



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
Escuela de Ciencias Veterinarias



“DIRECCIONALIDAD DE RESPUESTAS NEURONALES
MESENCEFALICAS EN *Pleurodema thaul* (AMPHIBIA-
LEPTODACTYLIDAE)”

JOSE BRAVO ROZNOWSKI

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

PROFESOR GUIA: MARIO PENNA V.

Santiago, Chile

2008

ÍNDICE

ÍNDICE.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	IV
RESUMEN.....	V
1.-INTRODUCCION.....	1
2.-REVISION BIBLIOGRAFICA.....	3
2.1 Aspectos generales de la localización de sonidos.....	3
2.2 Respuestas conductuales a señales acústicas en anuros.....	3
2.3 Localización del sonido en anuros.....	4
2.4 Diseño del sistema auditivo en anuros.....	5
2.5 Procesamiento de la dirección del sonido en el sistema auditivo.....	7
3.-HIPOTESIS.....	10
4.-OBJETIVOS.....	11
4.1 Generales.....	11
4.2 Específicos.....	11
5.-MATERIALES Y METODOS.....	12
5.1 Sujetos experimentales.....	12
5.2 Preparación del animal.....	12
5.3 Estímulos acústicos.....	13
5.4 Procedimiento de registro y protocolo experimental.....	15
5.5 Análisis de datos.....	16
6.-RESULTADOS.....	18
6.1 Características generales de las respuestas neuronales.....	18
6.2 Direccionalidad de las respuestas neuronales.....	21
7.-DISCUSIÓN.....	31
7.1 Características generales.....	31
7.2 Direccionalidad de las respuestas neuronales.....	31
7.3 Comparación de estudios neurofisiológicos y conductuales.....	34
8.-CONCLUSIONES.....	36
9.-BIBLIOGRAFIA.....	37

AGRADECIMIENTOS

A mis amigos fuente de toda mi energía.

Al doctor Mario Penna por su acogida y enseñanza.

Al doctor Rigoberto Solis por darme esta gran oportunidad

A Maricel Quispe y Nelson Velásquez por su amistad, confianza y paciencia.

A Juan Panza por su complicidad

A Aníbal Martínez por estar detrás de todo esto

A Andrea Cuellar, Antonieta Schmessane y Hans Pottstock por su tecno-ayuda

Al laboratorio de Neuroetología de la Facultad de Medicina por su increíble e impagable camaradería

Al “Rayo” por iniciar mi camino hacia la ciencia

A Andrea González por su enorme apoyo y compañía

A Alfonso Bravo y Gonzalo Sánchez por estar siempre que los necesité

A mis abuelos, a Edith y a Pilar por estar cada día a mi lado

A los sapitos de cuatro ojos

Por ultimo a Roca y a las “chiquillas” por hacer crecer en mi la latente semilla de la Medicina Veterinaria

RESUMEN

Los anfibios anuros utilizan extensamente las señales acústicas, siendo capaces de detectarlas, reconocerlas y localizarlas. La capacidad de localizar la fuente sonora permite a las hembras acercarse a los machos y aparearse. Además facilitaría a los machos responder a rivales. Sin embargo, en experimentos de campo, los machos de *Pleurodema thaul* responden indistintamente a estímulos provenientes de diferentes localizaciones. Exploramos la direccionalidad de las respuestas de neuronas auditivas mesencefálicas, para comparar la actividad neural con la ausencia de respuestas conductuales direccionales observada.

Se registraron las respuestas de 62 neuronas auditivas mesencefálicas en 15 machos 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°. Un 45 % de las neuronas respondió direccionalmente a un estímulo de canto sintético con más descargas a la posición contralateral y 17 % respondió de manera no direccional. En respuesta a tonos puros, sólo 27 % de las neuronas respondió preferencialmente a la posición contralateral y un 41% en forma no direccional.

La direccionalidad de las respuestas neuronales contrasta con la ausencia de direccionalidad en las respuestas conductuales. Estos resultados indican que los machos de *P. thaul* podrían localizar a potenciales rivales, pero responden similarmente a cantos provenientes de distintas posiciones, manteniendo una actividad vocal que facilitaría la atracción de hembras.

1.-INTRODUCCIÓN

Las señales acústicas permiten la comunicación a distancia, por lo que son ampliamente empleadas por diversos animales. Los anfibios anuros utilizan las señales sonoras extensamente. Durante la época de reproducción, los machos emiten señales acústicas denominadas cantos o llamadas de advertencia, a las que otros machos responden vocalizando, siendo las hembras atraídas por estas señales (Bradbury y Vehrencamp, 1998).

La localización de la fuente sonora es importante, en particular para las hembras de anuros, ya que estudios en diversas especies han determinado que las hembras grávidas se orientan hacia los machos, atraídas por características de sus llamadas, lo que permite que ocurra el apareamiento (Gerhardt y Huber, 2002). Los machos también se orientan hacia los cantos de coespecíficos, generalmente para iniciar interacciones agresivas (Bee y Gerhardt, 2001). Además, en la rana toro de Norteamérica, se ha determinado que los machos alteran sus vocalizaciones si son estimulados con llamadas provenientes de una ubicación no habitual (Bee y Gerhardt, 2001).

La direccionalidad de estas respuestas conductuales depende de propiedades del sistema auditivo periférico y central. En el centro auditivo del mesencéfalo, el torus semicircularis, alrededor de un 80% de las neuronas son excitadas máximamente por tonos provenientes del lado opuesto del hemisferio registrado. Otras en tanto, responden máximamente a estímulos provenientes desde frente al animal (Feng, 1981).

Pleurodema thaul (“sapito de cuatro ojos”) es un anuro que se encuentra en la zona central de Chile y que emite una llamada de advertencia prolongada, compuesta por pulsos que contienen modulaciones de amplitud (Penna y Veloso, 1990). El sistema auditivo de este anuro posee neuronas que responden selectivamente a estímulos sintéticos de características temporales (frecuencia de pulsos) similares al canto de apareamiento de la especie (Penna et al., 1997).

Los machos responden vocalizando a la presentación de cantos naturales (Solís, 1994) y en experimentos de campo recientes, se ha observado que dan respuestas similares a sonidos

provenientes de parlantes ubicados al frente, derecha o izquierda del animal (Pérez, datos no publicados).

Resulta contrastante que, estando el sistema auditivo de anfibios dotado de especializaciones para la localización de sonidos al igual que el de otros vertebrados, los machos de *Pleurodema thaul* aparentemente no discriminan entre estímulos provenientes de distintas direcciones. Un estudio de las respuestas neuronales a la dirección del sonido, permitirá avanzar en la comprensión de esta aparente incongruencia entre las propiedades del sistema auditivo y las respuestas conductuales de los machos de esta especie en condiciones naturales

2.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos generales de la localización de sonido

Se considera que existe comunicación cuando la apariencia o acciones de un animal influyen sobre el comportamiento de individuos de la misma o diferente especie. La comunicación por sonido opera principalmente entre individuos distantes, en contraste con las señales visuales, que permiten la comunicación en rangos intermedios y las señales táctiles, que se utilizan entre individuos en contacto (Bradbury y Vehrencamp, 1998).

La fuente de sonido puede ser localizada en tres dimensiones espaciales: el plano horizontal, el plano vertical y en la profundidad. La habilidad de percibir la 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 deben en gran parte a interferencias generadas por la estructura de la cabeza del individuo receptor (Yost, 2007).

2.2 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 cantos de apareamiento, agresividad, rechazo sexual y peligro (Gerhardt, 1988).

El canto de apareamiento es producido 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, 1998), previniendo apareamientos ínterespecíficos. Las hembras responden a estas señales orientándose hacia la fuente sonora, prefiriendo características espectrales o temporales en el 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), indicando que éstos pueden evaluar las características constitucionales de sus oponentes, a través de las señales acústicas, y adecuar su respuesta a la competencia vocal.

2.3 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 receptivas 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). Los desplazamientos de acercamiento hacia el parlante son de notable precisión, con desviaciones de alrededor de 15° del eje del cuerpo del sujeto, respecto al parlante. Esto ha sido descrito para las ranas arborícolas *Hyla cinerea* (Feng et al., 1976; Rheinlaender et al., 1979), *Hyla gratiosa* (Feng et al., 1976) e *Hyperolius marmoratus* (Passmore et al., 1984). Es notable que estos animales localicen sonidos con tal precisión, ya que debido a los pequeños tamaños de sus cabezas, las diferencias de tiempos e intensidad con que llega el sonido a cada tímpano, son muy pequeñas, de aproximadamente $10 \mu\text{s}$ y 1 dB , respectivamente (Michelsen et al., 1986). Además, la precisión de localización es similar en especies de distintos tamaños, como *Hyperolius marmoratus* e *Hyla cinerea* (Rheinlander y Klump, 1988).

Los machos de algunas especies, también pueden orientarse hacia otros individuos que vocalizan 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 la rana del bosque templado del sur de Chile, *Eupsophus calcaratus*, dan respuestas vocales similares a estímulos presentados desde distintas posiciones respecto a los sujetos experimentales (Penna y Quispe, 2007). Esta rana sin embargo, 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).

Experimentos de campo realizados con *Pleurodema thaul* han mostrado resultados similares a los de *Eupsophus calcaratus*, ya que los machos de la especie de la zona central también responden indistintamente a estímulos que provienen de distintas ubicaciones (Pérez, datos no publicados). En el caso de *Pleurodema 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.

2.4 Diseño del sistema auditivo de los anuros

La direccionalidad de las respuestas conductuales descritas depende de propiedades del sistema auditivo periférico y central. Los anuros son los primeros vertebrados que desarrollan un sistema de detección de señales sonoras de transmisión aérea. Ellos carecen de oído externo, de modo que el sonido llega directamente a la membrana timpánica, siendo transmitido a través de estructuras óseo-cartilaginosas hasta la ventana oval, llegando a estimular los receptores del oído interno (Mason, 2007).

Los anfibios anuros son los únicos vertebrados que poseen dos receptores de sonido en el oído interno, ubicados en la pared del sáculo. La papila anfibia es sensible a frecuencias bajas (inferiores o alrededor de 1000 Hz, dependiendo de la especie) y la papila basilar responde a frecuencias más altas. Ambas estructuras poseen un epitelio de células ciliadas que están en contacto con una membrana tectorial (Lewis y Narins, 1999). La papila anfibia es de mayor tamaño y contiene una cavidad en la pared del sáculo. Las células ciliadas están innervadas por

fibras nerviosas del VIII nervio craneano 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).

La vía auditiva de los anfibios anuros sigue el plan general de vertebrados; los cuerpos neuronales de las fibras nerviosas que inervan las papilas se sitúan en un área de la médula superior ipsilateral denominada núcleo medular dorsal. Las fibras que responden a frecuencias bajas están representadas en localización ventral, en tanto que las fibras que responden a frecuencias altas ocupan posiciones más dorsales (Rose y Gooler, 2007). Este núcleo recibe también proyecciones descendentes de centros auditivos superiores (Feng y Lin, 1996). El siguiente nivel en la vía corresponde al núcleo olivar superior, que recibe proyecciones del núcleo medular dorsal ipsi y contralateral. En esta estructura también hay una representación ordenada de frecuencias, con las bajas ubicadas dorsolateralmente y las altas 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 centro auditivo en el mesencéfalo es el torus semicircularis, que constituye una importante etapa de procesamiento de la información auditiva, localizado en el mesencéfalo debajo del tectum óptico y del ventrículo tectal, siendo homólogo al colículo inferior de los mamíferos. El torus semicircularis esta compuesto por cinco núcleos, de los cuales tres: el principal, el laminar y el magnocelular, están relacionados con el procesamiento del sonido (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 tálamo, el núcleo posterior recibe proyecciones del núcleo laminar del torus semicircularis y el núcleo central recibe principalmente proyecciones del núcleo principal y magnocelular. A este nivel, 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 dorsal medular 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).

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. 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).

2.5 Procesamiento de la dirección del sonido en el sistema auditivo

Los anuros carecen de oído externo, estructura que facilita la localización de sonidos en otros vertebrados. Sin embargo, la membrana timpánica de anuros responde de manera direccional al sonido. En la mayoría de los anuros el oído medio está conectado mediante la tuba auditiva a la cavidad vocal. Esta configuración 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, de modo que las fibras de baja frecuencia responden con mayor número de descargas a estímulos provenientes de localizaciones ipsi y contralaterales que a estímulos provenientes de enfrente del sujeto. Las fibras de frecuencias altas en cambio, 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 altas 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. También hay proporciones menores de neuronas que responden máximamente a estímulos provenientes de ambos lados y neuronas que responden máximamente a estímulos provenientes de posiciones frontales (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 Vehrenkamp, 1998), lo que supone 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 influye 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 (Gooler 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).

3.-HIPÓTESIS

Las neuronas mesencefálicas de los machos de *Pleurodema thaul* presentan respuestas diferentes a sonidos provenientes de distintas direcciones en el plano horizontal.

4.-OBJETIVOS

4.1 General

Determinar la direccionalidad de las respuestas de neuronas mesencefálicas de machos de *Pleurodema thaul* a sonidos de significado biológico.

4.2 Específicos

Determinar la direccionalidad de las respuestas de neuronas mesencefálicas de machos de *Pleurodema thaul* a imitaciones sintéticas del canto de apareamiento de la especie, a tonos puros y a estímulos compuestos de ruido.

Comparar la direccionalidad de las respuestas neuronales a estos diversos estímulos, con el fin de determinar si las señales de mayor semejanza con el canto natural de la especie son más localizables.

Comparar estos resultados neurofisiológicos con experimentos comportamentales que indican una ausencia de direccionalidad en las respuestas vocales de esta especie.

5.-MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Sujetos experimentales

Los ejemplares utilizados en este estudio fueron capturados en el río La Ligua, durante dos jornadas en agosto y noviembre de 2006. Los animales se encontraron bajo piedras y material de deshecho al borde del agua, y fueron transportados en un recipiente con aislación térmica al Laboratorio de Neurootología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Allí fueron ubicados en terrarios debidamente identificados, en una cámara con temperatura constante de 15 °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.

5.2 Preparación del animal

Se utilizaron 15 machos de *Pleurodema thaul* cuyo peso corporal fue entre 1,5 y 2,5 g. Los animales fueron anestesiados por inmersión de 2 a 3 min. en una solución de metanosulfonato de tricaina (MS-222) al 0,4%. Bajo el efecto de la anestesia, se procedía a horadar la pared dorsal del cráneo con una fresa dental bajo un microscopio quirúrgico hasta exponer el encéfalo e incidir las membranas cerebrales. Los animales fueron dejados recuperarse de la anestesia durante 12 a 24 horas y luego inmovilizados con una inyección de d-tubocuramina (9 µg/g de peso corporal). Para ser registrados, los sujetos fueron colocados sobre una placa de Peltier que regulaba la temperatura corporal a 15°C. Este dispositivo se encontraba sobre una mesa con amortiguación hidráulica (Topcon), situada al centro de una cámara semianecoica aislada, con cuñas de espuma de 50 cm. de largo. El registro de neuronas se realizaba en sesiones de tres a cuatro horas de duración. El animal era posicionado en el centro de rotación de un parlante de 10 cm. de diámetro, ubicado a un radio de 1 m. Sobre la cabeza del animal, 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 distintas direcciones mediante un atenuador (PA 4, Tucker-Davis Technologies).

Se registraron 62 neuronas (un promedio de 4 por animal, aproximadamente), cantidad que se considera representativa para analizar la direccionalidad de las respuestas neuronales de *Pleurodema thaul* a señales acústicas, ya que en trabajos previos de respuestas neuronales mesencefálicas en esta especie, se han utilizado tamaños muestrales similares (Penna et al., 1997)

5.3 Estímulos acústicos

Los estímulos usados fueron generados por el programa SigGen y controlados por un computador Pentium III. Se presentaron 4 estímulos; el primero (canto sintético) correspondió a una imitación sintética del canto de apareamiento de la especie, de 450 ms de duración, que fue sintetizada de acuerdo a los valores promedios de las características temporales del canto de apareamiento natural de esta especie (Solís, 1994). El segundo estímulo (tono) fue un tono de 450 ms. Ambos fueron sintetizados a partir de un tono de la frecuencia a la que neurona registrada era más sensible (frecuencia característica). Además, se utilizaron dos estímulos de iguales características temporales al canto sintético y al tono, pero en lugar de utilizar 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 dos últimos estímulos, denominados canto-ruido y ruido, respectivamente, fueron utilizados para controlar las diferencias espectrales inherentes a las distintas estructuras temporales de los estímulos tonales. En la Figura 1 se presentan oscilogramas y espectros de los cuatro estímulos. En los espectrogramas se aprecia la mayor uniformidad entre los estímulos de ruido en relación a los estímulos tonales

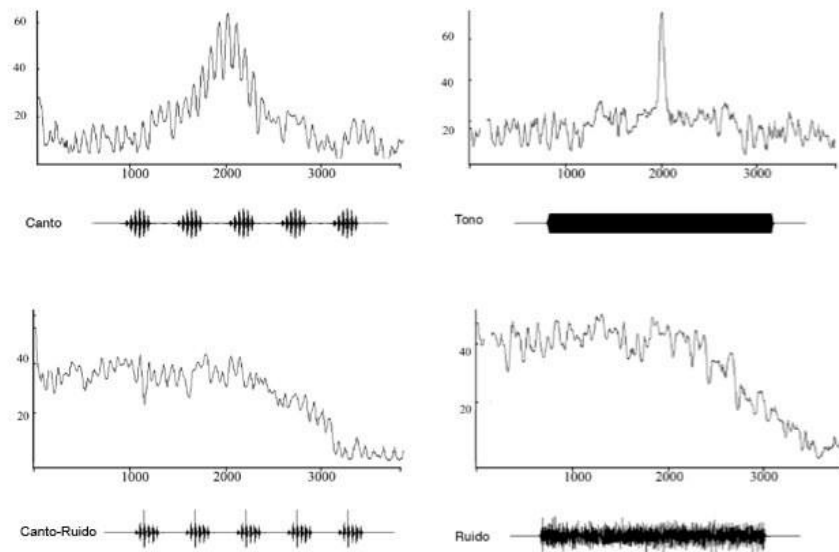


Figura 1: Estímulos utilizados en los experimentos de direccionalidad de respuestas neuronales en *Pleurodema thaul*. Los estímulos tonales fueron sintetizados a partir de un tono de 2 KHz. y los estímulos de ruido fueron sintetizados a partir de un ruido pasabanda que contenía frecuencias entre 50 y 3050 Hz.

Los sonidos fueron amplificados con un amplificador (NAD 3020i) y reproducidos por un parlante rotatorio de 10 centímetros de diámetro, desde el cual se emitieron los estímulos, en distintas posiciones, separadas cada 30° en el hemicampo anterior del plano horizontal a un radio de 1 m de distancia del sujeto experimental, como se muestra en la Figura 2.

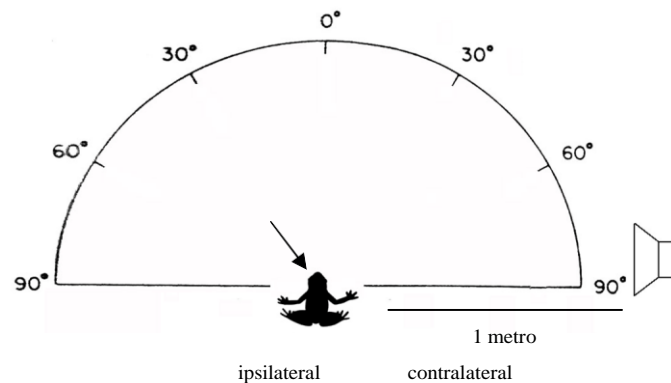


Figura 2: Ángulos de presentación de los estímulos en los experimentos de direccionalidad de respuestas neuronales en *Pleurodema thaul*. La flecha indica el hemisferio izquierdo como sitio de registro

5.4 Procedimientos de registro y protocolo experimental

Las respuestas de las neurona 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 0,5M 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 mas 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, utilizando el programa Brainware. Los registros se guardaron en discos compactos y fueron analizados con el sistema Tucker-Davis y el computador Pentium III.

La estimulación se iniciaba con el parlante ubicado en la posición 90° contralateral o 90° ipsilateral al hemisferio de registro. Se utilizó como estímulo de búsqueda el canto sintetizado con ruido, con el fin de excitar cualquier neurona auditiva presente en la trayectoria del electrodo. Una vez aislada la neurona, se procedió a identificar su frecuencia característica, es decir, aquella a la cual ésta tenía un umbral de respuesta más bajo y por lo tanto, era más sensible. 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 canto sintetizado 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 20 dB sobre los respectivos umbrales. Se escogió este nivel para hacer comparables los resultados con 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: canto sintetizado, tono puro, canto-ruido, ruido. Se completó la presentación desde distintos ángulos para cada estímulo y luego se hizo rotar el parlante en dirección opuesta para obtener respuestas al estímulo siguiente. Debido a este procedimiento es que se completó un número de neuronas decreciente para las sucesivas series de estímulos utilizados. Para algunas neuronas que lograron mantenerse en registro hasta concluir la presentación de los cuatro estímulos, se realizó un control, repitiendo el primer estímulo desde la posición inicial.

5.5 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 tiempo igual a la duración de los estímulos (450 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 hicieron histogramas post estímulo con el total de espigas evocadas por 20 presentaciones de un estímulo a una 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. También se realizaron gráficos de la latencia de respuesta a los distintos ángulos del parlante para los distintos estímulos. 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 había diferencia entre la proporción de neuronas que respondían con distintos tipos de respuestas direccionales a los diversos estímulos utilizados, se utilizó la prueba de Chi cuadrado de tendencias (Epiinfo 2000 1.0.3). También se utilizó esta prueba para establecer si existían diferencias en la direccionalidad de las respuestas 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 con el programa Deltagraph 4.5 las pendientes lineales en gráficos del número de espigas en relación a la posición angular del parlante. Este análisis se hizo para las neuronas que presentaron una respuesta contralateral a algún estímulo, comparándolas con la pendiente de los otros estímulos.

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.

Además, con el programa Statview 5.0 se hicieron pruebas de Mann-Whitney para comparar los umbrales de respuesta, entre neuronas de frecuencia característica baja y alta, entre neuronas tónicas y fásicas, y las frecuencias características entre neuronas tónicas y fásicas.

El test de rangos de Wilcoxon fue utilizado para comparar las pendientes, los umbrales a los estímulos de canto y tono y para comparar el número de espigas y el tiempo de latencia entre el estímulo control y el primer estímulo.

6.-RESULTADOS

6.1 Características generales de las respuestas neuronales

Se registraron 62 neuronas del torus semicircularis de 15 machos de *Pleurodema thaul*. Se obtuvieron respuestas a la presentación de estímulos desde los 7 ángulos considerados para las series de estímulos de canto sintético, tono puro, canto-ruido y ruido en 61, 37, 25 y 17 neuronas, respectivamente.

De las neuronas registradas, 34 presentaron frecuencias características entre 100 y 700 Hz (mediana: 500) y 28 entre 1900 y 2300 Hz (mediana: 2000). Los umbrales de respuesta para neuronas sintonizadas a frecuencias bajas, se situaron en un rango de 29-64 dB SPL (promedio: 49 dB SPL) para el canto sintético, y entre 34-66 dB SPL (promedio: 54 dB SPL) para el tono. Para las neuronas de frecuencias altas los umbrales fueron entre 37-75 dB SPL (promedio: 58 dB SPL) para el canto sintético y entre 40-88 dB SPL (promedio: 70 dB SPL) para el tono (Figura 3). Los umbrales de ambos tipos de neuronas fueron similares para el canto sintético (Test U de Mann-Whitney, $U = -0,618$, $P > 0,05$) y para el tono (Test U de Mann-Whitney, $U = -0,749$, $P > 0,05$). Sin embargo, los umbrales para el canto sintético fueron significativamente menores que para el tono cuando todas las neuronas fueron comparadas (Test de rangos de Wilcoxon, $T = 4,871$, $P < 0,0001$).

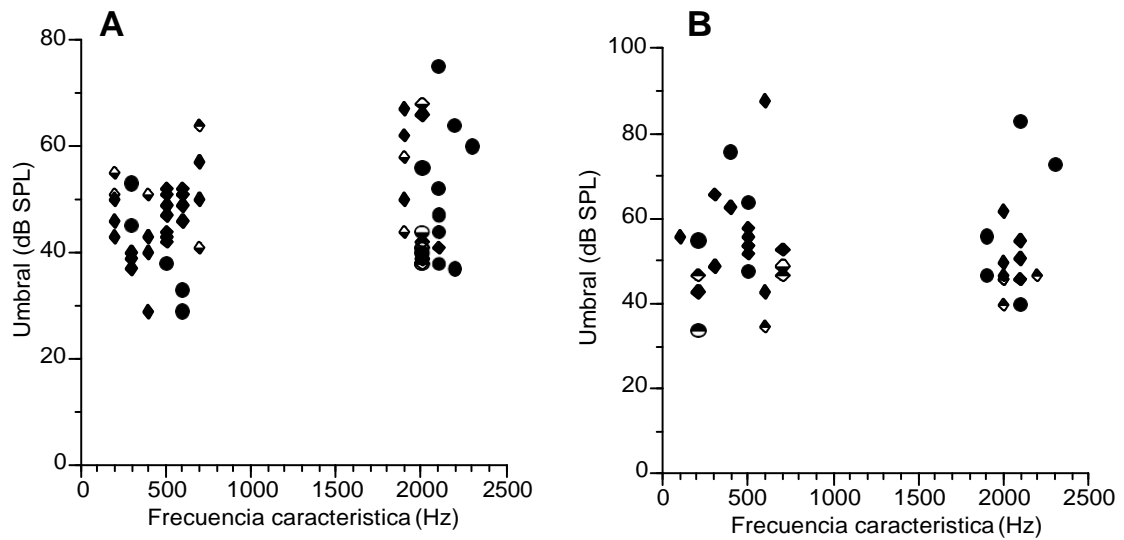


Figura 3: Frecuencias características y umbrales de respuesta en 62 neuronas del *Torus semicircularis* de *Pleurodema thaul* a tonos (A) y canto sintético (B).

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 ($n=32$; 49,2%). El otro grupo eran neuronas que descargaban con una o unas pocas espigas, generalmente al comienzo del estímulo y correspondían a neuronas fásicas ($n=30$; 50,8%). En la Figura 4 se muestran ejemplos de ambos patrones de respuesta.

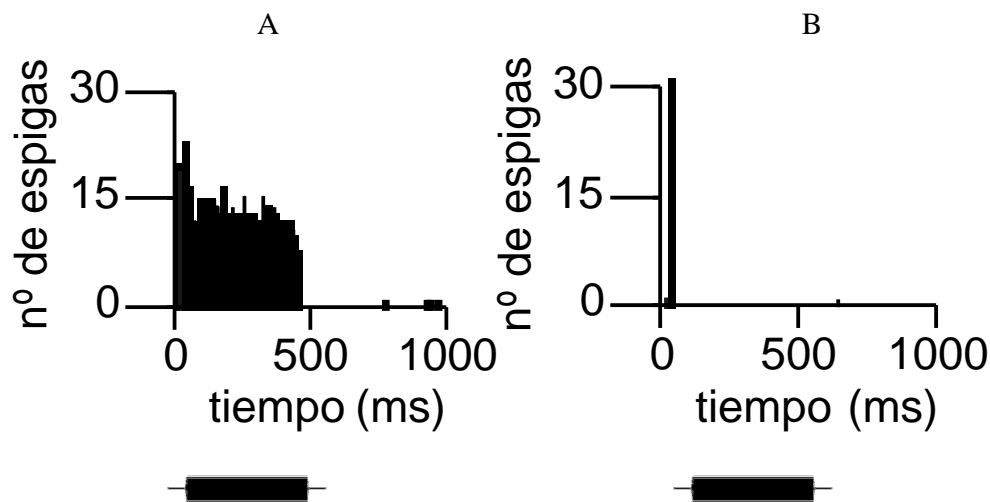


Figura 4: Histogramas post estímulo mostrando patrones de descarga temporal a tonos puros de la frecuencia característica de dos neuronas A: neurona tónica (frecuencia característica: 700 Hz. Umbral al tono: 50 dB SPL. Nivel del estímulo: 70 dB SPL), B: neurona fásica (frecuencia característica: 2000 Hz. Umbral al tono: 44 dB SPL. Nivel del estímulo: 64 dB SPL). Los estímulos de tono se muestran bajo los histogramas.

El patrón de descarga temporal y la frecuencia característica de las neuronas no estaban relacionados, las frecuencias características de las neuronas tónicas y fásicas no diferían entre sí (Test U de Mann-Whitney, $U = -0,745$, $P > 0,05$); de las 34 neuronas de frecuencias bajas 15 eran tónicas y 19 fásicas y de las 28 neuronas de frecuencias altas 17 eran tónicas y 11 fásicas. Los umbrales de respuesta fueron: 29-75 dB SPL (promedio: 55 dB SPL) al canto sintético y 34-83 dB SPL (promedio: 64 dB SPL) al tono, para las neuronas tónicas y 38- 68 dB SPL (promedio: 52 dB SPL) al canto sintético y 35-88 dB SPL (promedio= 66 dB SPL) al tono, para las neuronas fásicas. Los umbrales de ambos tipos de neuronas fueron similares para el canto sintético (Test U de Mann-Whitney, $U = -0,614$, $P > 0,05$) y para el tono (Test U de Mann-Whitney, $U = -1,075$, $P > 0,05$)

Las neuronas registradas respondieron con latencias muy diferentes. El promedio para el canto sintético fue 73,1 ms (rango 22,2-234,7 ms), para el tono puro 51,6 ms (rango 17,2-167,7 ms), para el canto-ruido 114,9 ms (rango 24-303,6 ms) y para el ruido 59,5 ms (rango 15,3-262,3

ms). Las neuronas de frecuencias características bajas, presentaron latencias al tono entre 28,9-164,2 ms, en tanto que las de frecuencias características altas 17,3-167,7 ms. Para las neuronas que respondieron con un patrón temporal de descarga tónica las latencias fueron entre 17,3- 167,7 ms y para las fásicas 18,5- 164,2 ms.

6.2 Direccionalidad de las respuestas neuronales

Las neuronas registradas respondieron siguiendo 6 distintos patrones de direccionalidad: contralateral, ipsilateral, en forma de V, de V invertida, compleja y sin respuesta direccional.

En respuesta al canto sintético, un 44 % de las neuronas respondió con un patrón contralateral y 17 % respondió de manera no direccional. Ejemplos de estos dos tipos de neuronas se muestran en las Figuras 5 y 6. El resto de las neuronas respondieron con un patrón ipsilateral (8%), en V (13%) en V invertida (13%) o compleja (5%). En contraste, en respuesta al tono puro, sólo 27% de las neuronas respondió de forma contralateral en tanto un 41% respondió en forma no direccional. Para los estímulos de canto-ruido y ruido la tendencia fue similar a la presentada al canto sintético; alrededor de la mitad de las neuronas respondieron en forma contralateral a estos estímulos (Tabla 1). En las Figuras 5 y 6 se muestran histogramas post estímulos y gráficos de las descargas de dos neuronas registradas.

Tabla 1. Número de neuronas según tipo de respuesta direccional en el torus semicircularis de *Pleurodema thaul* (porcentaje entre paréntesis). Abreviaciones: C: contralateral, I : ipsilateral, V: en V, VI: en V invertida, ND: no direccional, CJ: compleja.

Estimulo	C	I	V	VI	ND	CJ	Total
Canto	27 (44,3)	5 (8,2)	8 (13,1)	8 (13,1)	10 (16,4)	3 (4,9)	61 (100)
Tono	10 (27,0)	2 (5,4)	4 (10,8)	4 (10,8)	15 (40,5)	2 (5,4)	37 (100)
Canto-ruido	13 (52,0)	0 (0,0)	3 (12,0)	2 (8,0)	4 (16,0)	3 (12,0)	25 (100)
Ruido	9 (52,9)	1 (5,9)	1 (5,9)	1 (5,9)	3 (17,6)	2 (11,8)	17 (100)

|

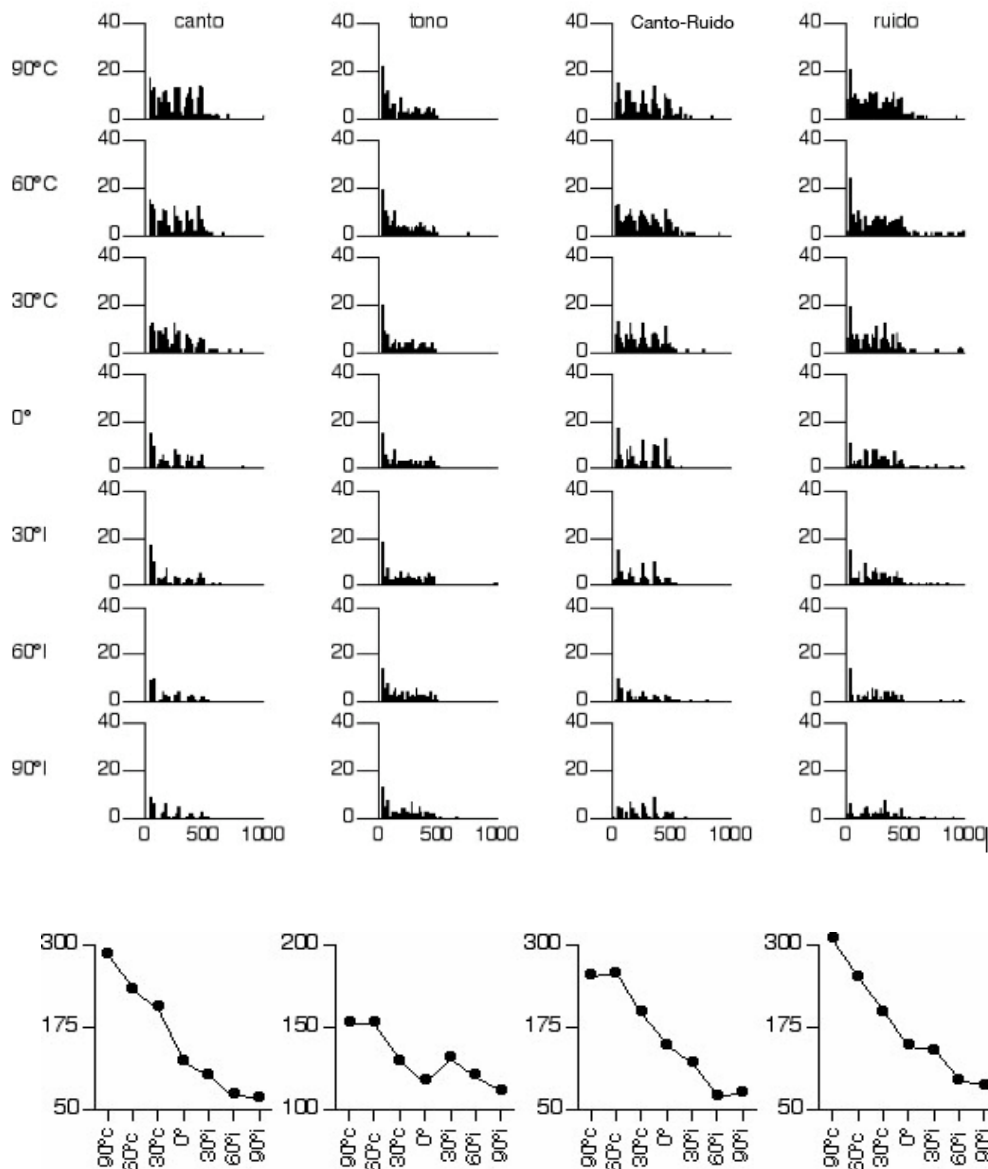


Figura 5: Neurona de respuesta de tipo contralateral. En la parte superior de la figura aparecen histogramas de cada una de las posiciones del parlante a la presentación de los distintos estímulos. En la parte inferior se encuentran gráficos con el total de espigas producidas en cada una de las posiciones a los distintos estímulos. (Neurona tónica; frecuencia característica: 2000 Hz).

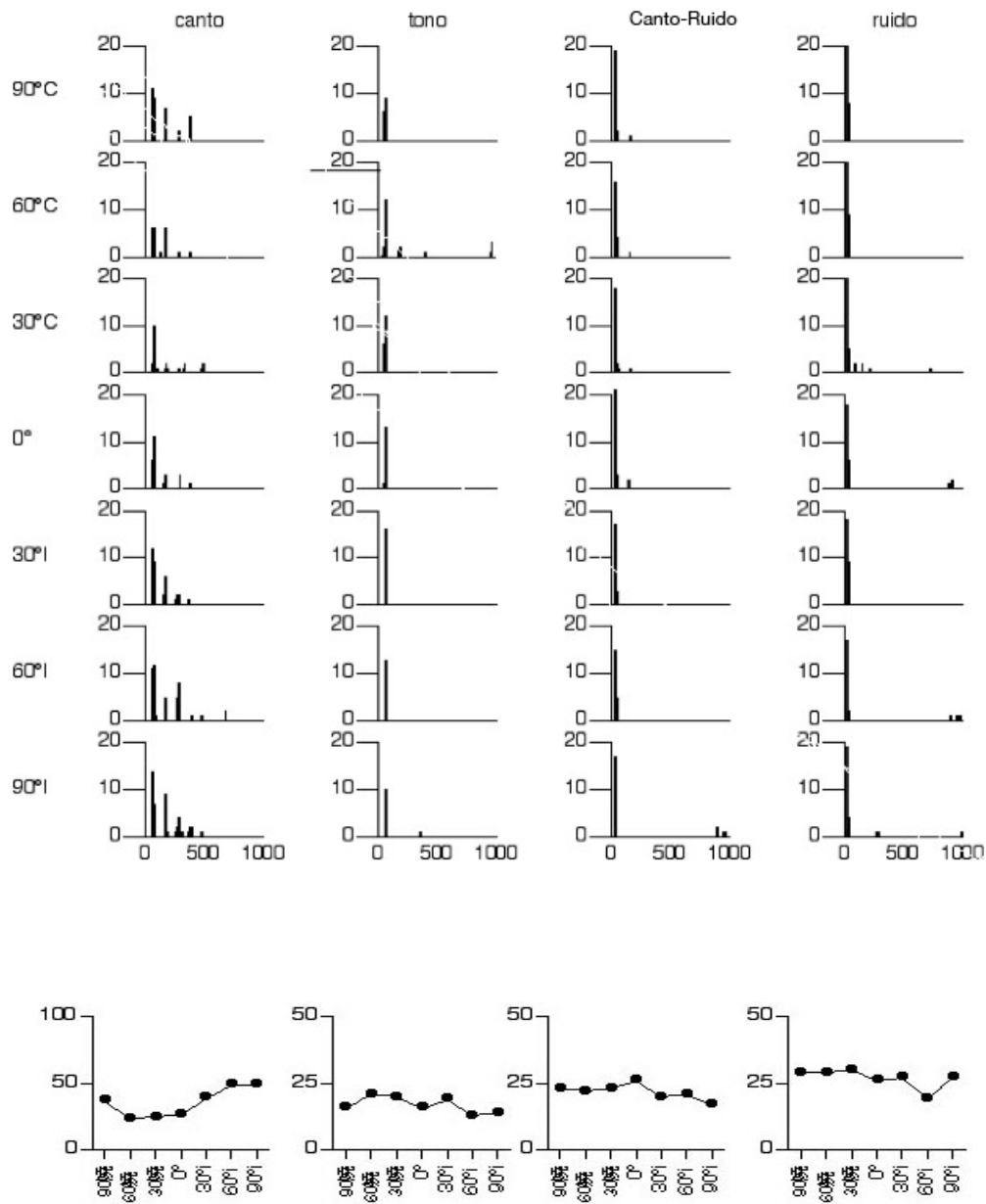


Figura 6: Neurona de respuesta de tipo no direccional. En la parte superior de la figura aparecen histogramas de cada una de las posiciones del parlante a la presentación de los distintos estímulos. En la parte inferior se encuentran gráficos con el total de espigas producidas en cada una de las posiciones a los distintos estímulos. (Neurona fásica; frecuencia característica: 300 Hz).

Las proporciones de neuronas que respondieron con distintos patrones de direccionalidad, fueron diferentes entre los estímulos de canto sintético y tono (Chi cuadrado para tendencia: 5,349, $P = 0,02073$). Las otras cinco comparaciones entre estímulos no alcanzaron valores de significación. ($P > 0,12996$ para todas las comparaciones).

También hubo diferencias notorias al comparar los patrones de respuestas a otros estímulos; el porcentaje de respuestas contralaterales al ruido fue casi el doble que al tono, y las respuestas no direccionales al tono fueron más del doble que al ruido. Una relación similar se observó al comparar el tono y el canto-ruido. Sin embargo, estas diferencias no alcanzaron valores significativos para ninguna de las otras cinco comparaciones entre estímulos ($P > 0,12996$ para todas las comparaciones).

En respuesta al estímulo de canto sintético presentado al final del registros desde la posición inicial como control de posibles cambios en la respuesta en el tiempo para 9 neuronas, no hubo diferencias significativas para el número de espigas, (Test de rangos de Wilcoxon: $T = -1,540$, $P > 0,05$), ni para las latencias (Test de rangos de Wilcoxon: $T = -1,400$, $P > 0,05$).

Al considerar las proporciones de respuestas direccionales a los cuatro estímulos utilizados en relación al patrón de descarga temporal, se observó que las neuronas tónicas respondieron con mayor proporción de respuestas contralaterales a los cuatro estímulos en relación a las neuronas fásicas. La única comparación que dio un valor de significancia marginal correspondió a las respuestas al tono puro (Chi cuadrado para tendencia: 3,586, $P = 0,05828$). Sin embargo, las diferencias para las otras tres comparaciones no alcanzaron niveles de significación (Chi cuadrado para tendencia: $P > 0,08752$ para todas las comparaciones). Estos datos se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2: Número de neuronas según tipo de respuesta direccional en el torus semicircularis de *Pleurodema thaul* de acuerdo a su patrón temporal de descarga. Abreviaciones como en la Tabla 1.

Tónicas

Estímulo	C	I	V	VI	ND	CJ	Total
Canto	17 (54,8)	1 (3,2)	5 (16,1)	3 (9,7)	5 (16,1)	0 (0,0)	31 (100)
Tono	7 (41,3)	0 (0,0)	3 (17,6)	3 (17,6)	3 (17,6)	1 (5,9)	17 (100)
Canto-ruido	7 (58,3)	0 (0,0)	2 (16,7)	1 (8,3)	2 (16,7)	0 (0,0)	12 (100)
Ruido	6 (85,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (14,3)	7 (100)

Fásicas

Estímulo	C	I	V	VI	ND	CJ	Total
Canto	10 (33,3)	4 (13,3)	3 (10,0)	5 (16,7)	5 (16,7)	3 (10,0)	30 (100)
Tono	3 (15,0)	2 (10,0)	1 (5,0)	1 (5,0)	12 (60,0)	1 (5,0)	20 (100)
Canto-ruido	6 (46,1)	0 (0,0)	1 (7,7)	1 (7,7)	2 (15,4)	3 (23,1)	13 (100)
Ruido	3 (30,0)	1 (10,0)	1 (10,0)	1 (10,0)	3 (30,0)	1 (10,0)	10 (100)

Al considerar las proporciones de respuestas direccionales a los cuatro estímulos utilizados en relación a la sintonización a frecuencias de las neuronas, llama la atención que la proporción de respuestas contralaterales al canto con ruido fue casi el doble en las neuronas de frecuencias bajas, que en las neuronas de frecuencias altas. Sin embargo, las diferencias no alcanzaron niveles de significación (Chi cuadrado para tendencia: $P > 0,24958$ para todas las comparaciones) (Tabla 3).

Tabla 3: Número de neuronas según tipo de respuesta direccional en el torus semicircularis de *Pleurodema thaul* de acuerdo a su frecuencia característica. Abreviaciones como en la Tabla 1.

Neuronas de frecuencia baja

Estímulo	C	I	V	VI	ND	CJ	Total
Canto	14 (41,2)	4 (11,8)	8 (23,5)	5 (14,7)	2 (5,9)	1 (2,9)	34 (100)
Tono	4 (21,0)	1 (5,3)	3 (15,8)	3 (15,8)	6 (31,6)	2 (10,5)	19 (100)
Canto-ruido	9 (64,3)	0 (0,0)	1 (7,1)	0 (0,0)	3 (21,5)	1 (7,1)	14 (100)
Ruido	5 (62,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (37,5)	0 (0,0)	8 (100)

Neuronas de frecuencia alta

Estímulo	C	I	V	VI	ND	CJ	Total
Canto	13 (48,1)	1 (3,7)	0 (0,0)	3 (11,1)	8 (29,6)	2 (7,4)	27 (100)
Tono	6 (33,5)	1 (5,5)	1 (5,5)	1 (5,5)	9 (50,0)	0 (0,0)	18 (100)
Canto-ruido	4 (36,3)	0 (0,0)	2 (18,2)	2 (18,2)	1 (9,1)	2 (18,2)	11 (100)
Ruido	4 (44,5)	1 (11,1)	1 (11,1)	1 (11,1)	0 (0,0)	2 (22,2)	9 (100)

Además de la clasificación de las neuronas según patrones de direccionalidad de sus respuestas, se midieron las pendientes lineales 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. Los resultados muestran en la Tabla 4 que la pendiente de las curvas obtenidas para las respuestas al canto sintético, son significativamente mayores que las pendientes para las respuestas al tono (Test de rangos de Wilcoxon: $T = -2,012$, $P = 0,0442$). Las otras comparaciones no mostraron diferencias significativas. Las comparaciones de las pendientes entre los cuatro estímulos se presentan en la Fig. 7.

Tabla 4: 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 a al menos un estímulo (Test de rangos de Wilcoxon ($P < 0,05$)).

Comparación	N	Z	P
Canto sintético / Tono	17	-2,012	0,0442
Canto sintético / Canto-ruido	17	-0,402	0,7782
Tono / Ruido	9	-1,244	0,3824
Canto-ruido / Ruido	11	-0,178	0,9721

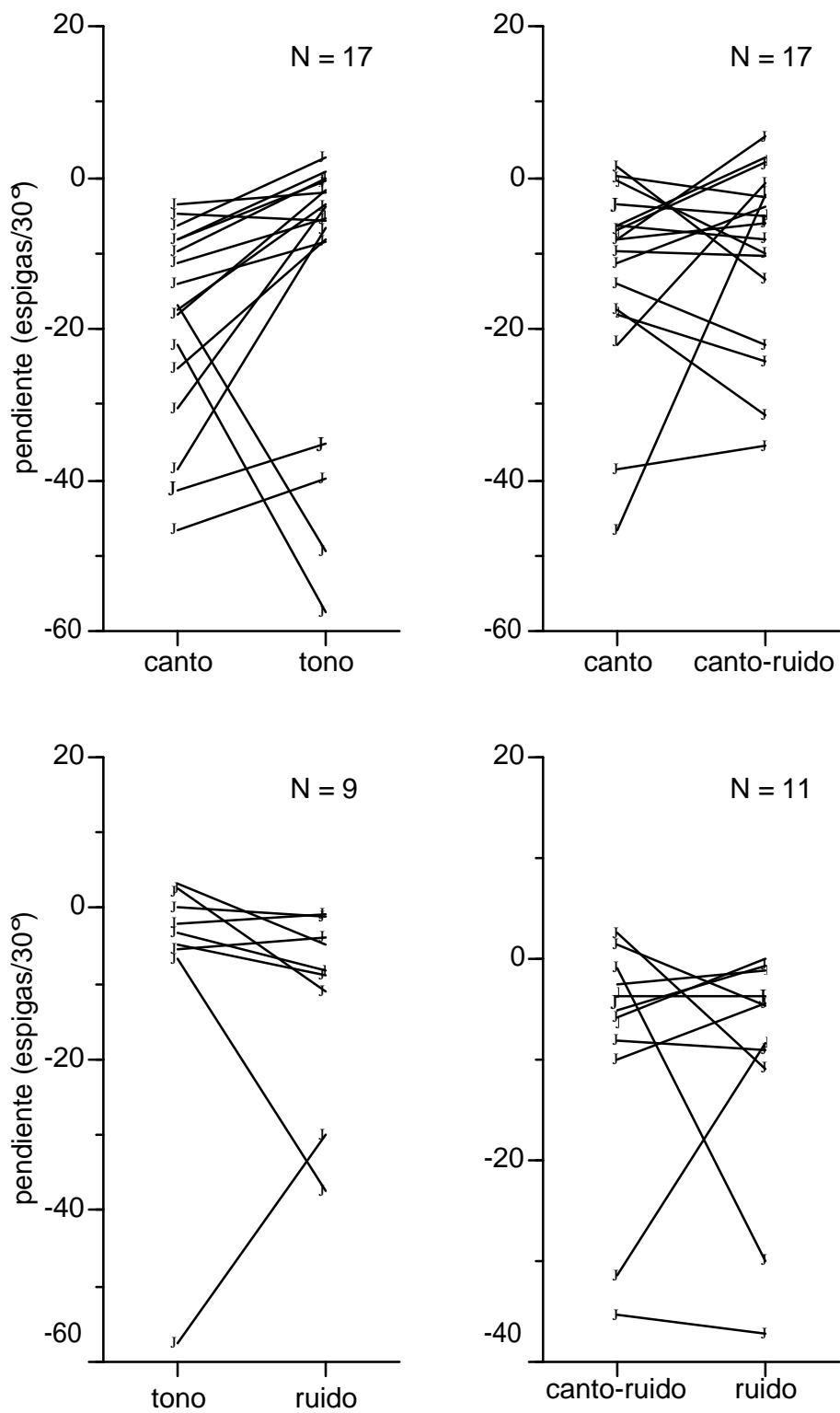


Figura 7: Comparaciones de pendientes lineales de los graficos del numero de espigas en relación a la posición angular del parlante para los 4 estímulos utilizados.

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 5).

Tabla 5: Proporciones de coeficientes de correlación de Spearman entre número de espigas y latencias en respuestas neuronales direccionales a cuatro estímulos

Rho	Canto	Tono	Canto-ruido	Ruido
Negativos (significativos)	55 (18)	29 (14)	18(8)	12(8)
Positivos	6	8	7	5

7.-DISCUSIÓN

7.1 Características generales

Las características generales de las respuestas neuronales registradas en el torus semicircularis de *Pleurodema thaul* son similares a las publicadas por otros autores en otras especies de anuros. Existen en *Pleurodema thaul* 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 la frecuencia dominante del canto de apareamiento de esta especie (Solís, 1994; Penna y Veloso, 1990; Penna et al., 2008)

En relación al patrón temporal de descarga, existen también dos grandes grupos: neuronas fásicas y tónicas, cada uno de los cuales corresponde a la mitad de las neuronas registradas, aproximadamente. La proporción de neuronas fásicas de 51 % es, sin embargo, mayor que la registrada en otras especies (por ejemplo, 33 % en *Rana pipiens* (Feng, 1981) y 23% en *Batrachyla antartandica* (Penna et al., 2001)). Esta tendencia probablemente corresponde a diferencias interespecíficas, sin embargo, el porcentaje obtenido en el actual estudio es también superior al 38% obtenido para *Pleurodema thaul* en un estudio previo (Penna et al., 1997)

7.2 Direccionalidad de las respuestas neuronales

Los patrones de respuestas de las neuronas a estímulos dados desde diversas localizaciones de la fuente sonora en el plano horizontal, fueron clasificados en seis tipos. En respuesta al canto sintético, una proporción mayoritaria de las neuronas (44%) respondieron con mayor número de descargas a posiciones contralaterales de la fuente sonora respecto al hemisferio cerebral registrado. La proporción de neuronas que respondieron de esta forma al tono fue considerablemente menor (27 %). Estos valores son claramente inferiores a la proporción de neuronas que respondieron en forma contralateral en la rana Norteamericana *Rana pipiens*, especie en que cerca de un 80% de las neuronas responde de esta manera. También un

porcentaje considerable de las neuronas registradas respondió de manera similar a la presentación del canto sintético (16%) y tono (40%) desde todas las posiciones angulares de la fuente sonora. Estos porcentajes son muy inferiores a los obtenidos para *Rana pipiens* (Feng, 1981) y es probable que correspondan a diferencias entre estas especies. La menor direccionalidad de las neuronas de *Pleurodema thaul* es congruente con la uniformidad de las respuestas vocales de los machos de esta especie a estímulos provenientes de distintas direcciones.

La mayor direccionalidad de las respuestas neuronales al canto sintético en relación al tono, podría estar determinada por diferencias temporales o espectrales entre ambos estímulos. El espectro del tono tiene la energía concentrada en una sola frecuencia, en tanto que el espectro del canto sintético contiene una importante dispersión de la energía (ver Fig. 1). Los otros dos estímulos usados; el canto-ruido y el ruido, evocan también altos porcentajes de respuestas contralaterales. Dado que estos estímulos también poseen espectros con dispersión de la energía, es probable que la mayor direccionalidad de las respuestas al canto sintético esté relacionada con esta característica espectral. Las respuestas conductuales a estímulos compuestos con ruido son más precisas. Por ejemplo, en lechuzas se ha determinado que estímulos de ruido son localizados con una precisión tres veces superior a estímulos tonales (Knudsen y Konishi, 1979)

Por otra parte, la menor direccionalidad de las respuestas al tono con respecto a los otros estímulos, podría deberse a que en el caso del tono, la densidad espectral del estímulo (dB/Hz) a la frecuencia característica de la neurona, es mayor. En estudios en mamíferos, se ha determinado que neuronas mesencefálicas en respuesta a estímulos de mayor intensidad, son menos direccionales (revisado en Irvine, 1992; Yost, 2007). De acuerdo a los resultados de esta memoria, la diferencia en la direccionalidad de las respuestas al canto sintético y al tono no correspondería a la diferente estructura temporal de estos estímulos, ya que la direccionalidad de respuestas neuronales al canto-ruido y al ruido es similar. Estos dos estímulos difieren en su estructura temporal, pero tienen una estructura espectral similar.

También existen diferencias en la direccionalidad entre las respuestas de neuronas con distinto patrón de descarga temporal. En general, las neuronas con descarga tónica son más direccionales que las neuronas fásicas a los cuatro estímulos utilizados. La menor direccionalidad de las neuronas fásicas puede ser explicada por su menor tasa de descarga (una o dos espigas por estímulo), la cual se mantiene constante en diversas circunstancias de estimulación. Las neuronas tónicas en cambio, al descargar durante todo el estímulo, son más susceptibles de modular su respuesta según distintas condiciones de estimulación. La direccionalidad de las respuestas de las neuronas fásicas resulta especialmente comprometida con el estímulo de tono, ya que éste, al no contener modulaciones de amplitud, genera espigas sólo al comienzo de la señal, en tanto en respuesta al canto sintético, las neuronas fásicas responden generalmente a varias de las cinco modulaciones de amplitud que esta señal contiene.

De manera similar a lo que ocurre con los estímulos tonales, las proporciones de respuestas direccionales al estímulo de canto-ruido son también mayores que al ruido. Sin embargo, el bajo número de neuronas registradas en respuesta a estos estímulos requiere considerar con cautela esta evidencia.

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 por otros autores (Feng, 1981)

La mayor direccionalidad de las respuestas neuronales al estímulo de canto sintético en relación al tono revela que *Pleurodema thaul* posee un sistema auditivo especializado para localizar señales de significado biológico. Esta evidencia complementa los resultados de un estudio anterior (Penna et al., 1997) que había determinado que las neuronas del torus semicircularis de esta especie presentan una gran especialización para procesar las características temporales de su canto de advertencia.

Un estudio paralelo de la direccionalidad de respuestas neuronales de otro anuro chileno, *Eupsophus calcaratus*, realizado con los mismos procedimientos experimentales que el presente estudio (Cuéllar, datos no publicados), ha mostrado una situación contrastante con la de *Pleurodema thaul*. En *Eupsophus calcaratus*, las neuronas mesencefálicas responden más direccionalmente a tonos puros que a estímulos pulsados. A diferencia de *Pleurodema thaul*, esta especie posee un canto de advertencia no pulsado, de modo que la diferencia en las respuestas neuronales indica la existencia de una especialización del sistema auditivo para la localización de sonidos de significado biológico en distintas especies de anuros.

7.3 Comparación estudios conductuales y neurofisiológicos

Los resultados de un estudio conductual de campo realizado previamente con machos de *Pleurodema thaul*, contrastan con los registros neuronales hechos en laboratorio, ya que los sujetos en el estudio de campo respondían indistintamente a estímulos de canto sintético provenientes desde distintas direcciones. Las respuestas neuronales reportadas en esta memoria en cambio, muestran que un gran porcentaje de las neuronas del mesencéfalo auditivo de esta especie responden preferencialmente a algunas direcciones de presentación de éste y otros estímulos. Sin embargo, la proporción de neuronas direccionales encontradas en este anuro es inferior a la reportada previamente para *Rana pipiens* (Feng, 1981), lo cual podría indicar que *Pleurodema thaul* posee un sistema auditivo con menor capacidad de detectar la dirección del sonido. Es necesario considerar, sin embargo, que la ausencia de diferencias en las respuestas vocales no significa necesariamente que los sujetos carezcan de la capacidad de localizar los sonidos de distintas proveniencias, ya que hay otras conductas como cambios de posición o aproximación a la fuente sonora que podrían revelar localización de sonidos (Bee y Gerhardt, 2001). Estas respuestas no fueron medidas en el estudio conductual en *Pleurodema thaul*, pero los animales se mantenían sin alterar su postura durante los experimentos (Pérez, datos no publicados).

La pronta respuesta vocal de los machos de esta especie a estímulos de distintas localizaciones indicaría que en las agregaciones corales es importante la persistencia de su actividad vocal, respondiendo a todas las situaciones de confrontación con otros machos. En diversos estudios

se ha determinado que esta persistencia determina el éxito reproductivo de los machos, ya que las hembras acuden a las áreas de reproducción atraídas por los cantos de apareamiento (Gerhardt y Huber, 2002). Evidencias acerca de la importancia de la mantención de la actividad vocal en *Pleurodema thaul* han sido aportadas por un estudio anterior que ha mostrado que los machos dan respuestas vocales a estímulos de muy baja intensidad, que corresponden a los umbrales auditivos de la especie (Penna et al., 2008). La capacidad de responder tanto a señales de baja intensidad como a señales provenientes de distintas direcciones probablemente esté relacionado con la prolongada época reproductiva de la especie, que en la zona central de Chile se extiende desde Julio hasta Diciembre (Solís, 1994). Durante este prolongado período se dan situaciones de baja densidad de machos, cuya actividad vocal se mantiene a pesar de que la distancia entre vecinos puede ser superior a 20 m (Penna et al., 2008).

|

8.-CONCLUSIONES

1. Una gran proporción de las neuronas mesencefálicas de *Pleurodema thaul* responden de manera diferente a estímulos presentados desde distintas posiciones en el plano horizontal.
2. La forma de respuesta direccional más frecuente es con mayor descarga a estímulos presentados desde la posición contralateral. Sin embargo, esta proporción es menor que la registrada previamente en otros anuros.
3. Las respuestas a estímulos tonales son menos direccionales que a un estímulo que imita el canto natural de la especie y a estímulos constituidos por ruido. Estas diferencias están relacionadas con la mayor dispersión de los espectros de estos últimos estímulos.
4. La direccionalidad de las respuestas está relacionada con el patrón temporal de descarga de las neuronas. Las unidades tónicas son más direccionales que las neuronas fásicas.
- 5.- Este estudio muestra que los machos de *Pleurodema thaul*, poseen un sistema auditivo con capacidad de localizar sonidos, según el plan general de vertebrados.

9.-BIBLIOGRAFÍA

BEE, M. A. Y GERHARDT, H. C. (2001). Neighbor-stranger discrimination by territorial male bullfrogs *Rana catesbeiana*: II. Perceptual basis. *Anim. Behav.* 62: 1141-150.

BOSCH, J. Y MÁRQUEZ, R. (1996). Acoustic competition in male midwife toads *Alytes obstetricans* and *Alytes 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. Pp. 882.

CHRISTENSEN-DALSGAARD, J. (2005). Directional hearing in nonmammalian tetrapods. In: Popper, A. N. y Fay, R. R. eds. Sound source localization. Springer, New York. pp 67–123.

FENG, A. S., GERHARDT, H. C. Y CAPRANICA, R. R. (1976). Sound localization behavior of the green treefrog (*Hyla cinerea*). *J. Comp. Physiol. A* 107: 241-252.

FENG, A. S. Y CAPRANICA, R. R. (1976). Sound localizations in anurans I. Evidence of binaural interactions in dorsal medullary nucleus of bullfrogs (*Rana catesbeiana*). *J. Neurophysiol.* 39: 871-881.

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. (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. A* 144: 419-428.

FENG, A. S. Y LIN, W. Y. (1996). Neuronal architecture of the dorsal nucleus (cochlear nucleus) of the frog (*Rana pipiens pipiens*). *J. Comp. Neurol.* 366: 320-334.

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.

FUZESEY, 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.

FUZESEY, 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.

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.

GERHARDT, H. C. Y HUBER, F. (2002). *Acoustic Communication in Insects and Anurans*. The University of Chicago Press, Chicago. Pp. 531.

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.

IRVINE, D. R. F. (1992). Physiology of the auditory brainstem. En: Fay, R. R. y Popper, A. N. *The mammalian auditory pathway neurophysiology.* Springer Verlag. Pp. 153-231

KAULEN, R., LIFSCHITZ, W., PALAZZI, C. Y ADRIAN, H. (1972). Binaural interaction in the inferior colliculus of the frog. *Exp. Neurol.* 37: 469-480

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

KNUDSEN, E. I. Y KONISHI, M. (1979). Mechanisms of sound localization in the barn owl (*Tyto alba*). *J. Comp. Physiol. A* 33: 13-21

LEWIS, E. R. Y NARINS, P. M. (1999). The acoustic periphery in amphibians: anatomy and physiology. En: Fay, R. R. y Popper, A. N. *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. A* 187: 699-712.

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. *Hearing and Sound Communication in Amphibians.* Springer, New York. Pp. 147-183.

MICHELSSEN, 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 (*Hyperolius marmoratus*). The localization of elevated sound source. *J. Comp. Physiol. A* 154: 189-197.

PENNA, M. Y VELOSO, A. (1990). Vocal diversity in frogs of the South American temperate forest. *J. Herpetol.* 24: 23-33

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. A* 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. A* 187: 901-912

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

PENNA, M. Y QUISPE, M. (2007). Independence of evoked responses from stimulus direction in burrowing frogs *Eupsophus* (Leptodactylidae). *Ethology* 113: 313-223

PENNA, M., VELASQUEZ, N. Y SOLIS, R. (2008). Correspondence between evoked vocal responses and auditory thresholds in *Pleurodema thaul* (Amphibia; Leptodactylidae). *J. Comp. Physiol. A* 194: 361-371

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 communication. En: The evolution of the anurans auditory system. 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. 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. A* 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. 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. Hearing and Sound Communication in Amphibians. Springer, New York. Pp. 184-220.

SOLÍS, R. (1994). Factores moduladores de las interacciones sociales acusticas de *Pleurodema thaul*. Tesis de Doctor en Ciencias con mención en Biología. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Pp. 76.

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. A* 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. Hearing and Sound Communication in Amphibians. Springer, New York. Pp. 221-249.

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 A* 178: 435-445.

YOST, W. A. (2007). *Fundamentals of Hearing. An Introduction.* Academic Press, San Diego. Pp. 338.