus calcaratus*. La flecha indica la posición del electrodo de registro en el hemisferio cerebral izquierdo.

6.4 Procedimientos de registro y protocolo experimental.

Las respuestas de las neuronas aisladas se registraron mediante electrodos de micropipetas de vidrio rellenas con Acetato de Potasio (0,38 g de Acetato de Potasio en 20 cc de una solución de buffer Tris 0,5 M y PH 7,6), con puntas de 1-2 μm e impedancia de 20-30 Megohms, fabricadas con un estirador de pipetas (Kopf 730). Las micropipetas se introdujeron en el mesencéfalo, guiadas por un micromanipulador hidráulico, mientras se daba el estímulo de búsqueda (ver más adelante). Las descargas fueron detectadas con un pre-amplificador (Dagan 2400), monitoreadas con un osciloscopio (EZ OS 5020) y procesadas con el sistema Tucker-Davis II, utilizando el programa Brainware. Los registros se guardaron en discos compactos y fueron analizados con el sistema Tucker-Davis y un computador Pentium III.

La estimulación se iniciaba con el parlante ubicado en la posición 90° contralateral al hemisferio de registro. Se utilizó como estímulo de búsqueda el estímulo de ruido pulsado, con el fin de estimular cualquier neurona auditiva presente en la trayectoria del electrodo. Una vez aislada la neurona, se procedió a identificar su frecuencia característica, que correspondía a aquella a la cual ésta tenía un umbral de respuesta más bajo. Esto se hizo

emitiendo una serie de tonos puros de distintas frecuencias, reduciendo la intensidad con que se presentaban en pasos de 3 dB y estableciendo como frecuencia característica, aquella a la cual la neurona persistía respondiendo a la menor intensidad. En seguida se determinó el umbral de respuesta al estímulo pulsado con la misma frecuencia característica, siguiendo el mismo procedimiento que con el tono puro. Luego de establecer ambos umbrales, se fijó la intensidad de los estímulos en 20 dB sobre los respectivos umbrales. Se escogió este nivel para hacer comparables los resultados a estudios previos de direccionalidad de respuestas neurales en otras especies de anuros (Feng y Capranica, 1976). Posteriormente se hacía rotar el parlante, deteniéndolo cada 30° para dar los estímulos y obtener respuestas de la neurona registrada.

Para cada ángulo se emitieron 20 repeticiones de cada estímulo. El orden de presentación de los estímulos fue: tono, estímulo pulsado, ruido y ruido pulsado. Luego de completar la presentación desde distintos ángulos para cada estímulo, se hacía rotar el parlante en dirección opuesta para obtener respuestas al estímulo siguiente. Debido a que la presentación de los 4 estímulos tomaba aproximadamente 45 minutos, se completaron registros para un número de neuronas decreciente para los sucesivos estímulos. Para las neuronas que se mantuvieron en registro hasta concluir la presentación de los cuatro estímulos, se realizó un control final, repitiendo el primer estímulo desde la posición inicial.

6.5 Análisis de datos.

El número de potenciales de acción (espigas) producidos por las neuronas en respuesta a 20 presentaciones, y la latencia de respuesta de la primera espiga fueron las variables cuantificadas.

El recuento de espigas se hizo durante un intervalo de 350 ms, que se iniciaba a un tiempo igual a la latencia de respuesta de la neurona, a un determinado estímulo en la posición 90° contralateral. Se consideró este tiempo debido a que algunas neuronas persistían respondiendo una vez finalizado el estímulo.

Se construyeron histogramas post estímulo con el total de espigas evocadas por 20 presentaciones de un estímulo desde cada posición del parlante. El número de espigas obtenidas en respuesta a la presentación de un estímulo a los 7 distintos ángulos fue graficado para luego determinar el tipo de direccionalidad con que la neurona respondía a un estímulo específico. Para determinar la direccionalidad de las respuestas de cada neurona a cada estímulo, se consideró como criterio de respuesta direccional, diferencias superiores al 50% en el número de espigas entre distintas posiciones del parlante.

Para determinar si habían diferencias entre la proporción de neuronas que respondían con distintos tipos de respuestas direccionales a los diversos estímulos utilizados, se utilizó la prueba de χ^2 de tendencias (Epiinfo 2000 1.0.3), la cual además se usó para determinar si había diferencias entre las proporciones de respuestas a un mismo estímulo entre individuos de ambos sexos. También se utilizó esta prueba para comprobar si existían diferencias de respuesta direccional entre las neuronas con patrones de descarga fásicos y tónicos, y entre neuronas de frecuencias características bajas y altas.

Además, para comparar la direccionalidad de las respuestas contralaterales a los distintos estímulos, se calcularon las pendientes lineales de las curvas obtenidas de los gráficos, del número de espigas en relación a la posición angular del parlante. Este análisis fue hecho para las neuronas que presentaron una respuesta contralateral a algunos de los cuatro estímulos, comparándolas con la pendiente de los otros estímulos. Las pendientes se calcularon con el programa Deltagraph 4.5.

Para establecer si existía alguna relación entre el número de espigas y la latencia de respuesta, se hicieron correlaciones de Spearman utilizando el programa Statview 5.0 para las respuestas de cada neurona a la presentación de un estímulo a los siete distintos ángulos.

Se compararon los umbrales de respuesta entre neuronas de frecuencia característica baja y alta y entre neuronas tónicas y fásicas para el tono y el estímulo pulsado con la prueba de Mann-Whitney ($P < 0,05$). También se usó esta prueba para comparar las frecuencias

características de neuronas fásicas y tónicas. La prueba de rangos de Wilcoxon ($P < 0,05$) fue utilizada para comparar los umbrales de respuestas de todas las neuronas al tono y al estímulo pulsado y para comparar las latencias de respuesta de todas las neuronas a los cuatro estímulos. También se utilizó esta prueba para comparar el número de espigas y el tiempo de latencia entre el primer estímulo y el estímulo control final para las neuronas en que se completaron los registros a los cuatro estímulos.

7.- RESULTADOS

7.1 Características generales de las respuestas neuronales

Se obtuvieron respuestas a la presentación de estímulos desde los 7 ángulos considerados para los estímulos de tono, estímulo pulsado, ruido y ruido pulsado en 61, 50, 39 y 37 neuronas, respectivamente.

De las 61 neuronas registradas, 49 presentaron frecuencias características entre 100 y 400 Hz (promedio = 271 Hz) y 12 entre 1300 y 1700 Hz (promedio = 1475 Hz). Los umbrales de respuesta para neuronas de frecuencias bajas se situaron en un rango de 34-71 dB SPL (promedio = 50,8 dB SPL) para el tono y entre 37-72 dB SPL (promedio = 51,9 dB SPL) para el estímulo pulsado, en tanto que para las neuronas de frecuencias altas, los umbrales fueron entre 42-68 dB SPL (promedio = 50,4 dB SPL) para el tono y entre 42-67 dB SPL (promedio = 51 dB SPL) para el estímulo pulsado. Los umbrales de ambos tipos de neuronas fueron similares para el tono (Prueba U de Mann-Whitney, $U = -0,250$, $P = 0,803$) y para el estímulo pulsado (Prueba U de Mann-Whitney, $U = -0,261$, $P = 0,794$).

Al compararse todas las neuronas, los umbrales para el tono (rango = 34-71 dB SPL; promedio = 50,7 dB SPL) fueron significativamente más bajos que para el estímulo pulsado (rango = 37-72 dB SPL; promedio = 51,7 dB SPL) (Prueba de rangos de Wilcoxon, $T = -2,240$, $P = 0,025$). En la Figura 6 se muestran las frecuencias características de las neuronas registradas y sus umbrales al tono y al estímulo pulsado.

En respuesta a los tonos puros, las neuronas registradas mostraron dos patrones temporales de descarga. Un grupo correspondió a neuronas tónicas, que respondían durante toda la presentación del estímulo ($n = 49$; 80,3%) y el otro grupo correspondió a neuronas fásicas, que descargaban con una o unas pocas espigas, generalmente al comienzo del estímulo ($n = 12$; 19,7%). En la Figura 7 se muestran ejemplos de ambos patrones de respuesta.

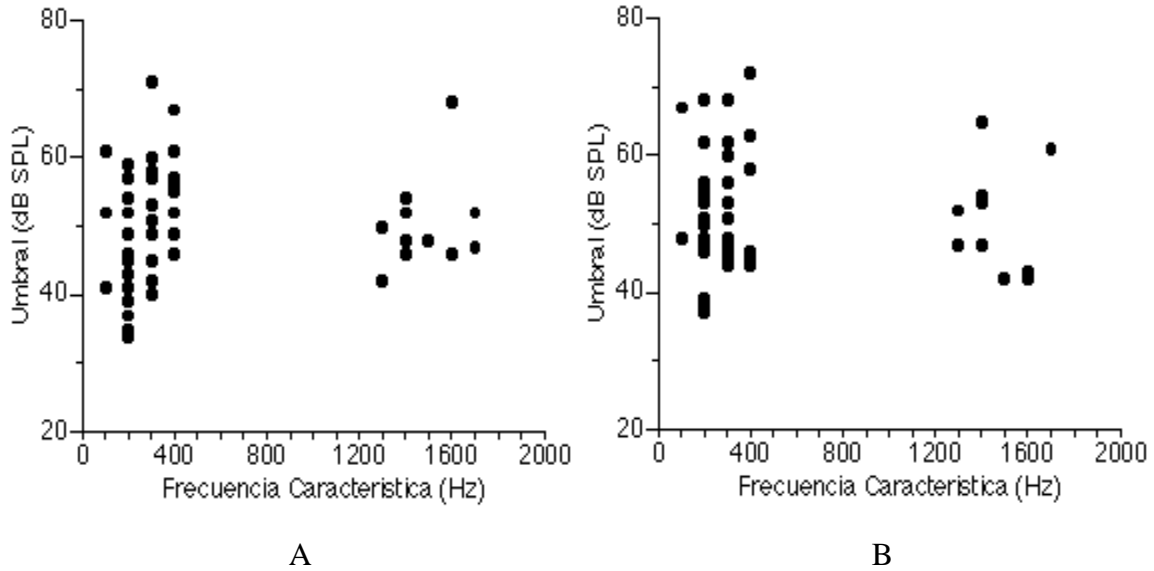


Figura 6: Frecuencias características y umbrales de respuesta en 61 neuronas del *torus semicircularis* de *E. calcaratus* al tono (A) y al estímulo pulsado (B).

El patrón de descarga temporal y la frecuencia característica de las neuronas no estaban relacionados; de las 49 neuronas tónicas, 38 tenían frecuencias características bajas y 11 altas. Y de las 12 neuronas fásicas, 11 tenían frecuencias características bajas y una alta. Los promedios de frecuencias características de ambos tipos de unidades (fásicas = 423,1 Hz ; tónicas = 536,8 Hz), fueron similares (Prueba U de Mann-Whitney, $U = -0,996$, $P = 0,319$).

Para las neuronas fásicas, los umbrales de respuesta fueron 45-61 dB SPL (promedio = 54,7 dB SPL) al tono y 47-65 dB SPL (promedio = 54 dB SPL) al estímulo pulsado y para las neuronas tónicas, los umbrales de respuesta fueron 34-71 dB SPL (promedio = 49,7 dB SPL) al tono puro y 32-77 dB SPL (promedio = 51,4 dB SPL) al estímulo pulsado. Los umbrales para el tono de las neuronas fásicas, fueron mayores que los de las neuronas tónicas (Prueba U de Mann-Whitney, $U = -2,435$, $P = 0,015$) en tanto que los umbrales de ambos tipos de neuronas fueron similares para el estímulo pulsado (Prueba U de Mann-Whitney, $U = -1,137$, $P = 0,255$).

Las neuronas registradas respondieron con latencias muy diferentes a los distintos estímulos. El promedio para el tono fue 119,8 ms (rango = 51,6-291,1 ms), para el estímulo pulsado 106,7 ms (rango = 40,9-288,1 ms), para el ruido 156,0 (rango = 55,4-346,0 ms) y para el ruido pulsado 164,3 ms (rango 43,0-443,5 ms). La prueba de rangos de Wilcoxon para comparar las latencias obtenidas entre diferentes estímulos indicó que la latencia al estímulo pulsado fue significativamente menor que al tono (Prueba de rangos de Wilcoxon, $T = -3,625$; $P = 0,003$) y al ruido pulsado (Prueba de rangos de Wilcoxon, $T = -4,111$; $P < 0,0001$). Además, la latencia al tono fue significativamente menor que la latencia al ruido (Prueba de rangos de Wilcoxon, $T = -3,182$; $P = 0,002$). Las latencias al ruido y al ruido pulsado no difirieron significativamente (Prueba de rangos de Wilcoxon, $T = -1,000$; $P = 0,317$).

Las latencias de neuronas fásicas y tónicas para un mismo estímulo fueron comparadas con la prueba de Mann Whitney, no obteniéndose diferencias significativas para ninguno de los 4 estímulos ($P > 0,1044$ para todas las comparaciones).

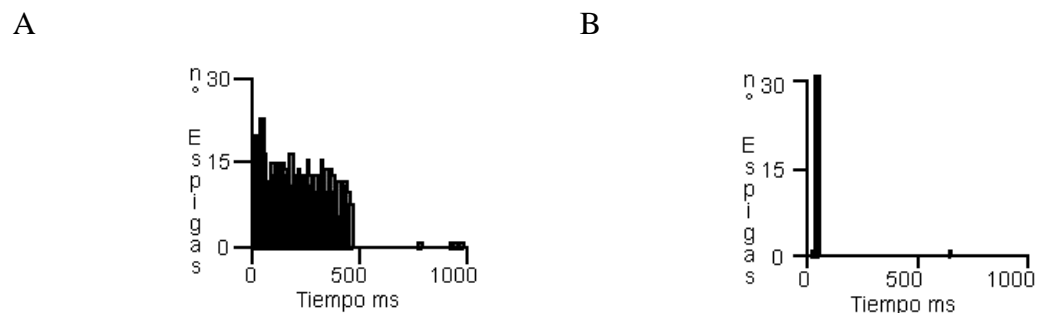


Figura 7: Patrones de descarga temporal. A: neurona tónica B: neurona fásica.

7.2 Direccionalidad de las respuestas neuronales

Las neuronas registradas respondieron siguiendo 6 distintos patrones: contralateral, ipsilateral, en forma de V, de V invertida, compleja y sin respuesta direccional. Las neuronas fueron clasificadas según el tipo de respuesta a los diferentes estímulos para machos y hembras en forma separada (Tabla 1).

Tabla 1: Número de neuronas según tipo de respuesta direccional en el *torus semicircularis* de *E. calcaratus* para machos y hembras. Abreviaciones: C: Contralateral, I: Ipsilateral, V: en V, VI: en V invertida, ND: No direccional, CJ: Compleja. Porcentajes entre paréntesis.

A	<u>Estímulo</u>	Machos						total
		C	I	V	VI	CJ	ND	
	Tono	12 (48,0)	1 (4,0)	8 (32,0)	0 (0,0)	1 (4,0)	3 (12,0)	25 (100)
	Estímulo Pulsado	7 (33,3)	0 (0,0)	7 (33,3)	4 (19,0)	3 (14,3)	0 (0,0)	21 (100)
	Ruido	11 (55,0)	2 (10,0)	4 (20,80)	1 (5,0)	1 (5,0)	1 (5,0)	20 (100)
	Ruido Pulsado	6 (35,3)	0 (0,0)	5 (29,4)	2 (11,8)	2 (11,8)	2 (11,8)	17 (100)

B	<u>Estímulo</u>	Hembras						total
		C	I	V	VI	CJ	ND	
	Tono	20 (55,5)	0 (0,0)	14 (38,8)	1 (2,7)	1 (2,7)	0 (0,0)	36 (100)
	Estímulo Pulsado	11 (36,6)	1 (3,3)	9 (30,0)	3 (10,0)	5 (16,6)	1 (3,3)	30 (100)
	Ruido	12 (63,2)	0 (0,0)	2 (10,5)	2 (10,5)	3 (15,8)	0 (0,0)	19 (100)
	Ruido Pulsado	14 (73,7)	0 (0,0)	1 (5,3)	1 (5,3)	2 (10,5)	1 (5,3)	19 (100)

Se realizó una prueba de χ^2 de contingencia para comparar las proporciones de respuestas entre machos y hembras a un mismo estímulo, no encontrándose diferencias significativas para ninguno de los 4 estímulos (Tabla 2), por lo que los datos de animales de ambos sexos fueron analizados en conjunto.

Tabla 2: Comparación de prueba de χ^2 de contingencia entre machos y hembras.

<u>Estímulo</u>	χ^2	P
Tono	0,807	0,368
Estímulo Pulsado	0,01	0,922
Ruido	0,013	0,907
Ruido Pulsado	3,029	0,082

Al ser analizadas las neuronas de machos y hembras en conjunto, se observó que en respuesta al tono, 52,5 % de las neuronas respondió con un patrón contralateral, 36,2 % en V y 4,9 % respondió de manera no direccional. Las otras proporciones fueron: ipsilateral 1,6 %, en V invertida 1,6 % y complejo 3,3 %. En contraste, en respuesta al estímulo pulsado, sólo 36,0 % de las neuronas respondió de forma contralateral y 0,0 % en forma no direccional, 2,0 % en forma ipsilateral, 32,0 % en V, 14,0 % en V invertida y 16,0 % en forma compleja. Para los estímulos de tono con ruido y ruido pulsado la tendencia fue similar a la presentada al tono puro, ya que más de la mitad de las neuronas respondieron en forma contralateral a estos estímulos. Las respuestas en V fueron alrededor del 15,5 % para el ruido y el ruido pulsado. Las respuestas no direccionales no superaron el 10,8 %, y en términos absolutos presentaron muy pocas neuronas (Tabla 3).

En la Fig 8 se esquematiza un ejemplo de neurona de respuesta contralateral y en Fig 9 de respuesta en V.

Tabla 3. Número de neuronas según tipo de respuesta direccional en el *torus semicircularis* de *E. calcaratus* (porcentajes entre paréntesis). Abreviaciones como en la Tabla 1.

Estímulo	Tipo de Respuesta						total
	C	I	V	VI	CJ	ND	
Tono	32 (52,5)	1 (1,6)	22 (36,2)	1 (1,6)	2 (3,3)	3 (4,9)	61 (100)
Estímulo Pulsado	18 (36,0)	1 (2,0)	16 (32,0)	7 (14,0)	8 (16,0)	0 (0,0)	50 (100)
Ruido	23 (59,0)	2 (5,1)	6 (15,4)	3 (7,7)	4 (10,3)	1 (2,6)	39(100)
Ruido pulsado	20 (54,1)	0 (0,0)	6 (16,2)	3 (8,1)	4 (10,8)	4 (10,8)	37 (100)

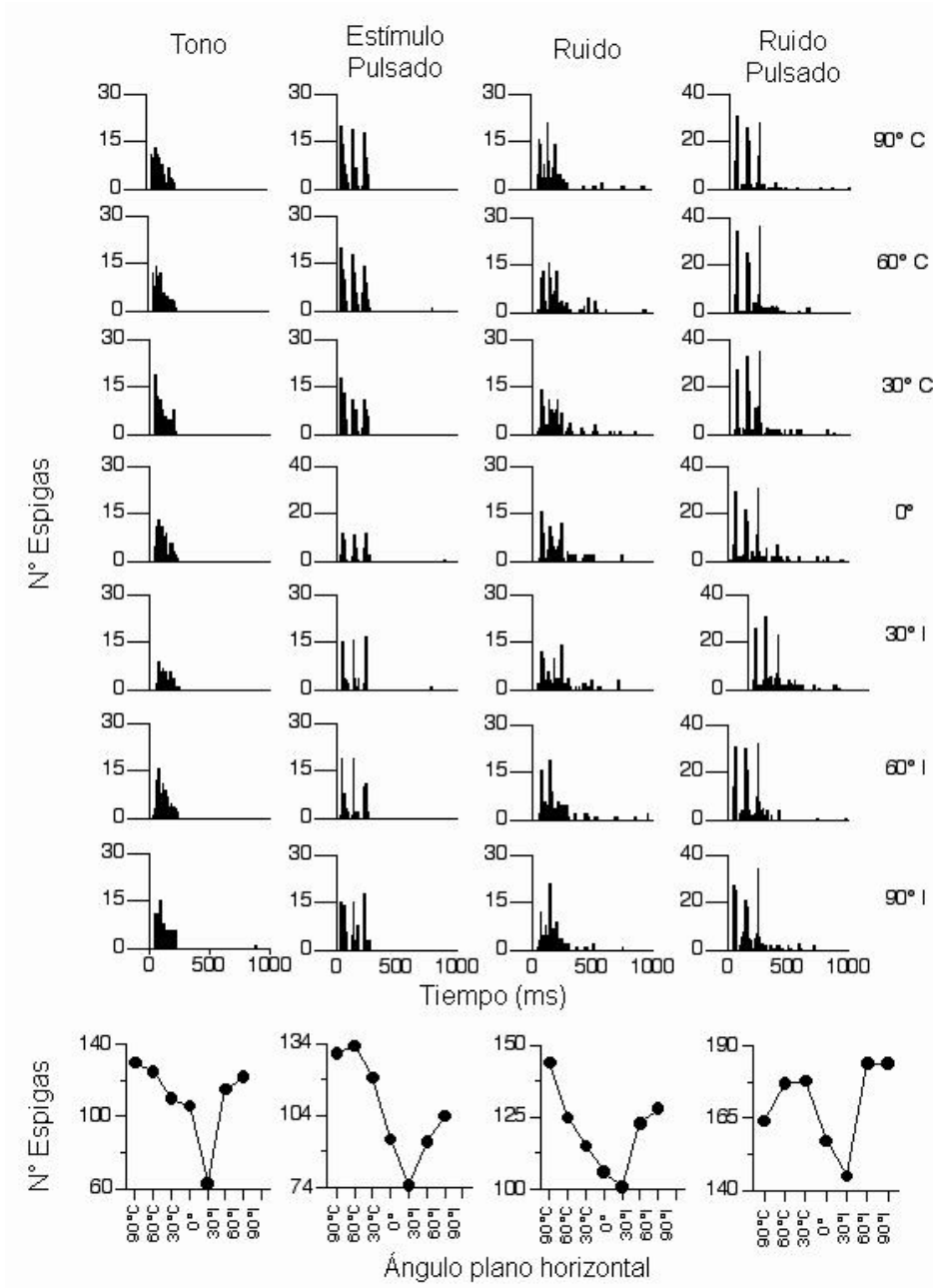


Figura 8: Ejemplo de neurona con respuesta de tipo contralateral a los cuatro estímulos. En la parte superior de la figura se presentan los histogramas de las descargas neuronales en respuesta a la presentación de los distintos estímulos desde cada una de las posiciones del parlante. En la parte inferior se presentan gráficos (funciones de transferencia) del total de espigas producidas para cada una de las posiciones a los distintos estímulos. (Neurona tónica, frecuencia característica: 300 Hz). (Abreviaciones C: Contralateral; I: Ipsilateral).

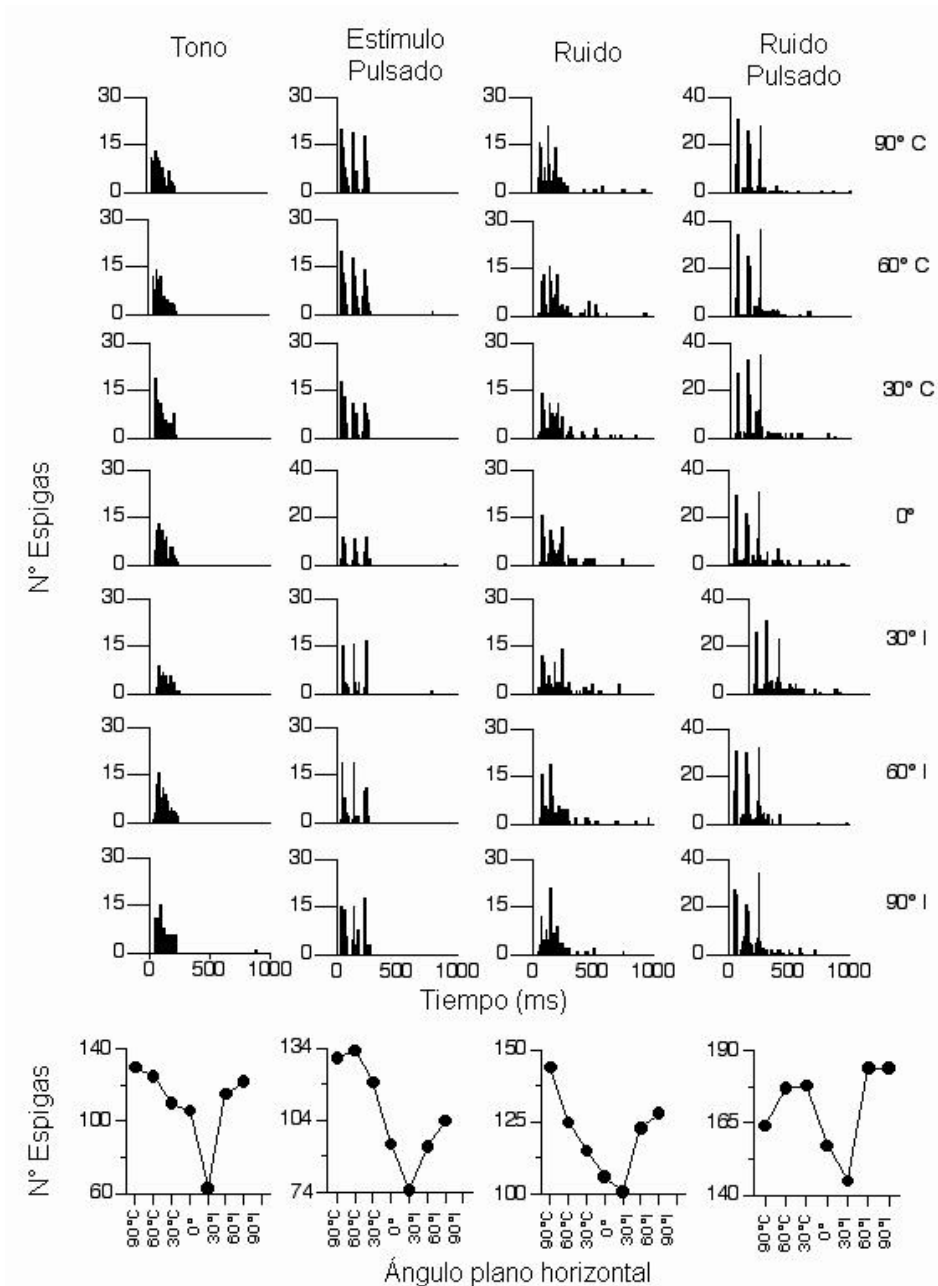


Figura 9: Ejemplo de neurona con respuesta de tipo en V a los cuatro estímulos. En la parte superior de la figura se presentan los histogramas de las descargas neuronales en respuesta a la presentación de los distintos estímulos desde cada una de las posiciones del parlante. En la parte inferior se presentan gráficos (funciones de transferencia) del total de espigas producidas para cada una de las posiciones a los distintos estímulos. (Neurona tónica, frecuencia característica: 400 Hz). (Abreviaciones C: Contralateral; I: Ipsilateral).

Las proporciones de neuronas que respondieron con distintos patrones de direccionalidad fueron diferentes entre los estímulos de tono y estímulo pulsado, (Prueba de χ^2 de tendencia = 3,911, P = 0,047). Las otras cinco comparaciones entre estímulos no alcanzaron valores estadísticamente significativos (Prueba de χ^2 de tendencia = P > 0,071 para la comparación ruido/estímulo pulsado y P > 0,260 para las otras cuatro comparaciones)

En respuesta al tono presentado desde la posición inicial como control de posibles cambios en la respuesta de neuronas en el tiempo, no hubo diferencias significativas para el número de espigas (Prueba de rangos de Wilcoxon: T = -1,493, P = 0,135), ni para las latencias (Test de rangos de Wilcoxon: T = -1,179, P = 0,238).

Al considerar las proporciones de respuestas neuronales a los cuatro estímulos en relación al patrón de descarga temporal, se observó que las neuronas fásicas respondieron con mayor proporción de respuestas contralaterales a los cuatro estímulos que las neuronas tónicas. También se aprecia una menor proporción de respuestas en V a los estímulos de tono, estímulo pulsado y ruido pulsado las neuronas fásicas.

Sin embargo, dado el bajo número de neuronas fásicas registradas, las comparaciones no alcanzaron niveles de significación para ninguno de los 4 estímulos (Prueba de χ^2 para tendencia = P > 0,263 para todas las comparaciones). Estos datos se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4 : Número de neuronas según tipo de respuesta direccional en el *torus semicircularis* de *E. calcaratus* de acuerdo a su patrón temporal de descarga. Abreviaciones como en la Tabla 1.

Estímulo	Tipo de respuesta para neuronas tónicas						
	C	I	V	VI	CJ	ND	total
Tono	24 (48,9)	1 (2,0)	20 (40,8)	0 (0)	1 (2,0)	3 (6,1)	49 (100)
Estímulo Pulsado	15 (34,1)	1 (2,3)	15 (34,1)	7 (15,9)	5 (11,4)	1 (2,3)	44 (100)
Ruido	19 (55,9)	2 (5,9)	5 (14,7)	3 (8,8)	4 (11,8)	1 (2,9)	34 (100)
Ruido Pulsado	16 (51,6)	0 (0)	6 (19,4)	3 (9,7)	3 (9,7)	3 (9,7)	31 (100)

Estímulo	Tipo de respuesta para neuronas fásicas						
	C	I	V	VI	CJ	ND	total
Tono	8 (66,6)	0 (0,0)	2 (16,6)	1 (8,3)	1 (8,3)	0 (0)	12 (100)
Estímulo Pulsado	3 (42,9)	0 (0,0)	1 (14,3)	0 (0,0)	3 (42,9)	0 (0)	7 (100)
Ruido	4 (80,0)	0 (0,0)	1 (20,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0)	5 (100)
Ruido Pulsado	4 (80,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (20,0)	0 (0)	5 (100)

Al considerar las proporciones de respuestas direccionales a los cuatro estímulos utilizados en relación a la sintonización a frecuencias de las neuronas, la proporción de respuestas contralaterales a los 4 estímulos fue aproximadamente el doble en las neuronas de frecuencias altas que en las neuronas de frecuencias bajas. En cambio las respuestas en V alcanzaron valores muy superiores para las neuronas de bajas frecuencias. Las neuronas no direccionales fueron un porcentaje reducido, de alrededor del 10% tanto para neuronas de frecuencias altas como bajas. Las comparaciones hechas para un mismo estímulo entre las neuronas de frecuencias altas y bajas alcanzaron valores significativos para el tono (Prueba de χ^2 de tendencia = 6,119, P = 0,013) y para el estímulo pulsado (Prueba de χ^2 de tendencia = 6,747, P = 0,009). Las comparaciones para el ruido y ruido pulsado no alcanzaron niveles significativos (Prueba de χ^2 de tendencia = P > 0,086, respectivamente).

Tabla 5 : Número de neuronas según tipo de respuesta direccional en el *torus semicircularis* de *E. calcaratus* de acuerdo a su frecuencia característica. Abreviaciones como en la Tabla 1.

Tipo de respuesta para neuronas de frecuencias altas							
Estímulo	C	I	V	VI	CJ	ND	total
Tono	10 (83,3)	1 (8,3)	1 (8,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	12 (100)
Estímulo Pulsado	7 (77,7)	0 (0,0)	1 (11,1)	1 (11,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	9 (100)
Ruido	9 (90,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (10,0)	0 (0,0)	10 (100)
Ruido Pulsado	7 (77,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (11,1)	1 (11,1)	9 (100)

Tipo de respuesta para neuronas de frecuencias bajas							
Estímulo	C	I	V	VI	CJ	ND	total
Tono	22 (44,9)	0 (0,0)	21 (42,9)	1 (2,0)	2 (4,1)	3 (6,1)	49 (100)
Estímulo Pulsado	11 (26,8)	1 (2,4)	15 (36,6)	6 (14,6)	8 (19,5)	0 (0,0)	41 (100)
Ruido	14 (48,3)	2 (6,9)	6 (20,7)	3 (10,3)	3 (10,3)	1 (3,4)	29 (100)
Ruido Pulsado	13 (46,4)	0 (0,0)	6 (21,4)	3 (10,7)	3 (10,7)	3 (10,7)	28 (100)

Además de la clasificación de las neuronas según patrones de direccionalidad de sus respuestas, se midieron las pendientes de las curvas obtenidas en los gráficos de aquellas que respondieron con patrón contralateral a un determinado estímulo y se comparó esta pendiente con las de las curvas obtenidas para las respuestas a otros estímulos.

La comparación de pendientes entre el número de espigas y ángulo de presentación de estímulo obtenidas en respuesta a los cuatro estímulos utilizados, para neuronas que respondieron en forma contralateral al menos a un estímulo, no presentó diferencias significativas (Prueba de rangos de Wilcoxon $P > 0,05$ para las cuatro comparaciones).

Las comparaciones de las pendientes entre los cuatro estímulos se presentan en la Figura 8.

Además se exploraron relaciones entre las dos variables medidas en las respuestas neuronales: el número de espigas y la latencia de respuestas mediante coeficientes de correlación de Spearman, entre estas variables para las distintas neuronas en respuestas a estimulaciones desde distintos ángulos para los cuatro estímulos utilizados. La mayoría de

las latencias variaron de forma inversamente proporcional al conteo de espigas para los 4 estímulos (Tabla 6).

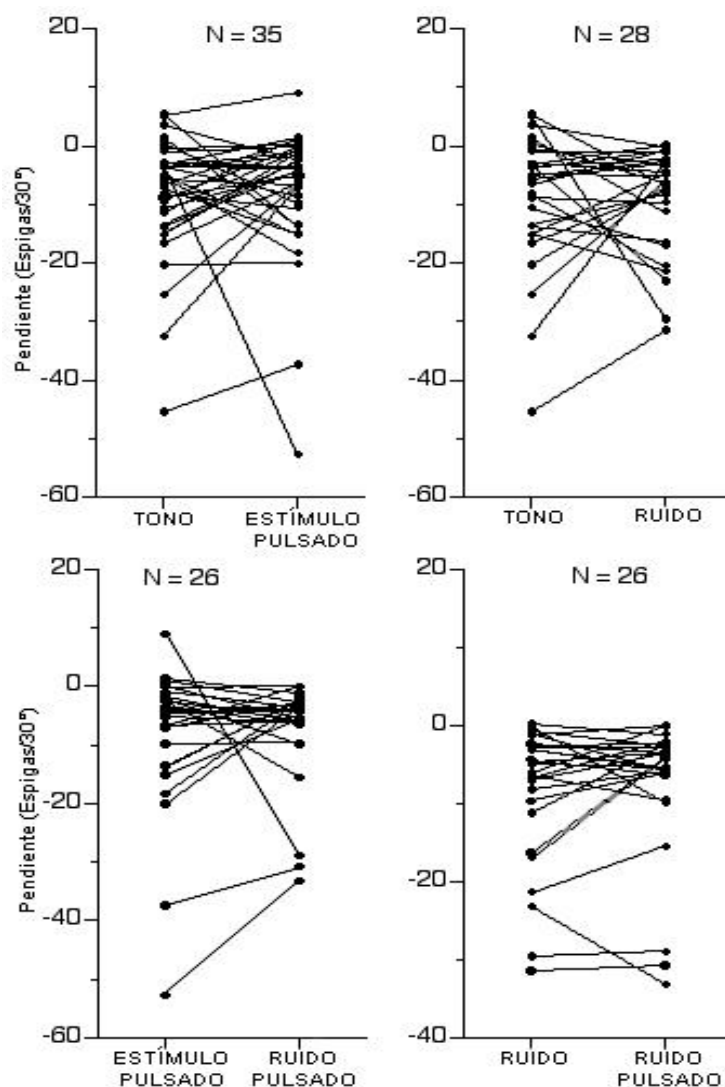


Figura 10: Comparaciones de pendientes lineales de la relación: de número de espigas /posición angular del parlante, entre los cuatro estímulos utilizados.

Tabla 6: Proporciones de coeficientes de correlación de Spearman entre número de espigas y latencias en respuestas neuronales direccionales a cuatro estímulos. Los números entre paréntesis corresponden a correlaciones significativas.

ρ	Tono	Estímulo Pulsado	Ruido	Ruido Pulsado
Negativos	54(26)	40 (19)	27 (9)	31 (9)

Positivos	7	10	12	6
Total	61	50	39	37

8.- DISCUSIÓN

8.1 Características generales de las respuestas neuronales.

Las características generales de las respuestas neuronales registradas en el *torus semicircularis* de *E. calcaratus* son similares a las encontradas en otras especies de anuros. En *E. calcaratus* existen dos poblaciones neuronales, sintonizadas a bajas y altas frecuencias, que corresponden a las sensibilidades de los dos órganos auditivos del oído interno, la papila anfibia y la papila basilar, respectivamente (Lewis y Narins, 1999). Las neuronas de frecuencias altas están en el rango de las frecuencias dominantes del canto de esta especie (Márquez et al. 2005; Penna et al. 2005). Esta correspondencia es similar a la encontrada en diversos anuros (Gerhardt y Huber, 2002).

En *E. calcaratus* la mayor parte de las neuronas registradas (80,3 %) estaban sintonizadas a frecuencias bajas, en tanto aquellas sintonizadas a frecuencias altas se encuentran en una baja proporción (19,7 %). Esta proporción es similar a la que existe en *Rana pipiens* (Goense y Feng, 2005) y en otros anuros (Penna et al. 1997, 2001). En relación al patrón temporal de descarga, 80,3 % eran tónicas y sólo 19,7 % eran fásicas lo cual también se aproxima a las proporciones encontradas en otros anuros (Feng, 1981; Goense y Feng, 2005; Penna et al., 1997, 2001).

Las latencias de las respuestas de las neuronas tónicas y fásicas a un mismo estímulo fueron similares, en cambio las latencias de respuesta a diferentes estímulos difirieron significativamente. La más pronta respuesta al estímulo pulsado en relación al tono podría deberse al ascenso más rápido en amplitud que tienen los pulsos individuales del estímulo pulsado y las latencias más prolongadas para los estímulos de ruido, a la menor proporción de energía que estas señales tienen en relación a los estímulos de tono a la frecuencia característica de una determinada neurona. En otros anuros, una proporción importante de las neuronas auditivas mesencefálicas responden preferentemente a estímulos de ascenso rápido (Adler y Rose, 2000).

8.2 Direccionalidad de las respuestas neuronales.

Las respuestas neuronales a estímulos provenientes de distintas localizaciones en el plano horizontal fueron similares entre hembras y machos de *E. calcaratus*, lo que indica una ausencia de dimorfismo sexual para esta función auditiva, validando el análisis en conjunto de los datos de individuos de ambos sexos.

Los patrones de respuestas de las neuronas a estímulos dados desde distintas localizaciones de la fuente sonora en el plano horizontal fueron diversos. En respuesta al tono puro y a los estímulos de ruido, un poco más de la mitad de las neuronas respondieron con mayor número de descargas a posiciones contralaterales de la fuente sonora respecto al hemisferio cerebral registrado. La proporción de respuestas contralaterales al estímulo pulsado sin embargo, fue menor; alrededor de un tercio de las neuronas presentaron esta condición.

Las proporciones de respuestas contralaterales de las neuronas de *E. calcaratus* guardan algunas similitudes con las del anuro *Pleurodema thaul*, según lo encontrado en un estudio desarrollado en forma paralela (Bravo, 2008). Sin embargo existen importantes diferencias entre estas dos especies; en *E. calcaratus*, la mayor proporción de neuronas que dan respuestas contralaterales al tono - que imita a la llamada de advertencia - en relación al estímulo pulsado - que imita a la llamada agresiva - sugiere que el sistema auditivo de este anuro tiene la capacidad de localizar mejor señales usadas en la comunicación a distancia en relación a señales que se ocupan en la comunicación entre individuos muy próximos. En cambio *Pleurodema thaul*, que posee un canto de advertencia pulsado, las respuestas neuronales del *torus semicircularis* presentan mayor direccionalidad para un estímulo pulsado, al cual 44 % responden en forma contralateral, en cambio sólo un 27 % de las neuronas responden de esta forma a tonos. La diferencia en la direccionalidad entre ambas especies a estos estímulos y su correspondencia con las llamadas de comunicación a

distancia sugieren la existencia de una especialización del sistema auditivo para la localización de sonidos de significado biológico en distintas especies de anuros.

En *E. calcaratus* la proporción de respuestas contralaterales a los estímulos de ruido son similares a las de las respuestas al tono. Esta importante respuesta contralateral podría estar dada por el amplio espectro de estos dos sonidos, ya que diversos estudios han mostrado que las respuestas auditivas direccionales a estímulos compuestos de ruido son más precisas; por ejemplo en un estudio clásico en lechuzas se ha determinado que los estímulos con ruido son localizados con una precisión tres veces superior a estímulos tonales (Knudsen y Konishi, 1979). En todo caso, los porcentajes de respuestas contralaterales a todos los estímulos usados en este estudio son inferiores a la proporción de neuronas que respondieron en forma contralateral en la rana Norteamericana *Rana pipiens*, en que cerca de un 80% de las neuronas responde de esta manera (Feng, 1981).

Una considerable proporción de las neuronas (alrededor de un tercio) dieron respuestas direccionales en forma de V para el tono y estímulo pulsado. pero las respuestas en V a los estímulos de ruido fueron alrededor de la mitad de esta proporción. Las proporciones de neuronas que respondieron en forma de V invertida fueron bajas, de alrededor de un 10 % para todos los estímulos. Las proporciones de neuronas que respondieron con estos modos de respuesta son considerablemente mayores que las encontradas en *R. pipiens*, en que alrededor de un 8% presentaron respuestas de tipo V o V invertida (Feng, 1981). En *P. thaul* la proporción de neuronas de tipo V también es reducida, de alrededor de un 10%, Este tipo de neuronas determina una mayor sensibilidad para estímulos presentados en forma lateral que frente al animal. Se podría especular que la dotación de neuronas de este tipo en *E. calcaratus* está en relación con el ambiente de ondas estacionarias al interior de cavidades desde las que cantan los machos de esta especie, para los que no resulta relevante responder a fuentes sonoras localizadas enfrente del sujeto, como podría serlo para animales que se comunican en espacios abiertos.

Las proporciones de neuronas que no respondieron direccionalmente a los estímulos en *E. calcaratus* fue considerablemente reducida, con porcentajes inferiores al 10% para todos

los estímulos. Esta proporción es similar a la reportada por Feng (1981) para *R. catesbeiana*, lo cual indica que *E. calcaratus* posee una capacidad de detección de dirección de sonidos similar al de esta especie, y que la condición de comunicarse en ambientes de ondas estacionarias no ha afectado en general esta capacidad propia del diseño básico del sistema auditivo de vertebrados. Paradojalmente, en el estudio de Bravo (2008) se encontró una mayor proporción de respuestas no direccionales en *P. thaul* (16% a estímulo pulsado y 40% a tonos). Esta condición es contrastante con la presunción de que especies que se comunican en ambientes resonantes de ondas estacionarias tendrían respuestas neurales con menor direccionalidad.

Al analizarse la direccionalidad de respuestas según el patrón de descarga temporal, se observó que las neuronas fásicas respondieron con mayor proporción de respuestas contralaterales a los cuatro estímulos en relación a las neuronas tónicas, sin embargo las comparaciones no alcanzaron valores significativos. En *P. thaul* existe una tendencia opuesta, es decir las neuronas tónicas presentan una mayor direccionalidad contralateral que las fásicas y estas diferencias son significativas (Bravo, 2008). Es posible que esta aparente diferencia tenga relación con una especialización de las neuronas fásicas en *P. thaul* para procesar la modulación de amplitud de sus señales, pero el bajo número de neuronas fásicas obtenidas en *E. calcaratus* hace ser cauteloso en interpretar los datos.

Al analizarse la direccionalidad de respuestas según sintonización a frecuencias, se encontró que existe una mayor proporción de respuestas contralaterales para los cuatro estímulos en neuronas de frecuencias altas en relación a las neuronas de frecuencias bajas. Esta diferencia probablemente está en relación con diferencias en la intensidad con que los estímulos llegan a ambos oídos, ya que el efecto de atenuación de la cabeza es siempre menor para frecuencias mas bajas (Yost, 2007). La mayor proporción de respuestas en V para neuronas de frecuencias bajas respecto a neuronas de frecuencias altas probablemente resulta de las propiedades direccionales del oído medio, ya que este es el tipo de respuesta que produce un órgano que responde a gradientes de presión de sonido, como es el oído de anuros (Christensen-Dalsgaard, 2005). Es significativo que este tipo de respuestas se observen en mayor proporción en las neuronas de bajas frecuencias, ya que a nivel del

nervio auditivo son las fibras de bajas frecuencias las que dan respuestas direccionales en V (Feng y Shofner, 1981). La persistencia de este tipo de respuestas en neuronas de frecuencias bajas en el sistema auditivo central indicaría que esta modalidad direccional es preservada a lo largo de la vía auditiva.

Las latencias de las respuestas neuronales son en general inversamente proporcionales al número de espigas con que las neuronas responden a los diferentes estímulos presentados desde distintos ángulos. Esto está de acuerdo con lo encontrado previamente para *R. catesbeiana* (Feng, 1981) y *P. thaul* (Bravo, 2008).

8.3 Comparación con estudios conductuales.

Un estudio conductual realizado previamente en machos de *E. calcaratus* dió resultados que contrastan con los obtenidos en esta memoria, ya que las respuestas vocales evocadas de los machos no son afectadas por la dirección de proveniencia de estímulos que imitan la llamada de advertencia de esta especie y además son independientes del contenido espectral de las señales (Penna y Quispe, 2007). Las respuestas neuronales en cambio, en su mayoría son dependientes de la dirección de los estímulos, lo cual indica que esta especie tiene la capacidad de ubicar fuentes sonoras en el espacio.

La ausencia de diferencias vocales en las respuestas de *E. calcaratus* a estímulos de distintas direcciones no significa que los machos carezcan de la capacidad de localizar sonidos, ya que hay otras conductas como cambios de posición o aproximación a la fuente sonora que despliegan anuros que cantan en espacios abiertos (Bee y Gerhardt, 2001) y que en el caso de *E. calcaratus* no es posible observar, debido a que los machos permanecen al interior de sus cuevas donde conservan posiciones estables (Penna y Quispe, 2007).

Aparentemente en *E. calcaratus* hay otros factores que tienen más influencia en la actividad vocal que la ubicación espacial desde donde canta un determinado vecino. El nivel de ruido ambiental, por ejemplo, tiene un importante efecto en la tasa y duración de los cantos producidos por machos de esta especie (Penna et al. 2005). Es posible que para

este anuro sea importante mantenerse respondiendo a las señales de coespecíficos, sin importar su lugar de proveniencia, dada la dificultad de comunicarse en presencia de importantes niveles de ruido en los ambientes de arroyo en que suele habitar.

9.- CONCLUSIONES

1. La mayor parte de las neuronas mesencefálicas de *E. calcaratus* responden de manera diferente a estímulos presentados desde distintas posiciones en el plano horizontal, lo cual muestra que el sistema auditivo de este anuro posee propiedades direccionales, de acuerdo al plan general de vertebrados.
2. La forma de respuesta direccional más frecuente fue con mayor descarga a estímulos presentados desde posiciones contralaterales. Sin embargo, esta proporción es menor que la registrada previamente en estudios clásicos en *Rana pipiens*.
3. Las neuronas dan más respuestas de tipo contralateral a estímulos de tono que al estímulo pulsado, lo cual sugiere una especialización para la localización de la llamada de advertencia de *E. calcaratus*, que posee una estructura tonal.
4. Las neuronas presentan una direccionalidad similar al tono en sus respuestas a estímulos compuestos por ruido, lo que puede atribuirse al amplio espectro de estos sonidos, que facilitaría su localización.
5. Este resultado contrasta con lo encontrado en *P. thaul*, especie que produce un canto de advertencia pulsado y que presenta mayor direccionalidad en sus respuestas a este estímulo que a tonos puros.
6. Las neuronas dan proporcionalmente más respuestas a estímulos provenientes de posiciones laterales que enfrente del sujeto respecto a dos especies estudiadas previamente que se comunican en espacios abiertos. La alta proporción de respuestas de este tipo en *E. calcaratus* podría tener relación con la comunicación de esta especie en ambientes resonantes.
7. La direccionalidad de las respuestas neuronales contrasta con la ausencia de direccionalidad de las respuestas vocales encontrada en un estudio conductual previo. Esta falta de correspondencia indica que la capacidad de localizar sonidos del sistema auditivo de *E. calcaratus* no desempeñaría un rol funcional en los machos que vocalizan en un ambiente de ondas estacionarias y además es importante mantener la persistencia del canto como lo que ocurre en *P. Thaul*.

10.- BIBLIOGRAFÍA

- Alder, T. B. y Rose, G. J.** 2000. Integration and recovery processes contribute to temporal selectivity of neurons in the midbrain of the northern leopard frog, *Rana pipiens*. *J. Comp. Physiol* 186: 923-937.
- Bee, M. A. y Gerhardt, H. C.** 2001. Neighbor-stranger discrimination by territorial male bullfrogs *Rana catesbeiana*: II. Perceptual basis. *Anim. Behav.* 62: 1141-1150.
- Bosch, J. y Márquez, R.** 1996. Acoustic competition in male midwife toads *Alytes obstetricans* and *A. cisternasii*: response to neighbor size and calling rate, Implications for female size. *Ethology* 102: 841-855.
- Bosch, J., Rand, A. S. y Ryan, M. J.** 2000. Acoustic competition in *Physalaemus pustulosus*, a differential response to calls of relative frequency. *Ethology* 106: 865-871.
- Bradbury, J. W. y Vehrencamp, S. L.** 1998. Principles of animal communication. Sinauer Assoc., Sunderland, Massachusetts.
- Bravo, J.** 2008. Direccionalidad de respuestas neuronales mesencefálicas en *Pleurodema thaul* (*Amphibia-Leptodactylidae*). Memoria para optar al título de Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Pp. 1- 48
- Christensen-Dalsgaard J.** 2005. Directional hearing in nonmammalian tetrapods. En: Popper, AN y Fay, RR. (eds). Sound source localization. Springer, New York. Pp. 67-123.
- Feng, A. S.** 1980. Directional characteristics of the acoustic receive of the leopard frog (*Rana pipiens*): A study of the eighth nerve auditory responses. *J. Acust. Soc. Am.* 68: 1107-1114.

Feng, A. S. 1981. Directional response characteristics of single neurons in the *torus semicircularis* of the leopard frog (*Rana pipiens*). J. Comp. Physiol. 144: 419-428.

Feng, A. S. 1986a. Afferent and efferent innervation patterns of the cochlear nucleus (Dorsal medullary nucleus) of the leopard frog. Brain Res. 364: 167-171.

Feng, A. S. 1986b. Afferent and efferent innervation patterns of the superior olivary nucleus of the leopard frog. Brain Res. 364: 167-171.

Feng, A. S., Narins, P. M., and Capranica, R. R. 1975. Three populations of primary auditory fibers in the bullfrog (*Rana catesbeiana*): their peripheral origins and frequency sensitivities. J. Comp. Physiol. 100: 221-229.

Feng, A. S. y Capranica, R. R. 1976. Sound localizations in anurans I. Evidence of binaural interactions in dorsal medullary nucleus of bullfrogs (*Rana catesbiana*). J. Neurophysiol. 39: 871-881.

Feng, A. S., Gerhardt, H. C. y Capranica, R. R. 1976. Sound localization behavior of the green treefrog (*Hyla cinerea*). J. Comp. Physiol. 107: 241-252.

Feng, A. S. y Capranica, R. R. 1978. Sound localizations in anurans II: Binaural interactions in superior olivary nucleus of the green treefrog (*Hyla cinera*). J. Neurophysiol. 41: 43-54.

Feng, A. S. y Shofner K. W. P. 1981. Peripheral basis of sound localization in anurans. Acoustic properties of the frog's ear. Hear. Res. 5: 201-216.

Feng, A. S. y Schellart, N. A. M. 1999. Central auditory processing in fish and amphibians. En: R. R. Fay y Popper A. N. (eds). Comparative hearing: Central auditory processing in fish and amphibians. Springer-Verlag, New York. Pp. 218-268.

Fuzessery, Z. N. 1988. Frequency tuning in the anuran central auditory system. En: Fritsch, B., Ryan, M.J., Wilczynski, W., Hetherington T. E. y Walkowiak, W. (eds). The evolution of the amphibian auditory system. Wiley, New York. Pp. 253-273.

Fuzessery, Z. N. y Feng, A. S. 1983. Frequency selectivity in the anuran medulla: excitatory and inhibitory tuning properties of single neurons in the dorsal medullary and superior olivary nuclei. *J. Comp. Physiol. A* 150: 107-119.

Gerhardt, H. C. y Huber, F. 2002. Acoustic communication in insects and anurans. Sound localization. The University of Chicago Press, Chicago. Pp. 208-251.

Gerhardt, H.C. 1988. Acoustic properties used in call recognition by frog and toads. En: Fritsch, B., Ryan, M.J., Wilczynski, W., Hetherington T.E., y Walkowiak, W. (eds). The evolution of the amphibian auditory system. Wiley, New York. Pp. 455-483.

Goense, B. M. y Feng, A. S. 2005. Seasonal changes in frequency tuning and temporal processing in single neurons in the frog auditory midbrain. *J Neurobiol.* 65: 22–36.

Gooler, D. M., Condon, C. J., Xu, J. H. y Feng, A. S. 1993. Sound direction influences the frequency-tuning characteristics of neurons in the frog inferior colliculus. *J. Neurophysiol.* 69: 1018-1030.

Harrison, P. y Littlejohn, M. J. 1985. Diphasy in the advertisement calls of *Geocrinia laevis* (*Anura-Leptodactylidae*): Vocal responses of males during playback. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 19: 67-73.

Hermes, D. J., Eggermont, J. J., Aertsen, A. M. H. J. y Johannesma, P. I. M. 1982. Spectro temporal characteristics of the single units in the auditory midbrain of the lightly anesthetized grass frog (*Rana temporaria*) investigated with tonal stimuli. *Hear Res.* 6: 103-126.

Kaulen, R., Lifschitz, W., Palazzi, C. y Adrian, H. 1972. Binaural interaction in the inferior colliculus of the frog. *Exp. Neurol.* 37: 469-480.

Kinsler, L. E., Frey, A. R., Coppens, A. B. y Sandres, J. V. 1982. *Fundamentals of Acoustics.* Wiley, New York.

Klump, G.M. y H. C. Gerhardt. 1989. Sound localization in the barking treefrog. *Naturwissenschaften* 76: 35-37.

Knudsen, E. I. y Konishi, M. 1979. Mechanisms of sound localization in the barn owl (*Tyto alba*). *J. Comp. Physiol.* 133: 13-21.

Konishi, M. 1994. Neural mechanisms of auditory image formation. En: Gazzaniga, M. S. (ed). *The cognitive neurosciences.* Cambridge, MIT Press. Pp. 269-277.

Lardner, B. y bin Lakim, M. 2002. Tree-hole frogs exploit resonance effects. *Nature* 420: 475.

Lewis, E.R. y Narins, P.M. 1999. The acoustic periphery in amphibians: anatomy and physiology. En: Fay, R.R. y Popper, A.N. (eds). *Comparative Hearing: Fish and Amphibians.* Springer Verlag. Pp. 101-154.

Lin, W.Y. y Feng, A.S. 2001. Free-field unmasking response characteristics of frog auditory nerve fibers: Comparison with the response of midbrain auditory neurons. *J. Comp. Physiol.* 187: 699-712.

Márquez, R., Penna, M., Marques, P. y do Amaral, J. P. S. 2005. The advertisement calls of *Eupsophus calcaratus* and *E. roseus* (*Amphibia, Anura, Leptodactylidae*): a quantitative comparison.. *Herpetol. J.* 15: 257-263.

Mason, M. J. 2007. Pathways for sound transmission to the inner ear in amphibians En: Narins, P. M., Feng, A. S., Fay, R. R. y Popper, A. N. (eds). Hearing and Sound Communication in Amphibians. Springer, New York. Pp. 147- 183.

Michelsen, A., Jørgensen, M., Christensen-Dalsgaard, J. y Capranica, R.R. 1986. Directional hearing of awake, unrestrained treefrogs. *Naturwissenschaften* 73: 682-683.

Passmore, N. I., Capranica, R. R., Telford, S. R. y Bishop, P. J. 1984. Phonotaxis in the painted reed frog (*Hiperolius marmoratus*). The localization of elevated sound source. *J. Comp. Physiol.* 154: 189-197.

Penna, M. 2004. Amplification and spectral shifts of vocalization inside burrows of the frog *Eusophus calcaratus* (*Leptodactylidae*). *J. Acoust. Soc. Am.* 116: 1254-1260.

Penna, M., Lin, W. Y. y Feng, A. S. 1997. Temporal selectivity for complex signals of single neurons in the *torus semicircularis* of *Pleurodema thaul* (*Amphibia-Leptodactylidae*). *J. Comp. Physiol.* 180: 313-328.

Penna, M., Lin, W. Y. y Feng, A. S. 2001. Temporal selectivity by single neurons in the *torus semicircularis* of *Batrachyla antartandica* (*Amphibia-Leptodactylidae*). *J. Comp. Physiol.* 187: 901-912.

Penna, M., Pottstock, H. y Velasquez, N. 2005. Effect of natural and synthetic noise on evoked vocal responses in a frog of the temperate austral forest. *Anim. Behav.* 70: 639-651.

Penna, M. y Quispe, M. 2007. Independence of evoked responses from stimulus direction burrowing frogs *Eusophus* (*Leptodactylidae*). *Ethology* 113: 313-223.

Perez, A. 2008. Influencia de la ubicación espacial de los estímulos acústicos en la respuesta vocal del anuro *Pleurodema thaul*. Memoria para optar al título de Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Pp.1- 33.

Perril, S. A., Gerhardt, H. C. y Daniel, R. E. 1982. Mating strategy shifts in male green treefrog (*Hyla cinerea*): an experimental study. *Anim. Behav.* 30: 43-48.

Rand, S. 1988. An overview of anuran acoustic communication. En: The evolution of the anurans auditory system. Fritsch, B.; Ryan, M. J., Wilczynski, W., Hetherington, T.E. y Walkowiak, W. (eds). Wiley, New York. Pp. 415-431.

Rheinlaender, J., Gerhardt, H. C., Yager, D. D. y Capranica, R. R. 1979. Accuracy of phonotaxis by the green treefrog (*Hyla cinerea*). *J. Comp. Physiol.* 133: 247-255.

Rheinlander, J. y Klump, G. 1988. Behavioral aspects of sound localization. En: Fritsch, B., Ryan, M. J., Wilczynski, W., Hetherington T. E. y Walkowiak W. (eds). The evolution of the amphibian auditory system. Wiley, New York. Pp. 433-454.

Rose, G.J. y Gooler, D.M. 2007. Function of the amphibian central auditory system. En: Narins, P. M., Feng, A. S., Fay, R. R. y Popper, A. N. (eds). Hearing and sound communication in amphibians. Springer, New York. Pp. 250-290.

Simmons, D.D., Meenderink, S.W.F. y Vassilakis, P.N. 2007. Anatomy, physiology, and function auditory end-organs in the frog inner ear. En: Narins, P. M., Feng, A. S., Fay, R. R. y Popper, A. N. (eds). Hearing and sound communication in amphibians. Springer, New York. Pp. 184-220.

Suga, N. 1990. Biosonar and neural computation in bats. *Sci. Am.* 262: 60-68.

Wang, J. T., Ludwig, A. y Narins, P. M. 1996. Spatial and spectral dependence of the auditory periphery in the Northern leopard frog. *J. Comp. Physiol.* 178: 159-172.

Wilczynski, W. y Endepols, H. 2007. Central auditory pathways in anuran amphibians: the anatomical basis of hearing and sound communication. En: Narins, P. M., Feng, A. S., Fay, R. R. y Popper, A. N. (eds). *Hearing and sound communication in amphibians*. Springer, New York. Pp. 221-249.

Wilczynski, W. y Capranica, R. 1984. The auditory system of anuran amphibians. *Progress in Neurobiology*. 22:1-38

Wiley, R. H. y Richards, D. G. 1982. Adaptations for acoustic communication in birds: sound propagation and signal detection. En: Kroodsma, D. E. y Miller, E. H. (eds). *Acoustic Communication in Birds, Vol. 1*. Academic Press, New York. Pp. 131-181.

Xu, J. H., Gooler, D. M. y Feng, A. S. 1996. Effects of sound direction on the processing of amplitude-modulated signals in the frog inferior colliculus. *J. Comp. Physiol* 178: 435-445.

Yost, W. A. 2007. *Fundamentals of hearing: an introduction*: Academic Press, Burlington.