

UCH-FC
DOC-BMCN
Q 87
C. 1

*Efectos de los niveles testosterona
plasmática en la fisiología del Torus
Semicircularis (colículo inferior) en
Pleurodema thaul.*

Tesis

Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De



Doctor en Ciencias con Mención en Biología
Molecular, Celular Y Neurociencias

Facultad De Ciencias

Por

Maricel Andrea Quispe Toro

Junio, 2016

Directores de Tesis

Dr.Mario Penna Varela - Dr.Jorge Mpodozis

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

Maricel Andrea Quispe Toro

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 30 de Junio de 2016.

Directores de Tesis:

Dr. Mario Penna Varela

.....

Dr. Jorge Mpodosis Marín

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Juan Bacigalupo (Presidente)

.....

Dr. Julio Alcayaga

.....

Dr. Luis Robles

.....

Dr. Fernando Torrealba

.....



*A las innumerables personas "santiaguinas"
con las que compartí estos largos años...
se convirtieron en mi segunda familia*

RESUMEN BIOGRAFICO



Nací en Iquique y viví allí hasta llegada la adolescencia. Durante mi infancia me perdí jugando entre las dunas de arena de la Cordillera de la Costa y las olas del mar de Cavancha, siempre en compañía de Ana, mi hermana.

Estudí en un colegio de Iquique que te preparaba para ser secretaria. Me vine a Santiago como instinto de búsqueda, de búsqueda de biodiversidad. Y la encontré.

Llegué a las ciencias por intuición y por casualidad. Continúo por intuición. Con algunas complicaciones, como todo. Pero permanezco, y me gusta seguir eligiendo vivir la vida desde esta perspectiva.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia nortina por estar siempre, a cambio de nada. Sobre todo a Ana, mi hermana.

Agradezco a las amigas que en algún momento se convirtieron en mi familia santiaguina: Sandra, Dalia y Ariella.

A Cristián por haber compartido parte importante de esta historia.

A mi reciente familia santiaguina: Magaly San Martín, Ulises Cruz, Jose, Maga y Baltazar. Fueron un soporte importante en estos dos últimos años.

Agradezco a mis amigos Nelson y Patricio, por las infinitas conversaciones, discusiones en la ciencia y en la vida, por el cariño. A mi amiga Orietta por su generosidad.

Agradezco a las personas que conformaron en algún momento el laboratorio de Neurootología en la facultad de Medicina de la Universidad de Chile y a los que ahora lo conforman: a Matías, José Manuel y Aníbal Martínez. Por su presencia, compañía e invaluable discusiones.

Agradezco a los integrantes del Rayo, siempre dispuestos a compartir el tiempo, la reflexión y el cariño: a la Maca, Pino, Alfonso, Marín, Elisa y Solano. En particular a Máximo por escucharme infinita veces mis complicaciones experimentales, a Sara y Morales por el valioso aporte al desarrollo experimental de esta tesis.

Agradezco la paciencia y contribuciones al desarrollo de esta tesis de mis dos tutores: Mario Penna y Jorge Mpodozis. A Jompoma en particular por ser un ser tan científico y sensible a la vez.

Agradezco a la comisión por sus valorables críticas y correcciones a este trabajo.

Finalmente quiero agradecer el financiamiento para el desarrollo de esta tesis otorgado mediante distintas becas: beca de doctorado CONICYT, beca de apoyo de tesis doctoral CONICYT 24100205, y Beca Guillermo Puelma para asistencia a congresos.

INDICE

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCION	1-20
1.1 Temporalidad de la modulación de la plasticidad del sistema nervioso por hormonas esteroidales.	
1.2 Asociación entre la comunicación acústica y la reproducción en vertebrados	
1.3 Modulación de la comunicación acústica mediante hormonas esteroidales sexuales	
1.4 Hormonas sexuales esteroidales y cambios en la sensibilidad de la vía auditiva	
1.5 Blanco cerebral para las hormonas sexuales esteroidales: Receptores de andrógeno	
1.6 Anuros como modelo de estudio de la plasticidad estacional por hormonas esteroidales.	
1.7 Planteamiento del problema y objetivos	
MATERIALES Y METODOS	21-42
2.1 Mantenición de los animales en condiciones de cautiverio	
2.2 Medición hormonal	
2.3 Cirugía de implantes hormonales	
2.4 Expresión de EGR-1 en células del TS	
2.5 Registros electrofisiológicos in vivo en el TS	
2.6 Inmunohistoquímica para receptores de andrógeno	

2.7 Análisis estadístico

RESULTADOS

43-80

3.1 Mantenición de los animales en condiciones de cautiverio

3.2 Cuantificación de testosterona plasmática en animales en cautiverio con y sin implante y en condiciones naturales

3.3 Cuantificación de células EGR-1 positivas en machos mantenidos en condiciones de cautiverio con y sin implante de testosterona.

3.4 Respuesta de las neuronas del TS a estímulos con distintas características espectrales y/o temporales en animales implantados y no implantados.

3.5 Detección de receptores de andrógenos en la vía auditiva mediante el anticuerpo PG21.

DISCUSION

81-97

4.1 Expresión de EGR-1 en el TS ante distintas condiciones acústica y hormonales.

4.2 Dependencia de las respuestas de neuronas auditivas a características temporales del tipo de estímulo acústico y la condición hormonal.

4.3 Variación en los niveles plasmáticos de testosterona en machos *P. thaul*.

4.4 Receptores de andrógeno en núcleos de la vía auditiva de *P. thaul*.

4.5 Selectividad neuronal y hormonas esteroidales

4.6 Selectividad neuronal auditiva y conducta

4.7 Posibles mecanismos de acción para la testosterona

4.8 Conclusiones

BIBLIOGRAFIA

98-107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	3
Variación estacional plasmática de hormonas esteroidales y glicoproteicas en machos anuros <i>Lithobates catesbeianus</i> .	
Figura 2	17
Vías auditivas en anuros	
Figura 3	19
Caracterización temporal y espectral del canto natural de <i>P. thaul</i>	
Figura 4	26
Estímulos utilizados en los experimentos de modulación en la expresión de EGR-1 en el TS de <i>P. thaul</i> .	
Figura 5	32
Estímulos de distinto periodo interpulso utilizados durante la sesión de registro electrofisiológico de las neuronas del TS.	
Figura 6	45
Niveles de testosterona plasmática medida en machos <i>P. thaul</i> mantenidos en distintas condiciones.	
Figura 7	47
Expresión EGR-1 en los núcleos Laminar y Principal del TS.	

Figura 8	51
Número estimado de células positivas para EGR-1 en el núcleo Laminar y núcleo Principal del TS en animales con y sin implante de testosterona y sometidos a estímulo coro o ruido blanco.	
Figura 9	52
Expresión de EGR-1 en células del núcleo Laminar del TS en 3 animales con distinto tratamiento acústico y hormonal.	
Figura 10	54
Potenciales de acción en respuesta a los pulsos de un estímulo acústico.	
Figura 11	56
Distribución de Frecuencias Características de las neuronas del TS.	
Figura 12	58
Ejemplos de selectividad a período interpulso en cuatro neuronas del TS.	
Figura 13	59
Neurona pasa todo y pasa banda.	
Figura 14	61
Distribución de neuronas del TS con distinta selectividad a periodo interpulso en animales con y sin implante de testosterona	
Figura 15	63
Variación de las latencias a estímulos con distinto periodo interpulso, para neuronas de distinta selectividad a PI	

Figura 16	67
Respuestas pasa largo tipo I para neuronas del TS en animales implantados y no implantados.	
Figura 17	68
Respuestas pasa largo tipo II para neuronas del TS en animales implantados y no implantados.	
Figura 18	70
Histograma peri estímulo para neuronas pasa largo con distintos valores de CC y RIQ.	
Figura 19	72
Valores de RIQ y CC de la respuesta de las neuronas pasa largo a un estímulo de período interpulso 409 ms.	
Figura 20	74
Ejemplo de marca de HRP en el núcleo Principal del TS del cerebro de un macho <i>P. thaul</i> .	
Figura 21	78
Células positivas para PG21 en núcleos del cerebro posterior de la vía auditiva de <i>P. thaul</i> .	
Figura 22	79
Células positivas para PG21 en el núcleo DTAM de la vía auditiva de <i>P. thaul</i> .	
Figura 23	80
Células positivas para PG21 en el Palio medial del cerebro de <i>P. thaul</i> .	

LISTA DE TABLAS

TABLA 1	50
Valores de significancia obtenidos en ANOVA dos vías, al comparar número de células positivas para EGR-1 en animales implantados y no implantados sometidos a distintos tratamientos acústicos.	
TABLA 2	50
Valores de P obtenidos en prueba a posteriori de Tukey a partir del ANOVA de tabla 1.	
TABLA 3	64
Latencias para las neuronas del TS pertenecientes a distintas categorías de selectividad a PI.	
TABLA 4	65
Tasa de descarga para las neuronas del TS pertenecientes a distintas categorías de selectividad a PI.	
TABLA 5	73
Proporción de neuronas pasa largo sintonizadas a FC distribuidas en dos clústeres representados en la figura 17.	
TABLA 6	75
Sitios de registro en el TS localizados mediante depósito de HRP.	

LISTA DE ABREVIATURAS

BrdU	:Bromodeoxiuridina
CC	:Índice de correlograma cruzado
CMM	:Mesoplio caudomedial
DAB	:Diaminobencidina
DE	:diámetro externo
DHT	:di-hidrotestosterona
DI	:diámetro interno
DMN	:Núcleo dorsomedular
DTAM	:Núcleo pre-trigeminal del área tegmental dorsal
EGR-1	:Proteína de respuesta a crecimiento temprano-1
FC	:Frecuencia característica
FSH	:Hormona Folículo Estimulante
GABA	:Acido Gamma aminobutírico
GABAA	:Receptor de GABA, ionotrópico
HCG	:Gonadotrofina coriónica humana
HRP	:Peroxidasa del rábano
HVC	:Núcleo HVC, Hiper estriado ventral
I ¹²⁵	:Yodo 125
kHz	:kilo Hertz
LH	:Hormona Luteinizante
Mld	:Núcleo auditivo mesencefálico lateral
ms	:milisegundos
MS-222	:Tricaína metasulfonato
mV	:milivoltios
µm	:micrometro

NCM	:Nidopalio caudomedial
PB	:Buffer fosfato
PBS	:Buffer fosfato salino
PFA	:Paraformaldehído
PG21	:Anticuerpo anti receptor de andrógeno
PI	:Periodo interpulso
Pm	:Palio medial
POA	:Área pre óptica
POM	:Área pre óptica medial
RA	:Núcleo robusto del arqueopalio
RIA	:Radio inmunoensayo
RIQ	:Rango Intercuartílico
rpm	:revoluciones por minuto
SON	:Oliva superior
TS	:Torus semicircularis
VTA	:Area tegmental ventral

RESUMEN

En los distintos grupos de vertebrados, las variaciones en los niveles de hormonas sexuales esteroidales, como testosterona o estradiol, han mostrado tener un rol modulador en la estructura y fisiología del sistema nervioso. Esta modulación no sólo ocurre durante el desarrollo embrionario de un individuo sino también durante su vida adulta, especialmente en la etapa reproductiva, durante la cual las hormonas sexuales se encuentran en mayor concentración respecto a otros momentos del año. Estos cambios hormonales estacionales se relacionan con cambios estacionales conductuales típicos de la época reproductiva, como la emisión de vocalizaciones y el incremento de la sensibilidad auditiva a estas señales.

Los anfibios anuros (sapos y ranas) conforman un grupo interesante para estudiar el efecto de las hormonas sexuales esteroidales, pues la conducta más conspicua durante la época reproductiva, que consiste en la emisión y reconocimiento de vocalizaciones de coespecíficos, es dependiente de estas hormonas. En efecto, existen estudios que han mostrado en hembras de una especie de anuro neotropical la influencia del estradiol en la modulación de la respuesta del Torus semicircularis (TS) a estímulos acústicos de relevancia para la especie. Sin embargo, la posible modulación de la sensibilidad auditiva por testosterona en anuros machos, ha sido menos explorada, con pocos estudios que además han mostrado resultados disímiles.

Esta tesis tuvo como objetivo principal evaluar la influencia de la testosterona en la respuesta de las neuronas del TS en machos del anuro chileno *Pleurodema thaul*. En particular se estudió los cambios en la respuesta neuronal del TS a

estímulos acústicos de distinta relevancia para la especie, en animales tratados y no tratados con testosterona.

Los principales resultados mostraron que los machos de *P. thaul* tienen niveles de testosterona plasmática elevados durante su época reproductiva en condiciones naturales respecto a los niveles medidos en machos mantenidos en condiciones de cautiverio, ya sea fuera o dentro de la época reproductiva.

Mediante implantes de testosterona se logró obtener niveles de testosterona plasmática en animales en cautiverio similares a los encontrados en animales medidos en condiciones naturales durante la época reproductiva.

El grupo de animales implantados mostró un menor número de células positivas para EGR-1 (Early growth response protein 1) cuando fue estimulado con un ruido blanco respecto al grupo de animales que fue estimulado con el mismo estímulo pero que no recibió implante de testosterona. Además en animales implantados y estimulados con un ruido de coro coespecífico se encontró una tendencia a un mayor número de células EGR-1 positivas respecto a animales implantados y estimulados con ruido blanco. EGR-1 es una proteína que se expresa a partir de un gen de expresión temprana que ha sido ampliamente utilizada como un marcador de actividad neuronal. Por esto, la detección de células que expresen esta proteína es homologable a detectar neuronas activas postsinápticamente.

Individuos con implantes de testosterona mostraron un mayor número de neuronas que responden preferentemente a una característica temporal propia del canto de la especie que animales que no recibieron el implante. En particular las neuronas respondían selectivamente a un período interpulso (PI) de 102 ms,

característico del canto de apareamiento emitido por los machos *P. thaul* en condiciones naturales.

Los machos de *P. thaul* también mostraron marca positiva para un anticuerpo (PG21) que reconoce receptores de andrógeno. Células positivas para PG21 se ubicaron en regiones del cerebro anterior y posterior que forman parte de la vía auditiva de los anuros, y que por lo tanto se conectan con el TS. Estos núcleos marcados podrían ser sensibles a la acción de la testosterona, sustentando una acción indirecta de la testosterona sobre las neuronas del TS.

Finalmente, los resultados de esta tesis destacan la relevancia que podrían tener los elevados niveles de testosterona encontrados en machos de *P. thaul* durante la época reproductiva en activar una mayor selectividad auditiva a estímulos acústicos relevantes para la especie durante este período.

ABSTRACT

In different groups of vertebrates, steroidal sexual hormones as testosterone and estradiol exert a modulator role on the physiology and structure of the nervous system. These actions occur during embryonic development and also during adult life, especially in the reproductive cycle, when these hormones are higher than at other times of the year. Seasonal fluctuations of sexual hormones occur concomitant with reproductive displays.

Among amphibians, anurans (frogs and toads) are a most appropriate group to study the effect of sexual steroidal hormones on reproductive behavior because they display conspicuous acoustic signals in chorusing aggregations during the mating season. This mating behavior is dependent on sexual steroidal hormones, as studies in female anurans have provided evidence on a modulator role of estradiol on the activity of neurons of a midbrain auditory center, the Torus semicircularis (TS) in response to acoustic stimuli of biological relevance. However, testosterone influence on auditory sensitivity of the TS in anurans males has been subjected to limited explorations that have rendered dissimilar results.

The main goal of this thesis was to evaluate the modulatory action of testosterone on the responsiveness of auditory neurons in the TS in males of the Chilean frog *Pleurodema thaul*. In particular, we studied how TS neurons respond to acoustic stimuli imitating natural signals of different temporal structure in males with and with no testosterone treatment.

The main results of this thesis show that males of *P. thaul* during the breeding season in the field have higher plasmatic testosterone levels than males in captivity

during and out of breeding season. Plasmatic levels of testosterone similar to those in natural conditions were reached with testosterone implants in captive males.

Testosterone implanted males showed lower numbers of EGR-1 (Early growth response protein 1) positive cells than non-implanted males when exposed to white noise. Furthermore, implanted animals exposed to a conspecific chorus noise showed a tendency to higher numbers of EGR-1 positive cells than implanted animals exposed to white noise.

EGR-1 is a protein expressed from immediate early gene whose expression has been used as a marker of neuronal activity. In consequence, detecting EGR-1 positive cells is similar to find active neurons.

Testosterone implanted males showed larger proportion of band pass neurons than animals with no testosterone implant. These neurons were selective to the acoustic stimulus having a 102 ms interpulse period (IP), which is the characteristic value of the conspecific advertisement call in natural conditions.

Males in captivity conditions had positive mark for antibody PG21 against androgen receptor. PG21 positive cells were located in nuclei and zones of the anterior and posterior brain that conform the anuran auditory pathway

These results highlight the role of elevated testosterone plasmatic levels during the breeding season in the field in promoting responsiveness of *P. thaul* males to signals of biological relevance.

INTRODUCCION

1.1 Temporalidad de la modulación de la plasticidad del sistema nervioso por hormonas esteroideas.

La modulación fisiológica y/o estructural del sistema nervioso por hormonas esteroideas sexuales (e.g. testosterona, estradiol y sus metabolitos como dihidrotestosterona) comienza durante el desarrollo embrionario, durante el cual se establecen las principales diferencias entre los cerebros de machos y hembras (revisado en Panzica y col. 1995, Tobet y Hanna 1997). Posteriormente las hormonas sexuales ejercen efectos muy importantes en la madurez sexual, ya que es en este período de la vida del individuo cuando ocurren incrementos drásticos en sus concentraciones, desencadenando nuevamente cambios a nivel estructural y fisiológico de distintas estructuras corporales, incluyendo el cerebro. Un ejemplo de esta acción es el rol que cumple el estradiol y la testosterona en el remodelamiento sináptico e incremento de la neurogénesis a nivel hipocampal e hipotalámico en ratas adultas hembras y machos. (Revisado en MacLusky y col. 2006, Parducz y col. 2006, Spritzer y Galea 2007). Estos cambios estructurales estarían restringidos al menos en la hembra a su período estral, que dura 4-5 días, durante los que se mantienen elevados niveles de estradiol y ocurre la actividad reproductiva.

Existen, sin embargo, animales en los cuales la época reproductiva persiste durante varios meses del año. En un estudio ya clásico en canarios, Fernando Nottebohm (1981) reportó por primera vez un aumento drástico en los volúmenes de núcleos telencefálicos asociados a la emisión del canto durante la época reproductiva respecto a

otros períodos del año. A partir de este trabajo se iniciaron una serie de investigaciones en las cuales se han ido determinando los factores asociados a la época reproductiva que modulan la plasticidad neuronal estacional, conductual y vocal. Entre estos factores son preponderantes la testosterona y el estradiol, que tanto en hembras como en machos, presentan variaciones estacionales en correspondencia con la plasticidad neuronal y conductual. La plasticidad vocal estacional también ha sido observada en anuros, grupo al cual pertenece la especie utilizada en esta tesis, *Pleurodema thaul*. En los anuros los machos sólo vocalizan y también poseen niveles más altos de hormonas sexuales esteroidales en ciertos momentos del año, en comparación a la época no reproductiva (Figura 1). Esto indica que su cerebro y sistema nervioso estaría sometido a distintas concentraciones hormonales en diferentes épocas del año.

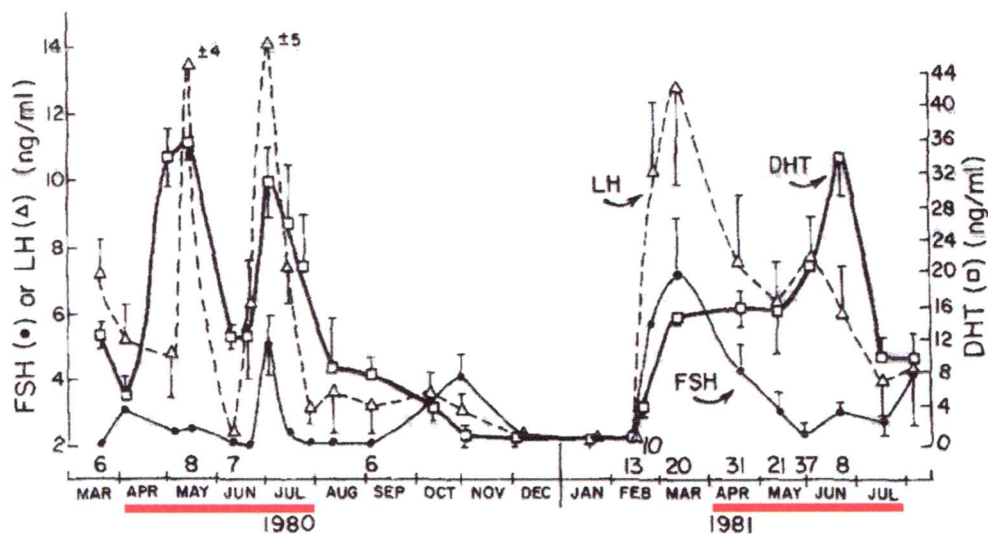


Figura 1. Variación estacional plasmática de hormonas esteroidales y glicoproteicas en machos de *Lithobates catesbeianus*. Se observa que los niveles de las tres hormonas LH (hormona luteinizante) FSH (hormona foliculo estimulante) y DHT (dihidrotestosterona), son más altos durante los meses de la época reproductiva, destacada en color rojo en el eje horizontal (Modificada de Licht y col. 1983).

Los ejemplos descritos ilustran modificaciones de la estructura y función del cerebro vocal y auditivo de individuos adultos en respuesta a cambios en la concentración de hormonas sexuales esteroidales. Estos cambios promueven la comunicación acústica durante la época de apareamiento.

1.2 Asociación entre la comunicación acústica y la reproducción en vertebrados

La comunicación acústica no sólo es relevante en el proceso de apareamiento en aves y anfibios, pues peces, y mamíferos también emiten vocalizaciones características durante sus respectivas épocas reproductivas, que son diferentes a las emitidas en otros períodos del año. Estas vocalizaciones son fundamentales para promover el

apareamiento, y también para modular las interacciones sociales entre individuos. En teleósteos (peces óseos), machos y hembras emiten vocalizaciones en forma persistente durante la época de apareamiento utilizando músculos modificados adosados a la vejiga natatoria. Sin embargo estas vocalizaciones se diferencian espectralmente de las emitidas fuera de la época reproductiva. Un ejemplo en estos vertebrados corresponde a los peces machos de *Porichthys notatus* que emiten señales acústicas que atraen a hembras a sus nidos donde desovan y se aparean (Brantley y Bass 1994). Otro ejemplo de la importancia de la comunicación acústica en los teleósteos corresponde a *Astatolipia burtoni*, especie en que los machos, a pesar de poseer colores llamativos, sólo son elegidos por las hembras si éstos emiten llamados a las cuales las hembras responden de manera selectiva (Maruska y col. 2012).

Aves y mamíferos suelen presentar estructuras sociales más complejas que las de los peces, lo cual se manifiesta en las características de su comunicación acústica. En estos grupos las vocalizaciones no se encuentran restringidas a la época reproductiva, sino que son producidas en distintas situaciones sociales. En *Rattus norvegicus* por ejemplo se han descrito dos grandes grupos de vocalizaciones ultrasónicas, unas de 22 kHz emitidas en un contexto de advertencia y agresividad y otras de 50 kHz emitidas en un contexto de cooperatividad social (revisado en Brudzynski 2013).

En aves ocurre algo similar a mamíferos pues los machos adultos emiten cantos estereotipados de varias sílabas durante época reproductiva con los cuales cortejan a las hembras y defienden sus territorios de otros machos. Estas vocalizaciones reciben la denominación de cantos (“songs”, Williams 2004). Sin embargo machos y hembras son capaces de emitir distintos llamados durante todo el año, los cuales son producidos en

distintos contextos, como contacto de padres y crías, formación de grupos y búsqueda de alimentos. Estas vocalizaciones reciben la denominación de llamadas (“calls”), y a diferencia de las primeras, son de estructura más sencilla y muchas veces no requieren de aprendizaje (Marler 2004).

Un grupo de vertebrados en el cual las vocalizaciones están restringidas principalmente a la época de apareamiento, son los anfibios anuros. Estos vertebrados, conocidos como sapos y ranas, constituyen un grupo monofilético con 3500 millones de años de evolución que se caracteriza, a diferencia de sus grupos hermanos cecílicos y salamandras, por emitir vocalizaciones específicas y estereotipadas en sus componentes espectrales y temporales.

Dependiendo de la especie, la época de apareamiento puede durar desde semanas a varios meses. Es frecuente entonces encontrar agrupaciones de anuros machos de la misma especie emitiendo vocalizaciones durante ciertos momentos del año, generando la actividad coral típica de la época reproductiva. En contraste con lo que ocurre en aves y mamíferos, el rol de las vocalizaciones emitidas por anuros adultos está tan asociado a la reproducción, que fuera de esta época generalmente los individuos sexualmente maduros, y por lo tanto con capacidad de vocalizar, no se encuentran presentes en las áreas reproductivas. En anuros las hembras, que en general no vocalizan se orientan hacia los cantos emitidos por los machos de su misma especie para aparearse. La actividad vocal también es importante para regular las interacciones sociales entre machos, que de esta manera compiten por atraer hembras de manera más efectiva (Wells y Schwartz 2007).

Estos antecedentes contribuyen a señalar a los anuros como un grupo adecuado para estudiar tanto la emisión de vocalizaciones y la recepción de éstas durante la época reproductiva, como la modulación de la comunicación que se establece por factores ambientales externos y/o fisiológicos internos. Entre estos últimos la influencia de hormonas esteroidales sexuales (i.e. testosterona y estradiol) como moduladores de la conducta de apareamiento, constituye un área de activa investigación tanto en anuros como en otros vertebrados (revisado en Wilczynski y col. 2005).

1.3 Modulación de la comunicación acústica mediante hormonas esteroidales sexuales

La modulación de la comunicación acústica mediante hormonas esteroidales sexuales ha sido estudiada principalmente en los aspectos de la emisión de las vocalizaciones, habiendo quedado la recepción de las señales relativamente postergada. En aves, los machos de *Melospiza melodia* presentan vocalizaciones más estereotipadas durante la época reproductiva, cuando tienen niveles de testosterona mayores que fuera de este período (Smith y col. 1997). De manera similar machos de *Zonotrichia leucophrys gambelii* presentan mayores tasas de canto, vocalizaciones más estereotipadas y de mayor duración cuando son tratados con testosterona (revisado en Meitzen y Thompson 2008). La relación entre los niveles de testosterona y la conducta vocal en anuros se evidencia de distintas maneras en diferentes especies. Machos de *Rana pipiens* gonadectomizados dejan de vocalizar, sin embargo cuando se les implanta con trozos de testículos y se les inyecta extracto de hipófisis, éstos vuelven a emitir vocalizaciones, lo cual no se observa suplementando sólo la hormona testosterona (Palka

y Gorbman 1973). En contraste con estos resultados, similares dosis de testosterona o DHT aplicadas en machos de *Xenopus laevis* castrados, reestablecen la conducta vocal (Wetzel y Kelley 1983). Por otra parte en *Hyla cinerea* la testosterona requiere ser aplicada con el neuromodulador vasotocina para producir cambios en la actividad vocal de machos y hembras (Penna y col. 1992). También se han inducido cambios en la actividad vocal espontánea de machos implantados con testosterona respecto a machos castrados no implantados pero en los sujetos implantados no se observan cambios de la actividad vocal evocada por cantos coespecíficos (Burmeister y Wilczyski 2001). En un estudio en condiciones naturales se estableció una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de testosterona y el número de cantos emitidos por machos de *Batrachyla taeniata* ante un estímulo coespecífico (Solís y Penna 1997).

La emisión del canto de anuros está asociada a cambios anatómicos y/o morfológicos de los centros neurales y estructuras anatómicas que participan de la vocalización. Por ejemplo existen cambios en el tamaño y densidad muscular de la laringe (Tobías y col. 1993) y aumento en el volumen de las motoneuronas que la inervan que están relacionados con niveles elevados de testosterona en machos de *X. laevis* (Potter y col. 2005). Sin embargo la ocurrencia de estos cambios anatómicos no ha sido estudiada en animales en condiciones naturales (Leary 2009).

1.4 Hormonas sexuales esteroidales y cambios en la sensibilidad de la vía auditiva

Los cambios en la emisión de vocalizaciones por variaciones en los niveles de hormonas sexuales esteroidales descritas en el apartado anterior, están relacionados con modificaciones fisiológicas y/o estructurales de la vía auditiva y/o motora vocal. La

sensibilidad neuronal de la vía auditiva y/o motora a un estímulo acústico se puede medir de distintas formas, por ejemplo mediante registros electrofisiológicos de las neuronas que componen la vía. En la periferia auditiva, registros electrofisiológicos extracelulares unitarios de fibras del nervio VIII aferentes al sáculo en hembras del pez *Porichthys notatus* presentaron un mayor índice de sincronía con un estímulo acústico de estructura similar al emitido por los machos coespecíficos durante la época reproductiva. Esta correspondencia entre las características espectrales de las vocalizaciones y la sensibilidad del sistema auditivo de la hembra sólo ocurre durante la época reproductiva de la especie, cuando las hembras tienen mayores niveles de estradiol plasmático. Hembras fuera de esta época y tratadas con implantes de estradiol presentan una sensibilidad auditiva similar a la de hembras en época reproductiva (revisado en Sisneros 2009).

En aves paseriformes las neuronas del núcleo premotor robusto del arqueopallio (RA) del circuito cerebral del canto presentan mayor tasa de descarga espontánea cuando son registradas en rebanadas de cerebros de machos adultos de *Zonotrichia leucophrys gambelii* que han sido tratados con estradiol y testosterona (Park y col. 2005). Un aumento similar en las descargas neuronales ocurre en machos de *Melospiza melodia* cuando los registros son obtenidos durante primavera, época de apareamiento de la especie (Meitzen y col. 2007). De manera similar utilizando registros in vivo de respuesta auditiva mesencefálica en machos adultos de *Passer domesticus* se encontró mayores amplitudes de potenciales auditivos cuando los individuos fueron registrados durante la época reproductiva (Henry y Lucas 2009). Asimismo en hembras de la especie *Zonotrichia leucophrys gambelii* se encontraron mayores respuestas a estímulos

acústicos coespecíficos que a heteroespecíficos utilizando registros extracelulares unitarios de neuronas telencefálicas en época reproductiva con niveles estrogénicos característicos de la época (Caras y col. 2015).

En anuros existen igualmente algunas evidencias de modulación de la actividad de neuronas que conforman núcleos de la vía auditiva por influencia de hormonas esteroidales y/o época del año. Estos estudios se han llevado a cabo principalmente en el Torus semicircularis (TS), centro mesencefálico homólogo al colículo inferior en mamíferos. Los primeros estudios muestran aumentos en potenciales evocados auditivos de neuronas del TS en hembras de *Rana pipiens* tratadas con inyecciones intracerebroventriculares de estradiol (Yovanof y Feng 1983) y también una disminución del umbral auditivo registrado en el TS de *Hyla chrysoscelis*, durante los meses de apareamiento de la especie (Hillery 1984). Estudios más recientes en machos de *Rana pipiens* muestran que las neuronas del TS tienen mayor índice de sincronía a un estímulo sintético pulsado similar al canto de la especie durante los meses de época reproductiva y además aumenta el número de neuronas que responden a estímulos de baja frecuencia que corresponden al rango de la papila anfibia, órgano auditivo del oído interno de anuros (Goense y Feng 2005). De manera similar en hembras de *Hyla cinerea* se registraron en neuronas del TS respuestas más intensas a estímulos acústicos de frecuencias en el rango de la papila anfibia en animales en estado de pre-apareamiento que en estado post-apareamiento (Miranda y Wilczynski 2009a). Si bien en ese estudio los niveles hormonales no fueron medidos, existen evidencias de que los niveles de estradiol y progesterona difieren entre animales en ambos estados (Lynch y col. 2006). En contraste con estos resultados en machos de la misma especie no se observaron

diferencias en los umbrales auditivos registrados en el TS entre individuos implantados con testosterona, respecto a animales no implantados (Miranda y Wilczynski 2009b).

La sensibilidad auditiva se puede medir de manera más indirecta que con técnicas electrofisiológicas, mediante la cuantificación de los productos de genes de expresión temprana, como las proteínas C-FOS o ZENK, debido a que la cuantificación de éstas y otras proteínas de expresión temprana resulta incrementada por la actividad neuronal (revisado en Clayton 2000). Esta técnica, a diferencia de los registros electrofisiológicos, tiene la ventaja de ofrecer un panorama más amplio de lo que ocurre con la actividad de distintas áreas cerebrales de manera simultánea.

En distintos vertebrados la sensibilidad en distintos niveles de la vía auditiva puede verse modificada según los niveles de hormonas sexuales esteroidales. La mayoría de los estudios utilizando esta técnica como medida de sensibilidad auditiva se han llevado a cabo en aves. Hembras de *Zonotrichia albicollis* muestran mayor número de células positivas para la proteína ZENK a nivel de diversos núcleos auditivos telencefálicos en animales estimulados con vocalizaciones coespecíficas que en sujetos expuestos a tonos puros. Estas diferencias sólo se manifiestan en hembras previamente implantadas con estradiol (Maney y col. 2006; 2008). Los núcleos en que se expresan estas diferencias son el nidopallio caudomedial (NCM) y mesopallio caudomedial (CMM), la parte dorsal del núcleo auditivo mesencefálico lateral (Mld) y en núcleos que conforman “la red conductual social” como el área preóptica medial (POM), el área hipotalámica medial anterior (AM) y el área tegmental ventral (VTA). Por otra parte, en machos de la misma especie se ha mostrado que existe mayor número de células positivas para ZENK en el NCM de animales implantados con testosterona cuando son

estimulados con un canto coespecífico que en animales estimulados con un tono puro (Matragrano y col. 2013) o bien cuando son estimulados durante la época reproductiva con un estímulo coespecífico respecto a uno heteroespecífico (Phillmore y col. 2011). Todos estos resultados indicarían que el aumento en la sensibilidad auditiva mediada por hormonas esteroidales sexuales es específico para estímulos de relevancia biológica.

En anuros, si bien existen diversos trabajos en los cuales se ha utilizado la cuantificación del mRNA que codifica para la proteína ZENK como una medida de sensibilidad acústica tanto en machos como en hembras de la especie *Physalaemus pustulosus* (Hoke y col. 2004, 2005, 2010), sólo en dos trabajos se ha visto la modulación en la expresión de este mRNA o la proteína mediante niveles hormonales: en hembras de *Xenopus laevis* se observó que en núcleos relacionados con la conducta vocal de los individuos, como estriado ventral (VS) y área preóptica (POA) el número de células positivas para la expresión de la proteína ZENK aumentaba cuando las hembras fueron inyectadas con hormona gonadotrofina coriónica (HCG) y no cuando recibían una inyección de salino. Dado que esas zonas del cerebro poseen receptores LH que son activados por la HCG, el efecto de esta hormona glicoproteica podría ser directo (Yang y col. 2007). Por otra parte en hembras de *Physalaemus pustulosus* se encontró que al ser estimuladas con un coro coespecífico y además ser inyectadas con HCG, presentan mayor cantidad del RNA mensajero para la proteína ZENK en los núcleos auditivos mesencefálicos laminar y principal del TS. Lo interesante de este estudio es que las hembras inyectadas con HCG mostraron mayores niveles de estradiol que las hembras no inyectadas, lo cual sugiere un posible efecto indirecto mediante hormonas esteroidales como estradiol, pues existen varios sitios de unión para estas hormonas en

los cerebros de todos los vertebrados incluyendo anfibios (Lynch y Wilczynski 2008). Sin embargo aun cuando se conoce la presencia de receptores de andrógeno en cerebro de anuros machos y hembras, no se han visto modificaciones en la sensibilidad auditiva o actividad motora por la acción de testosterona utilizando la expresión de ZENK.

1.5 Blanco cerebral para las hormonas sexuales esteroidales: Receptores de andrógeno

Los cambios en la actividad neuronal en núcleos de la vía auditiva y motora descritos en las subsecciones anteriores, al depender de hormonas esteroidales, en caso de actuar de manera directa, requerirían la presencia de receptores en los núcleos en donde ocurre el cambio. Alternativamente, si los receptores se ubican en otros núcleos que conecten con los núcleos focales, las hormonas ejercerían su efecto de manera indirecta. En efecto, es posible encontrar la presencia de los receptores para andrógeno o estradiol en distintos niveles de la vía auditiva o de la vía motora que sustentan la emisión de las vocalizaciones para los distintos grupos de vertebrados.

En el teleósteo *Porychtus notatus*, el receptor de andrógeno se localiza en núcleos de la vía auditiva (i.e. TS) y en la vía motora responsable de la emisión de vocalizaciones (i.e. núcleo vocal motor, POA) (Forlano y col. 2010). En machos y hembras de la misma especie se han localizado receptores para estradiol del tipo ER α a nivel periférico de la vía auditiva (i.e. epitelio sacular), en animales que están en época reproductiva (Sisneros y col. 2004).

En reptiles como los geckos, para los cuales la comunicación acústica forma parte importante del proceso de apareamiento, se encontraron mediante hibridación in



situ marcas positivas para el receptor de andrógeno en el núcleo coclear, TS, POM y núcleo hipoglosal. Los dos primeros núcleos forman parte de la vía auditiva y los dos últimos participan en la emisión de vocalizaciones (Tang y col. 2001). Además, estudios en aves han mostrado la presencia de receptores de andrógeno en núcleos telencefálicos. En particular en machos adultos de *Melospiza melodia*, se detectó la presencia de receptores de andrógeno en el núcleo HVC, siendo mayores las marcas durante la época reproductiva (Soma y col. 1999)

En anuros los trabajos iniciales de Darcy Kelley ubicaron, mediante técnicas de inyección de hormonas radiactivas, los posibles sitios para los receptores de estrógenos y andrógenos en *Rana pipiens* (Kelley y col. 1978). Por otra parte en machos gonadectomizados inyectados con DHT tritiada, se pudo localizar con precisión a nivel cerebral sitios de unión a andrógenos, esto debido a que la DHT no se metaboliza como la testosterona a estradiol. Los sitios con marca positiva para DHT tritiada fueron: la pituitaria anterior, núcleo principal del núcleo V o trigeminal, núcleo Laminar del TS (auditivo), núcleo DTAM (premotor), y núcleos motores del nervio IX y X (glosofaríngeo) los cuales inervan directamente la laringe de *X. laevis* (Kelley 1980). Aunque estos estudios localizaron de una manera indirecta posibles sitios de unión para receptores de hormonas sexuales esteroidales y en particular para andrógeno, estudios más recientes en los cuales se ha detectado el mRNA para el receptor o la proteína misma, han mostrado en su mayor parte coincidencias con los sitios determinados inicialmente. Ejemplos de estas correspondencias son los siguiente estudios: utilizando el anticuerpo PG21 en cerebros de machos de *Rana esculenta* se localizó directamente la presencia del receptor de andrógeno en el TS, núcleos motores del tronco y en otras

regiones telencefálicas (Guerriero y col. 2005). Posteriormente utilizando hibridación in situ para mRNA se ubicó el receptor de andrógeno en cerebros de machos *Physalaemus pustulosus* en los núcleos laminar y principal del TS y en el núcleo DTAM (Chakraborty y Burnmeister 2010). En este estudio al igual que en el estudio anterior además se reportan otras zonas telencefálicas como positivas para el receptor. La coincidencia entre los núcleos cerebrales marcados en ambos estudios no es total, por lo cual es posible que existan diferencias especie específica o que las disimilitudes se deban a las distintas técnicas utilizadas. Sin embargo un resultado común a todos estos estudios es que diversos núcleos de la vía auditiva y motora fueron positivos para la presencia de los receptores de andrógeno.

1.6 Anuros como modelo de estudio de la plasticidad estacional por hormonas esteroideas.

Los antecedentes revisados indican que la modulación auditiva por hormonas sexuales está presente en distintos grupos de vertebrados, principalmente en aves y peces, los cuales se caracterizan por poseer una actividad reproductiva estacional. En anuros, grupo igualmente estacional respecto a su conducta de apareamiento, la modulación auditiva por hormonas sexuales hasta ahora sido explorada únicamente en hembras, exceptuando dos estudios realizados en machos con resultados un tanto disímiles respecto a la participación de la testosterona en esta modulación (Penna y col 1992, Miranda y Wilczynski 2009b). Además considerando las variaciones estacionales para la testosterona en machos de distintas especies de anuros, y lo relevante de interacción vocal entre machos de la misma especie para el establecimiento de la

actividad coral, nos parece interesante indagar en cuales serían los posibles efectos moduladores de esta hormona en la audición de los anuros.

Proponemos entonces estudiar la modulación por testosterona de la respuesta auditiva a nivel mesencefálico en machos de una especie de anuro chilena, y explorar la existencia de receptores de andrógeno en núcleos de la vía auditiva que constituyan blancos del efecto hormonal.

La elección de ese grupo de vertebrados se justifica por la estrecha relación del apareamiento con la emisión de vocalizaciones durante algunos meses del año. Además, en comparación con las vocalizaciones de otros grupos como aves y mamíferos, los anuros emiten cantos menos complejos y más estereotipados, lo cual facilita realizar estudios detallados acerca de las variaciones espectrales o temporales de estos sonidos y del procesamiento de estas señales por individuos coespecíficos, mediados por variaciones hormonales. Resulta de particular interés el estudio de la modulación hormonal del procesamiento auditivo en anuros machos, ya que éstos interactúan entre sí en coros que atraen a las hembras durante la época reproductiva. Las interacciones vocales entre machos requieren de una selectividad auditiva que permita un procesamiento adecuado de las señales coespecíficas.

El nivel cerebral propuesto para estudiar cambios en la selectividad auditiva mediada por hormonas esteroidales es el TS, debido a su posición central en este sistema sensorial, y a que presenta una actividad neuronal estacional en algunas especies. En concordancia con otros estudios que muestran variaciones hormonales estacionales en anuros, se espera que los cambios hormonales determinen las variaciones en la actividad neuronal del TS. Además mediciones preliminares indican que en machos la testosterona

o su metabolito DHT varían estacionalmente siendo mayores los niveles durante la época reproductiva que es también el periodo de actividad vocal.

El TS presenta una gran conectividad, recibiendo aferencias de núcleos auditivos de niveles inferiores, como la oliva superior o el núcleo dorsal medular (DMN) (homólogo al núcleo coclear), y envía eferencias a niveles superiores como el palio medial (Pm), a través de núcleos talámicos (Figura 2). Esta característica justifica la exploración de la presencia de receptores de andrógenos tanto en el TS como a lo largo de la vía auditiva, que medien potenciales efectos hormonales.

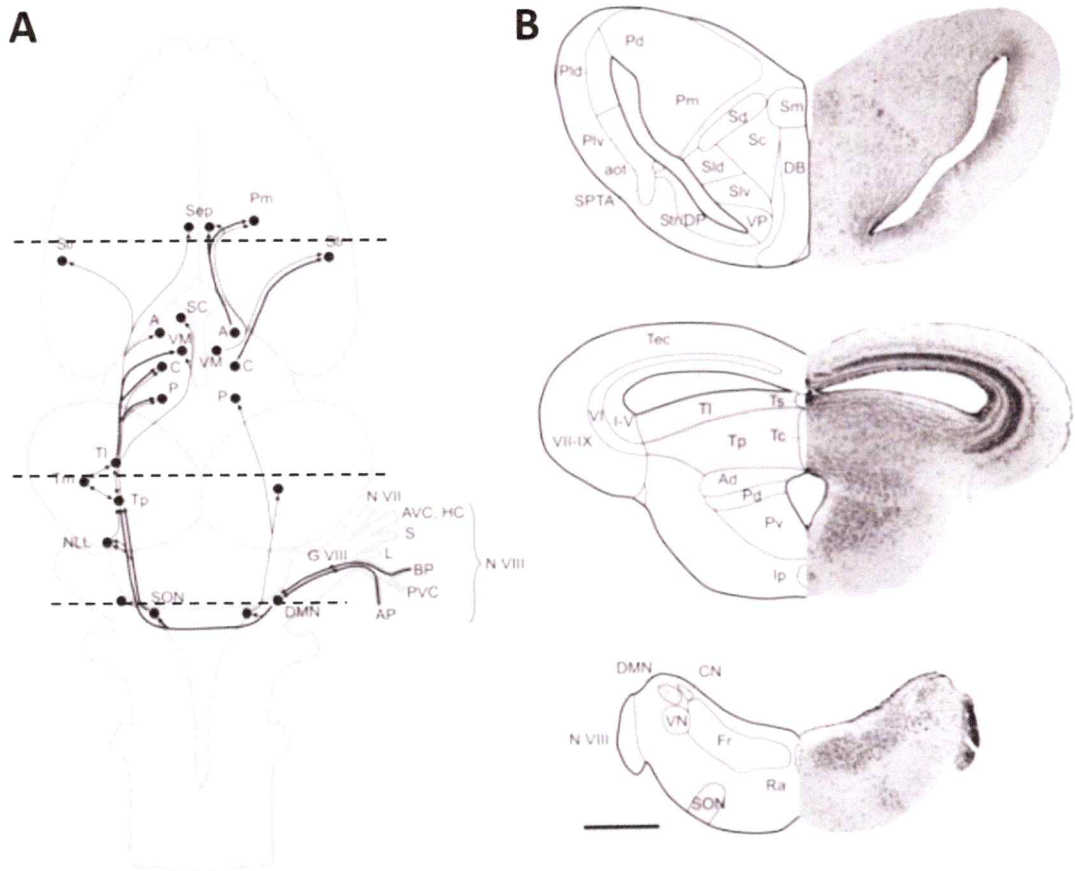


Figura 2. Vía auditiva en anuros. En A se muestra la vía auditiva conformada por núcleos ubicados en niveles inferiores del TS, ubicados en el bulbo raquídeo: Oliva superior (SON) y núcleo medular dorsal (DMN); núcleos talámicos (VM, C y P) hacia los cuales proyecta el TS, y desde los cuales hay eferencias hacia núcleos telencefálicos como el Palio medial (Pm). En B se muestran tres cortes transversales provenientes de los niveles indicados con una línea punteada en A. (figura modificada de Wilczynski y Endepols 2007)

1.7 Planteamiento de hipótesis y objetivos

Los machos del anuro *Pleurodema thaul* vocalizan activamente durante los meses de agosto a diciembre en la zona central de Chile en condiciones naturales. Sin

embargo en condiciones de cautiverio, éstos dejan de vocalizar y de manera concomitante los niveles de testosterona plasmática caen a niveles casi indetectables (Solís 1994).

El canto de esta especie tiene estructura pulsada, con un período interpulso (PI) promedio de 102 ms y una frecuencia dominante promedio de 2100 Hz (Figura 3). Estos antecedentes y los resultados expuestos previamente en anuros y otros vertebrados, justifican indagar la existencia de cambios en la detección y procesamiento de señales acústicas coespecíficas dependientes de cambios en los niveles de testosterona y en los receptores de esta hormona esteroideal.

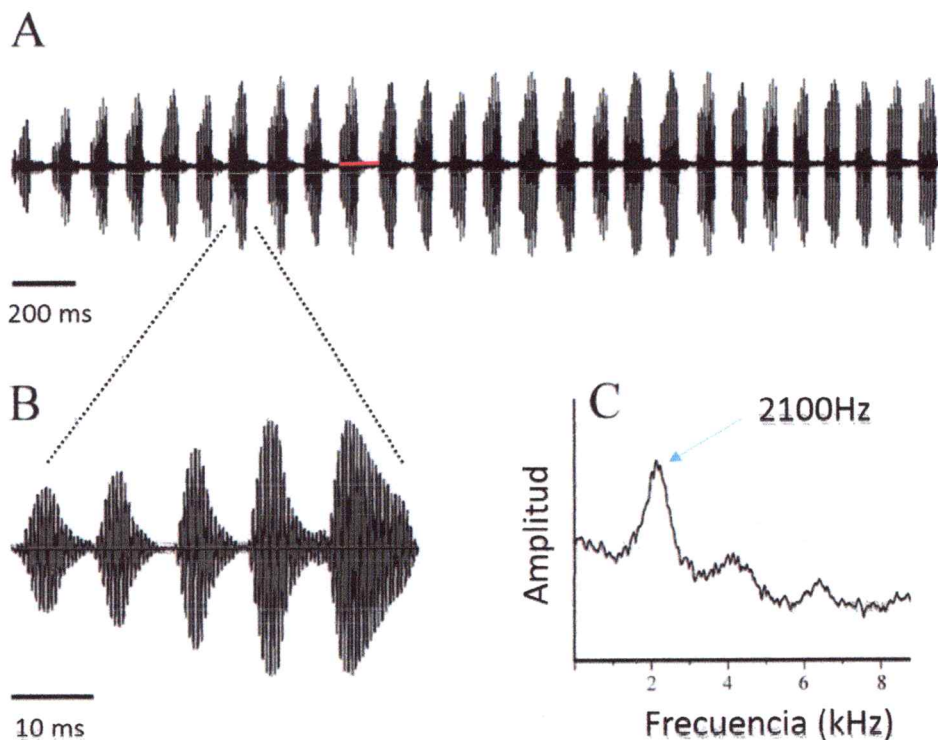


Figura 3. Caracterización temporal y espectral del canto natural de *P. thaul* A) oscilograma del canto de *P. thaul*, el cual muestra el patrón pulsado del canto (27 pulsos) con un PI, destacado en rojo, de 102 ms. Cada pulso posee una duración aproximada de 50 ms. B) Acercamiento de un pulso en A el cual muestra 5 modulaciones intrapulso, cada una de 10 ms de duración. La envolvente que da origen a estos 5 modulaciones intrapulso tiene una frecuencia de 100 Hz C) Espectro de poder de uno de los pulsos en A, el cual muestra una frecuencia dominante de 2100 Hz . La vocalización fue obtenida de un macho *P. thaul* en la localidad de Hospital (Provincia del Maipo 33°49'S 70°45'O).

Nuestra hipótesis fue la siguiente:

El nivel de testosterona plasmática presente en los machos de *Pleurodema thaul* afecta la selectividad de la respuesta de las neuronas del Torus semicircularis, a estímulos acústicos de relevancia biológica para la especie.

Esta hipótesis fue abordada implementando los siguientes objetivos:

- 1) Medición de niveles de testosterona plasmática en condiciones naturales durante la época reproductiva, mediante RIA (radioinmunoensayo) de muestras sanguíneas obtenidas de animales capturados en terreno y en animales mantenidos en condiciones de cautiverio por períodos de diferente duración.
- 2) Medir efectos de los niveles de testosterona plasmática en la actividad de las neuronas de TS en respuesta a señales acústicas coespecíficas mediante inmunohistoquímica para la proteína EGR-1 (ZENK) en las neuronas del TS de animales mantenidos en cautiverio implantados con testosterona y en controles no implantados.
- 3) Medir efectos de los niveles de testosterona plasmática en la actividad de las neuronas de TS en respuesta a señales acústicas coespecíficas mediante registros unitarios extracelulares de las neuronas del TS de animales mantenidos en cautiverio implantados con testosterona y en controles no implantados.
- 4) Detectar la presencia de receptores de andrógenos en los núcleos de la vía auditiva de machos *P. thaul*, mediante inmunohistoquímica para este receptor.

MATERIALES Y METODOS

Todos los experimentos fueron realizados con machos adultos de *Pleurodema thaul*, provenientes de la localidad de Hospital (Paine 33°49'00"; 70°45'00") que tuvieron un peso y talla promedio de 2,5 g y 30 mm, respectivamente. El sexo de los individuos se confirmó al final de cada experimento verificando la presencia de gónadas masculinas.

Todos los protocolos utilizados con los machos de la especie *P. thaul* en esta tesis fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de Universidad de Chile.

2.1 Mantención de los animales en condiciones de cautiverio

Una vez capturados en terreno durante la época reproductiva, los animales fueron mantenidos en condiciones de cautiverio con ciclo de luz oscuridad 14:10 hrs y 18 °C de temperatura. Inicialmente se mantuvieron 5 o 6 machos agrupados en acuarios de vidrio de (30 x 15 x 20 cm) conteniendo gravilla como sustrato y un recipiente con agua. En días previos a cualquier experimento, los sujetos fueron aislados en acuarios individuales del mismo tamaño. Los sujetos fueron alimentados una vez por semana con larvas de tenebrios. La mantención de los animales en cautiverio se realizó en el laboratorio de Neuroetología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

2.2 Medición hormonal

Las mediciones hormonales consistieron en cuantificar el nivel de testosterona plasmática total utilizando un kit de RIA para testosterona total (Siemens Coat A Count; TKTT1) con la siguiente reactividad cruzada para otras hormonas: DHT 3,3% (5 α -Dihidrotestosterona); estradiol 0,02% y Progesterona 0%. Dependiendo del volumen disponible de plasma, la medición se realizó en duplicado para algunas muestras.

La medición hormonal consistió básicamente en un ensayo de competencia entre una muestra problema conteniendo testosterona y una muestra estándar de testosterona radiactiva (I^{125}), las cuales se contrastaron en un tubo recubierto de anticuerpo para la testosterona. Luego de incubar ambas muestras, se eliminó el volumen sobrenadante y se cuantificó la testosterona radiactiva adherida al fondo del tubo con un medidor de radiación gamma. La radiación cuantificada correspondería a una medida indirecta de la concentración de testosterona en la muestra problema. El medidor de radiación gamma fue facilitado por el Laboratorio de Endocrinología dirigido por la Dra. Carmen Romero Osses, en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

Las mediciones de testosterona plasmática se realizaron en distintos grupos de animales: Grupo de campo (N=17): colectamos muestras de sangre por decapitación en animales capturados en el campo durante la época reproductiva (agosto-diciembre). La decapitación fue realizada en distintas noches, para lo cual se procedió a ubicar a un individuo vocalizando, el cual fue estimulado durante alrededor de cinco minutos con un canto coespecífico, a fin de distraer al individuo y así poder capturarlo y decapitarlo. Se colectó la sangre a partir del tronco arterial cervical utilizando el émbolo de una jeringa

heparinizada, la cual se mantuvo en frío hasta la llegada al laboratorio. Una vez centrifugada la muestra (10.000 rpm x 10 minutos), se apartó el plasma sobrenadante y se congeló a -20° C hasta su posterior análisis. Grupo de cautiverio durante la época reproductiva (N=5): estos individuos fueron capturados entre los meses de agosto y octubre y mantenidos durante 3 semanas aproximadamente en cautiverio antes de ser sacrificados. A algunos individuos de este grupo se les extrajo sangre directamente del ventrículo cardiaco previamente a ser perfundidos para procesamiento histológico de sus cerebros; esta modificación se realizó con el objetivo de extraer mayor volumen sanguíneo. Los pasos que siguieron fueron los mismos descritos para los animales del terreno durante la época reproductiva. Grupo de cautiverio fuera de la época reproductiva (N=12): estos individuos fueron capturados entre los meses de agosto y octubre para ser mantenidos hasta por tres meses aproximadamente en cautiverio antes de ser sacrificados durante el mes de enero. Los sujetos fueron decapitados para extraer las muestras sanguíneas. Grupo de cautiverio fuera de la época (N=3): estos individuos fueron capturados entre los meses de agosto y diciembre para ser mantenidos hasta por 5 meses aproximadamente en cautiverio antes de ser sacrificados durante el mes de abril. A estos individuos también se les extrajo sangre desde el ventrículo cardíaco para obtener muestras de sangre para mediciones de testosterona. Grupo cautiverio implantado (N=12): estos individuos fueron capturados entre los meses agosto y diciembre, implantados con testosterona durante dos a tres semanas, para ellos también la muestra sanguínea fue obtenida mediante punción del ventrículo cardíaco.

Los procedimientos que se describen a continuación fueron realizados en animales de cautiverio y el grupo de campo sólo fue utilizado para medición hormonal.

2.3 Cirugía de implantes hormonales

A un grupo de machos mantenidos en cautiverio, se les colocó un implante de testosterona, con la finalidad de aumentar los niveles de la hormona y así estudiar el efecto de ésta en la selectividad de las neuronas del TS a estímulos biológicamente relevantes.

Para los experimentos descritos en los puntos 2.4 y 2.5 se utilizaron algunos animales implantados con testosterona para los cuales se procedió de la siguiente manera en la fabricación de implante y cirugía:

Fabricación de implantes de testosterona

Los implantes fueron fabricados utilizando pequeños trozos de 7 mm de silastic (1,47 mm D.I. 1,96 mm D.E.; Down Corning) los cuales fueron sellados con silicona en ambos extremos luego de ser llenados en su interior con testosterona cristalina (Sigma 86500-5G) (500 µg de testosterona/g peso corporal). Luego de que la silicona de los extremos del implante se secara, los tubos fueron inmersos en NaCl 0,6% en agua destilada durante 24 hrs. Antes de llenar el implante se esperaba a que se secara de la silicona de un extremo durante por lo menos 24 hrs. y se compactaba la testosterona al

interior del tubo con una pequeña cantidad de cera de hueso antes de colocar la silicona en el segundo extremo, con el fin de evitar dejar espacios vacíos al interior del implante.

Cirugía para el implante de testosterona

El implante fue colocado subcutáneamente a través de una incisión realizada en el abdomen entre la glándula dorsal característica de la especie y la pierna derecha, luego de haber extraído ambas gónadas. El músculo y la piel fueron suturados con dos o tres puntos (agujas Braun G0068711).

Para realizar este procedimiento los sujetos se anestesiaban en una solución de MS222 (tricaina metasulfonato) 0,2% durante tres minutos aproximadamente. La cirugía se llevó a cabo sobre una superficie fría y con el animal en posición de decúbito lateral, luego el animal era dejado en posición de decúbito dorsal para que se recuperara de la anestesia.

2.4 Expresión de EGR-1 en células del TS

Se realizaron experimentos de inmunohistoquímica para la proteína EGR-1 en cortes del TS de animales implantados y no implantados con testosterona, los cuales además fueron previamente expuestos a distintos estímulos acústicos; posteriormente se cuantificaron las células positivas para esta proteína en los distintos grupos.

Protocolo de estimulación acústica

Todos los animales fueron privados de estimulación acústica al menos por 12 horas al interior de una cámara semi anecoica, antes de ser expuestos durante 30 minutos a uno de tres tratamientos: un sonido de relevancia biológica (i.e. coro coespecífico), sonido sin relevancia biológica (i.e. ruido blanco) o ausencia de estímulo. Los sonidos utilizados se muestran en la Figura 4. Luego de recibir la estimulación el sujeto experimental quedaba en silencio por 30 minutos, para ser sacrificado y perfundido con NaCl 0,75% y paraformaldehído (PFA) 4 % en buffer posfato (PB) 0,1M.

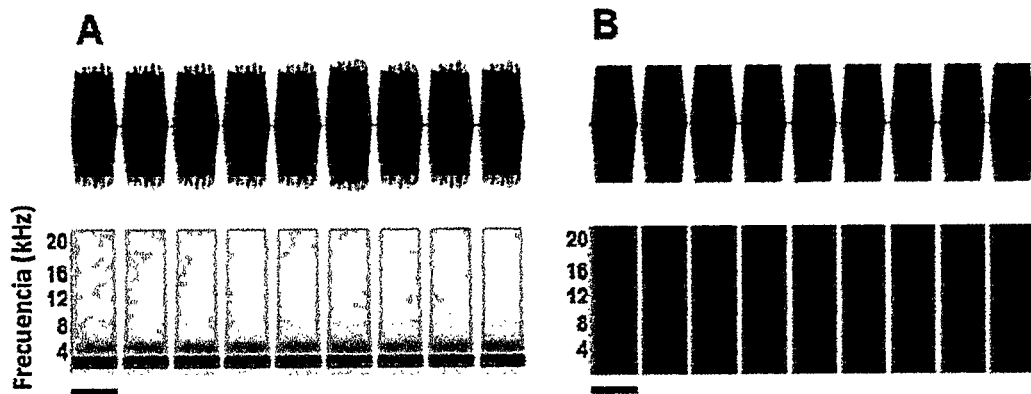


Figura 4. Estímulos utilizados en los experimentos de modulación en la expresión de EGR-1 en el TS de machos *P. thaul*. A) arriba se muestra el oscilograma y abajo el espectrograma del coro en el cual se observa en mayor intensidad la frecuencia dominante del canto de la especie, cercana a los 2 kHz. B) arriba se muestra el oscilograma y abajo el espectrograma del ruido blanco en el que se observa similar energía en todas las frecuencias. Barra indica escala temporal 3 minutos.

Histología e inmunohistoquímica

Luego de perfundir a un individuo, se fijaba su cabeza por 12 horas en PFA 4% para facilitar la manipulación durante la extracción del cerebro, que luego se dejaba en PFA 4% durante dos horas y a continuación durante 12 horas en sacarosa 30% con PB 0,2M.

Para cada cerebro se obtuvo una única serie de cortes de 50 µm de grosor, utilizando micrótopo de congelación (Microm HM430). La serie fue reaccionada contra el anticuerpo policlonal anti EGR-1 (#Sc-189, Santa Cruz Biotechnology) realizando las siguientes incubaciones sucesivas: NaBH₄ (borohidruro de sodio) 0,1% - PBS 0.1 M durante 15 minutos, H₂O₂ 0.3% PBS 0.1M durante 15 minutos, suero de cabra 10%, PBS-tritón (PBST) 0.3% durante una hora a temperatura ambiente y luego a 4°C durante 12 horas. Incubación del anticuerpo primario - anti EGR-1 (1:1000) en 3% suero de cabra PBST 0.3 % a 4 °C por 48 hrs. Finalmente los cortes se incubaron con anticuerpo secundario biotinilado (Jackson immuno Research Laboratories inc. Código ref. 111-065-003) (1:200) durante 90 minutos y en seguida en el complejo avidina biotina peroxidasa (Vectastain, Elite, Código ref. PK6100) durante 1 hora, concluyendo con el revelado con Diaminobenzidina (DAB) (Vector SK-4100). Para poder visualizar la marca EGR-1 positiva y cuantificarla, los cortes fueron montados en porta objetos gelatinizados, deshidratados en alcoholes crecientes, y cubiertos con cubreobjetos y medio de montaje (Entellan, Merck). Entre las sucesivas incubaciones se hicieron 3 lavados en PBS 0,1 M durante 10 minutos. Todas las reacciones fueron hechas en cortes flotantes. Se utilizó como control negativo algunos cortes del TS del cerebro de *P.thaul*

sin el anticuerpo primario y como control positivo algunos cortes del cerebro de rata, en los cuales se ha descrito marca positiva para el mismo anticuerpo primario.

Cuantificación de la marca EGR-1 en el TS

El número de células positivas para EGR-1 en los núcleos Laminar y Principal del TS fue cuantificado utilizando 12 cortes transversales que contenían a estos dos sub núcleos. Las secciones fueron examinadas con un microscopio Nikon Eclipse E400 equipado con una platina motorizada, lo cual permitió la exploración de los cortes en los ejes x-y-z. Los contornos de los núcleos Laminar y Principal del TS fueron delimitados usando el software Stereo Investigator (MBF Bioscience, Williston, VT).

La delimitación de los núcleos se realizó utilizando como guía los límites establecidos en cortes de los mismos niveles sometidos a inmunohistoquímica pero teñidos con cresil violeta realizados en cerebros de otros machos de la misma especie. Para cada núcleo, se estimó el número de células positivas para EGR-1 utilizando el método del Fraccionador óptico (“Optical fractionator”) de Stereo Investigator (West y col. 1991), en forma resumida, de la siguiente forma: se visualizaron células inmunopositivas para EGR-1 a un aumento de 100X usando aceite de inmersión, contando las células contenidas en un cuadrante de conteo de $80 \times 80 \mu\text{m}^2$ cuya posición era determinada por el software sobre grillas de muestreo, las cuales fueron aleatoriamente distribuidas sobre ambos núcleos del TS. Estas grillas median $100 \times 100 \mu\text{m}$ para el núcleo Laminar y $150 \times 150 \mu\text{m}$ para el núcleo Principal. Con las dimensiones

utilizadas se obtuvieron coeficientes de error de Gundersen inferiores a 0,10, lo cual se considera suficiente para este tipo de análisis estereológico.

2.5 Registros electrofisiológicos in vivo en el TS

Se realizaron registros unitarios extracelulares in vivo de las neuronas de los distintos sub núcleos del TS (Principal, Laminar y Magnocelular) en animales implantados con testosterona (N=13) y animales no implantados (N=12). Se obtuvo en promedio 2 neuronas por cada animal. Los registros fueron realizados entre los meses de agosto y diciembre, tiempo que comprende la época reproductiva del animal. Los registros siempre se hicieron con animales inmovilizados con curare, mantenidos al interior de una cámara semi-anechoica en donde recibieron la estimulación acústica, y la manipulación del electrodo y la adquisición del registro se realizaron desde fuera de esta cámara.

En resumen, cada animal fue operado para exponer el mesencéfalo, y luego era dejado durante 12 horas de recuperación post operatoria, al fin de las cuales se sometía a una sesión de registro de 8 a 10 horas de duración, al final del cual se inyectaba, mediante un pulso de corriente, HRP (peroxidasa del rábano). Luego se esperaba 12 horas para la difusión de la HRP en el tejido cerebral, para finalizar con una perfusión transcardial con glutaraldehído. El depósito de la molécula de HRP, nos permitió verificar la ubicación del sitio de registro en el TS. Tanto la cirugía como la sesión de registro fueron realizadas con el animal ubicado sobre una placa Peltier, lo cual permitió mantener a los individuos a una temperatura de 17°C similar a las registradas en época

reproductiva. A continuación se presenta una descripción más detallada de las distintas etapas y procedimientos de una sesión experimental.

Cirugía

Se expuso el mesencéfalo de los machos un día antes del registro electrofisiológico. Para esto primero fueron sumergidos en MS222 0,4% por 4 minutos. Una vez anestesiados los animales se les cortó parte de la piel que cubría la cabeza para luego horadar el hueso del cráneo. De esta forma se expuso la zona dorsal del mesencéfalo (Tectum óptico). Los individuos quedaron en recuperación por 12 horas hasta el momento del registro.

Estímulos

Se construyeron estímulos acústicos utilizando el software SigGenRP Software version 4,4 (2001), el cual también fue utilizado para la presentación de estas señales.

Se construyeron 2 estímulos: un estímulo tonal y un estímulo pulsado. El estímulo tonal consistió en un tono puro de 500 ms de duración con una rampa de ascenso y descenso lineal de 50 ms. Este estímulo se utilizó para determinar la frecuencia característica (FC) de cada neurona. Además se construyó un estímulo pulsado el cual se utilizó para explorar selectividad a período por parte de las neuronas luego de determinar su FC.

El estímulo pulsado estuvo conformado siempre por 5 pulsos, cada uno de los cuales tenía 50 ms de duración y contenía 5 modulaciones intrapulso, cada una de 10 ms de duración. Esta modulación intrapulso no fue modificada durante la estimulación, pero sí el período interpulso (PI). Por lo tanto cada animal fue expuesto a una serie de estímulos de distinto PI: PI de corta duración respecto al PI de la especie (102 ms) y PI de larga duración respecto al PI de la especie. Los períodos utilizados fueron: 58, 68, 81, 102, 135, 202, 300, 409, 500, 550 y 605 ms. En la Figura 5 se muestran ejemplos de los estímulos utilizados.

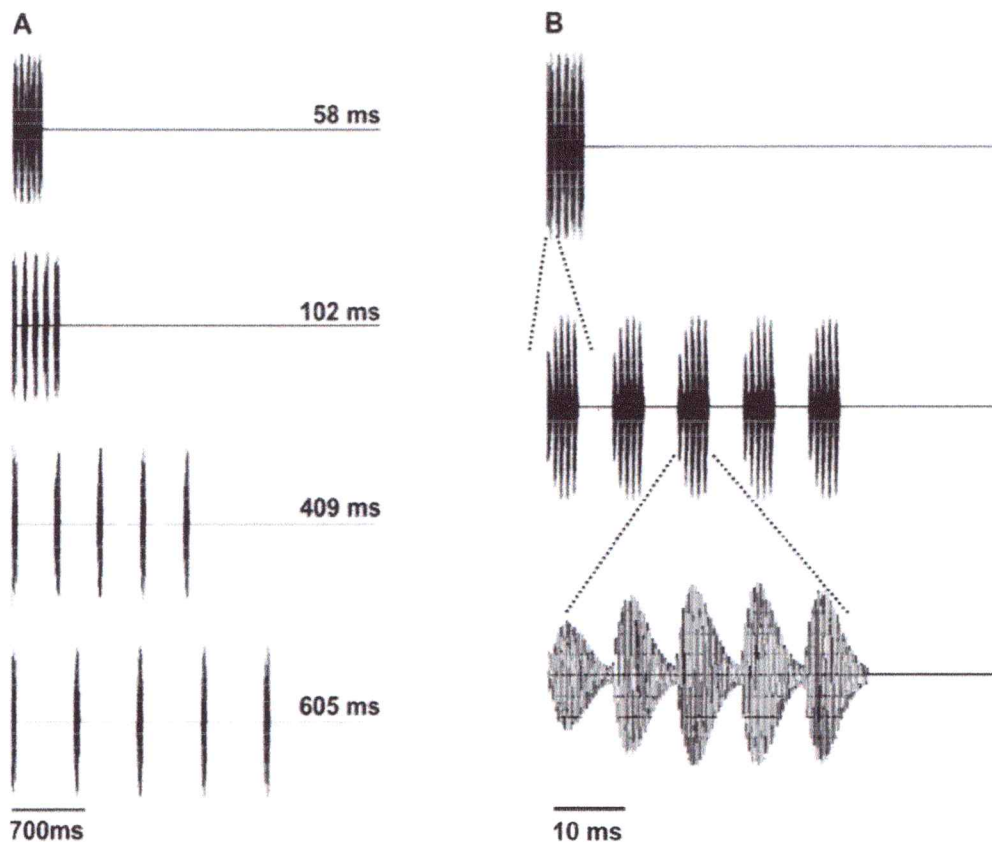


Figura 5. Estímulos de distinto período interpulso (PI) utilizados durante la sesión de registro electrofisiológico de las neuronas del TS. A) Se muestran estímulos de períodos interpulsos de: 58, 102 (PI del canto de la especie), 409 y 605 ms. B) Arriba se muestra estímulo de PI 58 ms, en el centro un acercamiento de los 5 pulsos que conforman al estímulo y abajo se muestra en detalle las 5 modulaciones intrapulso que conforman cada pulso.

El utilizar estímulos acústicos con PI menores y mayores al PI de la especie, se justifica a la variabilidad de la tasa de pulsos (inverso del PI) descrita previamente para los cantos emitidos por machos *P.thaul* en la naturaleza (6,2 -15,3 pulsos/segundo) (Solís 1994, Penna y col 2008), pudiendo ser menor aún la tasa de pulso (y por lo tanto PI de mayor duración) en condiciones basales, i.e. cuando los individuos no están siendo

estimulados. Los valores de los PI utilizados en la construcción de los estímulos, corresponden al promedio de PI de la población \pm una o más desviaciones estándares.

Dispositivo experimental

El sistema de registro estuvo conformado por un sistema análogo digital (Tucker-Davis Technologies, Sistema 3) que permitió la digitalización de la señal eléctrica y la generación de los estímulos acústicos a los que se expuso a los sujetos experimentales.

La señal electrofisiológica, era detectada mediante un electrodo de registro conectado a un preamplificador (Dagan 2400) y luego dirigida sucesivamente a un osciloscopio (Agilent Technologies) y parlante, amplificador operacional y sistema de adquisición Tucker Davies Technologies (Sistema 3), comandado por el software Brainware (versión 9,07).

La señal acústica utilizada como estímulo era generada por el sistema Tucker Davies Technologies comandado por el software SigGen (versión 4,4) - conectada a un atenuador (PA5) - amplificador (NAD 3020)-osciloscopio y parlante (Dynaudio BM 6) ubicado a 1 m del sujeto experimental.

Para registrar la actividad unitaria de las neuronas del Torus, se preparó un electrodo utilizando un capilar de vidrio (diámetro interno 0,58 mm- diámetro externo 1 mm) estirado para obtener una punta de 1-2 μ m de diámetro. Como solución de registro se utilizó Acetato de Potasio (0,2M) y un alambre de plata clorurada (AgCl) como

elemento conductor. En algunos casos antes de llenar el capilar con acetato de potasio, se colocaron 2 μ l de HRP 5% para marcar la zona de registro.

Sesión de registro

El día del registro los animales recibieron una inyección intramuscular de curare (d-tubocurarina) 9 μ g/g peso corporal antes de comenzar el registro. Una vez inmovilizado el animal, fue ubicado al interior de una cámara semi-anechoica, sobre una placa Peltier. Luego se aplicó lidocaína de manera tópica alrededor de la incisión y se volvía a exponer el mesencéfalo, desgarrando la piamadre para posicionar el electrodo sobre la superficie de uno de los hemisferios del Tectum óptico.

i) Detección de actividad neuronal en el TS

A fin de localizar la actividad de las neuronas del TS, el electrodo de registro se desplazó a distintas profundidades desde la superficie del Tectum. El desplazamiento inicial fue de 500 μ m, profundidad a la cual se encuentra el TS bajo el ventrículo tectal. Posteriormente los movimientos de penetración en el cerebro fueron de 20 μ m aproximadamente. Todos estos desplazamientos fueron realizados desde fuera de la cámara mediante un micromanipulador (Narishige MO-8) conectado al electrodo de registro.

A medida que avanzaba con el electrodo, se presentaba el estímulo acústico estándar (PI 102 ms) con una frecuencia dominante 100, 300, 500, 1000 o 2000 Hz. Estas frecuencias cubrían el rango audible del animal, lo que permitió determinar de manera rápida si nos encontrábamos ante una neurona sintonizada a frecuencias altas o

bajas. La sintonía de la neurona fue determinada posteriormente con mayor fineza utilizando los tonos puros con que se determinó la FC de la neurona. Para verificar que nos encontrábamos ante neuronas auditivas del TS respondiendo al estímulo acústico, se observó la coincidencia entre el estímulo y la descarga neuronal en un osciloscopio, escuchando además la actividad neuronal mediante el amplificador y parlante.

ii) Determinación de la Frecuencia Característica (FC)

Luego de determinar con el estímulo estándar el rango de frecuencias preferente para una neurona, el animal fue estimulado con una serie de tonos puros de frecuencias dentro de ese rango con intervalos de 100 Hz. A modo de ejemplo, si una neurona respondía a un estímulo estándar de 100 Hz el individuo fue estimulado con tonos entre 100 y 1500 Hz (tonos bajos) pero si la neurona respondía al estímulo estándar de 2000 Hz, el individuo fue estimulado con tonos entre 1500 y 2400 Hz (tonos altos). Se consideró como FC de la neurona la frecuencia del estímulo tonal que provocó respuesta de la neurona a una menor intensidad del estímulo. Además se determinó el umbral de la neurona para esa FC, es decir la menor intensidad del estímulo capaz de evocar una respuesta ante una serie de 5 tonos de igual frecuencia a la FC (método audio visual convencional). Las estimulaciones posteriores se realizaron con intensidad de 12 dB sobre el umbral determinado, para así asegurar obtener una descarga consistente de la neurona.

iii) Estimulación con distinto periodo interpulso (PI)

Una vez determinada la FC de una neurona, el sujeto experimental fue expuesto a una serie de estímulos pulsados sintéticos de distinto PI (Figura 5), que contenía como frecuencia portadora la FC de la neurona. Estos estímulos tenían las mismas características que el estímulo estándar, excepto su PI. Con la finalidad de observar posibles variaciones en la respuesta neuronal ante cambios en este parámetro, utilizamos la siguiente secuencia de PI: 58, 68, 81, 102 (estímulo estándar), 300, 404, 500, 550 y 605 ms. Se dieron 20 repeticiones de cada estímulo y la estimulación generalmente comenzaba con el estímulo estándar para luego seguir con un estímulo de uno de los extremos de la serie, es decir 20 repeticiones de un estímulo de PI corto y luego 20 repeticiones de un estímulo de PI largo.

Marcaje de sitio con HRP, perfusión e histología

Para localizar el sitio de registro en el TS, al finalizar la sesión de registro, se depositó HRP (P8375-5KU, type VI, Sigma) al 5% diluida en acetato de potasio 0,2M. Debido a que esta molécula tiene polaridad positiva se aplicó una secuencia de pulsos cuadrados de corriente, positivos para su eyección y negativos para su retención, con la siguiente intensidad y duración: 1 pulso positivo de 200 nA durante 5 minutos y luego 1 pulso negativo de 50nA durante 3min (Microiontophoresis Dual Current Generator 260; WPI). Esta secuencia fue repetida 3 veces y después se esperó 8 minutos para retirar el electrodo de su posición. 12-16 horas luego de este procedimiento el animal fue

anestesiado por inmersión en MS222 0,1% y perfundido, con NaCl 0,75% y luego con glutaraldehído 4% en PB 0.1M. El cerebro fue extraído y fijado por 1 hora en glutaraldehído 2% en PB 0.1M. Finalmente para proteger de la congelación se colocó el cerebro fijado, en sacarosa 30% PB 0.1M durante alrededor de 12 horas. De cada cerebro se obtuvo cortes transversales de 40 μm (Microm HM430) para ser incubados en diaminobencidina (DAB) (SK-4100 DAB kit from Vector) y revelar la marca positiva de HRP. Para localizar la marca en alguno de los tres núcleos del TS (ie. Laminar, Principal o Magnoelular), los cortes fueron montados, contrateñidos con cresil violeta, deshidratados y cubiertos con medio de montaje. Previo a la perfusión, se pudo extraer en algunos animales muestra de sangre del ventrículo para determinación de niveles de testosterona.

Análisis de datos

Durante cada sesión de registro, se almacenaron los tiempos a los cuales ocurrieron los potenciales de acción en respuesta a la estimulación con la serie de distintos periodos interpulso (software BrainWare). El Análisis de datos se realizó importando estos tiempos a IgorPro 6.0.

i) Respuesta al estímulo

Se consideró como respuesta a un estímulo determinado los potenciales de acción que se encontraron dentro de la ventana temporal que duró el estímulo más un intervalo de duración igual al PI del estímulo. Debido a que cada estímulo se repitió 20 veces, se obtuvo un número del total de espigas al sumar las espigas obtenidas durante las 20

repeticiones. Para cada estimulación con un determinado PI se obtuvo un número del total de espigas. Cada neurona fue probada con una serie de estímulos de distinto PI, lo cual permitió tener un valor del total de espigas para cada PI, valores con los que se construyeron curvas de selectividad a período para cada neurona, las cuales mostraron el o los PI a los cuales respondía preferentemente una neurona.

El número total de espigas para cada estímulo de PI particular también fue utilizado para construir un histograma peri estímulo (PSTH) de la respuesta neuronal a ese PI. Para los histogramas obtenidos para cada PI se calcularon dos variables que se describen más adelante: valor de cross correlograma (CC), rango intercuartílico (RIQ).

ii) Tasa de descarga

La tasa de descarga fue considerada como el promedio del número de potenciales de acción registrados por repetición de cada estímulo. Considerando que cada estímulo de un PI particular fue presentado 20 veces, para cada neurona se obtuvo un valor de tasa de descarga para cada PI. La tasa de descarga para cada neurona se obtuvo a partir de la respuesta al estímulo de PI al cual la neurona mostró respuesta preferente, coincidiendo con el PI para el cual se determinó la latencia mínima.

iii) Latencia

Se consideró como latencia el tiempo transcurrido entre la presentación del estímulo y la primera respuesta de la neurona. Se obtuvo un valor de mediana de latencia para cada 20 repeticiones de un estímulo de un particular PI. Se utilizó la mediana pues en algunos casos, la primera respuesta no siempre fue al primer pulso, siendo entonces

de duración bastante mayor respecto al valor más frecuente obtenido durante las 20 repeticiones. En caso de utilizar el promedio como medida de dispersión de los valores de latencia, ésta podría haberse sobreestimado.

iii) Selectividad a período

Para determinar si las neuronas del TS mostraban respuesta preferente por estímulos de determinado PI, construimos para cada neurona una curva de transferencia con el número de espigas obtenido como respuesta ante cada estímulo de distinto PI. Cada gráfica tuvo en el eje X el PI de los estímulos a los cuales fue expuesto el animal y en el eje Y la respuesta de la neurona a los estímulos. Esta respuesta fue graficada como un valor normalizado, que se obtuvo dividiendo el número de espigas obtenido para un estímulo de un PI particular, por el número máximo de espigas obtenido durante la serie de estímulos de distinto PI. Se definieron así cinco curvas de transferencia representativas de neuronas con distinta selectividad a período. A) Neurona pasa corto: mayor respuesta a períodos interpulso de menor duración, B) Neurona pasa largo: mayor respuesta a períodos interpulso de mayor duración, C) Neurona pasa todo: no presentaba preferencia a ningún PI, D) Neurona pasa banda: mayor respuesta a un PI particular de valor intermedio, y E) Neurona Compleja: por lo compleja de su respuesta no fueron clasificadas en ninguna de las categorías anteriores. El criterio para establecer que una función de transferencia fue diferente de una función de la categoría pasa todo, fue observar una variación en la respuesta superior al 50% de la máxima respuesta obtenida en la función. Se compararon las proporciones obtenidas de las distintas categorías de

selectividad a período entre los grupos de animales implantados y no implantados con testosterona.

iv) Valor de correlograma cruzado (CC) y rango intercuartílico (RIQ)

Con la finalidad de explorar con más detalle la temporalidad de la respuesta de las neuronas del TS, y detectar posibles diferencias entre la población de animales implantados y no implantados, decidimos caracterizar con estos dos parámetros (CC y RIQ) la respuesta de las neuronas pasa largo, las cuales resultaron ser la categoría más numerosa en ambos grupos de animales.

Calculamos un valor de CC y RIQ para la respuesta obtenida durante la estimulación con el estímulo de PI 409 ms para todas las neuronas pasa largo de animales implantados y no implantados. Escogimos analizar lo que ocurría con estos dos parámetros sólo para la respuesta a un estímulo de 409 ms por las siguientes razones: el período 409 ms fue un período intermedio en el rango de PI de larga duración probados (202-300-409-500-550-605) y al realizar una exploración visual de los PSTH y de los valores de RIQ y CC obtenidos para los PI de larga duración dentro de una misma neurona no encontramos diferencias entre ellos. Además el analizar las respuestas a un solo valor de PI ayuda a presentar con mayor claridad los resultados.

El valor de CC se obtuvo de la siguiente manera: El PSTH obtenido para la respuesta a un PI fue correlacionado con una función que simuló la presentación del estímulo. Valores de CC mayores a cero nos indican una respuesta más intensa dentro de

una fase del estímulo y valores más pequeños de CC, cercanos a cero corresponden a respuestas desfasadas con respecto al estímulo.

El rango intercuartílico corresponde a un rango temporal en el cual se encuentra concentrada el 50% de la descarga de la neurona. A mayores valores de RIQ la respuesta neuronal es más dispersa, en tanto que valores pequeños de RIQ representan una respuesta más concentrada en un intervalo de tiempo. Para cada neurona obtuvimos un valor de RIQ al promediar los RIQ calculados para cada una de las cinco ventanas temporales de respuesta a los pulsos que componían cada estímulo.

2.6 Inmunohistoquímica para receptores de andrógeno

Para detectar la presencia de receptores de andrógeno en núcleos de la vía auditiva en el cerebro de *P. thaul* realizamos inmunohistoquímica para el receptor de andrógeno utilizando como anticuerpo primario policlonal PG21 (cat #06-680, Upstate, Millipore) en cortes transversales de 40 μm de grosor obtenidos para todo el cerebro del animal. Como control negativo utilizamos cortes del cerebro de *P. thaul* pero sin el anticuerpo primario. La inmunohistoquímica para PG21 se hizo en cerebros de animales capturados en terreno y mantenidos en cautiverio. Los animales de cautiverio fueron sacrificados durante de la época reproductiva en octubre, (N=5) y fuera de la época reproductiva en febrero y mayo (N=3). El protocolo de perfusión y de inmunohistoquímica para los cerebros probados para PG21 fue idéntico al utilizado en los cerebros probados para el anticuerpo EGR-1 ya descritos.

2.7 Análisis estadístico

Como pruebas estadísticas se utilizaron, prueba de χ^2 y prueba de Fisher para comparar proporciones de tipos de neurona. También se utilizó ANOVA de dos vías (paramétrico) para comparaciones en los experimentos de cuantificación de células EGR-1 positivas y de una vía no paramétrico para las mediciones de testosterona plasmática (Sigmaplot 12.5). Además se realizó un análisis de clúster para las variables CC y RIQ (Matlab 2014).

RESULTADOS

3.1 Mantenimiento de los animales en condiciones de cautiverio

Los animales mantenidos en condiciones de cautiverio tanto implantados con testosterona como sin implante no presentaron actividad vocal durante su permanencia en el laboratorio.

3.2 Cuantificación de testosterona plasmática en animales en cautiverio con y sin implante y en condiciones naturales.

Con la finalidad de verificar una baja en los niveles de testosterona plasmática en los machos *P.thaul*, reportada previamente por Solís (1994), realizamos mediante RIA, mediciones de los niveles de testosterona plasmática en machos provenientes de distintas condiciones ambientales, i.e. condición cautiverio y condición natural. También se realizaron mediciones de la hormona, en animales en condiciones de cautiverio pero que recibieron un implante de testosterona, a fin de lograr un aumento de los niveles de testosterona en condiciones de cautiverio.

Al contrastar los resultados obtenidos para los distintos grupos de cautiverio, con los obtenidos para machos sacrificados en condiciones naturales (terreno), encontramos que: los niveles de testosterona plasmática fueron siempre menores en los animales de la condición cautiverio sin implante (C1, C2, C3) respecto a la condición natural (N). Sin embargo los animales en cautiverio que recibieron un implante de testosterona mostraron niveles de testosterona similares a los encontrados en machos sacrificados en

condiciones naturales (ANOVA Kruskal-Wallis, $P < 0,001$; prueba a posteriori de Dunn's) (Figura 6). Además los grupos cautiverio sin implante C1, C2 y C3 no mostraron diferencias entre ellos respecto a la testosterona plasmática (ANOVA Kruskal-Wallis, $P = 0,325$) (Figura 6). Estos resultados muestran que los niveles de testosterona plasmática en condiciones de cautiverio siempre fueron más bajos que los encontrados en animales sacrificados en la condición natural, pero que sin embargo mediante implantes de testosterona los niveles de la hormona volvieron a ser similares a los encontrados en la naturaleza. La condición con implante nos permitió entonces tener un grupo de animales en el cual poder testear el efecto de la testosterona sobre la respuesta de las neuronas del TS, objetivos desarrollados en los puntos 3.3 y 3.4.

Además se observó que independiente del momento de año en que se encuentren los machos *P. thaul*, al encontrarse éstos en condiciones de cautiverio, siempre presentaron niveles menores de la testosterona respecto a la condición natural, por lo cual podemos concluir que los niveles de testosterona plasmática en condiciones de laboratorio no se recuperan, a no ser que el individuo reciba un implante de testosterona.

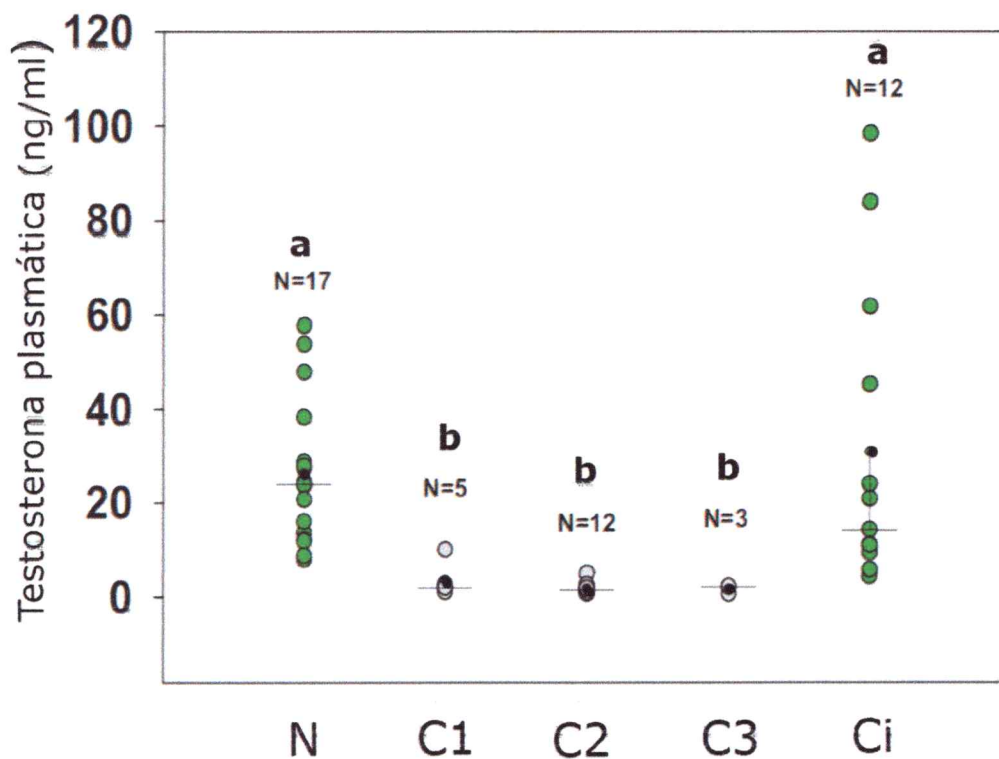


Figura 6. Niveles de testosterona plasmática medida en machos *P. thaul* mantenidos en distintas condiciones. En el eje X, N corresponde al grupo de machos sacrificados en el campo durante la época reproductiva en condiciones naturales, C1 al grupo de machos en cautiverio sacrificados dentro de la época reproductiva, C2 machos en cautiverio sacrificados al inicio de la época no reproductiva, C3 machos sacrificados en cautiverio a mediados de la época no reproductiva y Ci machos implantados con testosterona en cautiverio sacrificados durante la época reproductiva. Las letras a y b indican significancia de cada uno de los grupos respecto al grupo N, letras diferentes entre los grupos comparados indican diferencias significativas (ANOVA de Kruskal-Wallis, $P < 0,001$; prueba de Dunn's a posteriori). Círculo en negro indica el promedio del grupo, barra horizontal la mediana. N sobre cada grupo indica el número de animales por grupo.

3.3 Cuantificación de células EGR-1 positivas en machos mantenidos en condiciones de cautiverio con y sin implante de testosterona.

Para explorar posibles cambios relacionados con la testosterona en la actividad del TS ante un estímulo de relevancia biológica, se realizaron experimentos de inmunohistoquímica para la proteína EGR-1 en cortes del TS de animales implantados y no implantados con testosterona. Estos animales fueron además expuestos a distintos ambientes sonoros, para posteriormente cuantificar las células positivas para esta proteína en los distintos grupos.

Encontramos marca positiva para EGR-1 en células del TS de machos mantenidos en cautiverio en zonas correspondientes al núcleo Laminar, Principal y Magnocelular. Sin embargo, cuantificamos esta marca sólo para los dos primeros, debido a que estos son los núcleos más relevantes en el procesamiento auditivo en anuros, por ser de mayor tamaño, y por tener una delimitación citoarquitectónica más clara. La marca correspondió a una marca nuclear, similar a la descrita para otros vertebrados utilizando el mismo anticuerpo (Figura 7). Esta marca no fue observada cuando se realizó la inmunohistoquímica sin el anticuerpo primario, como control.

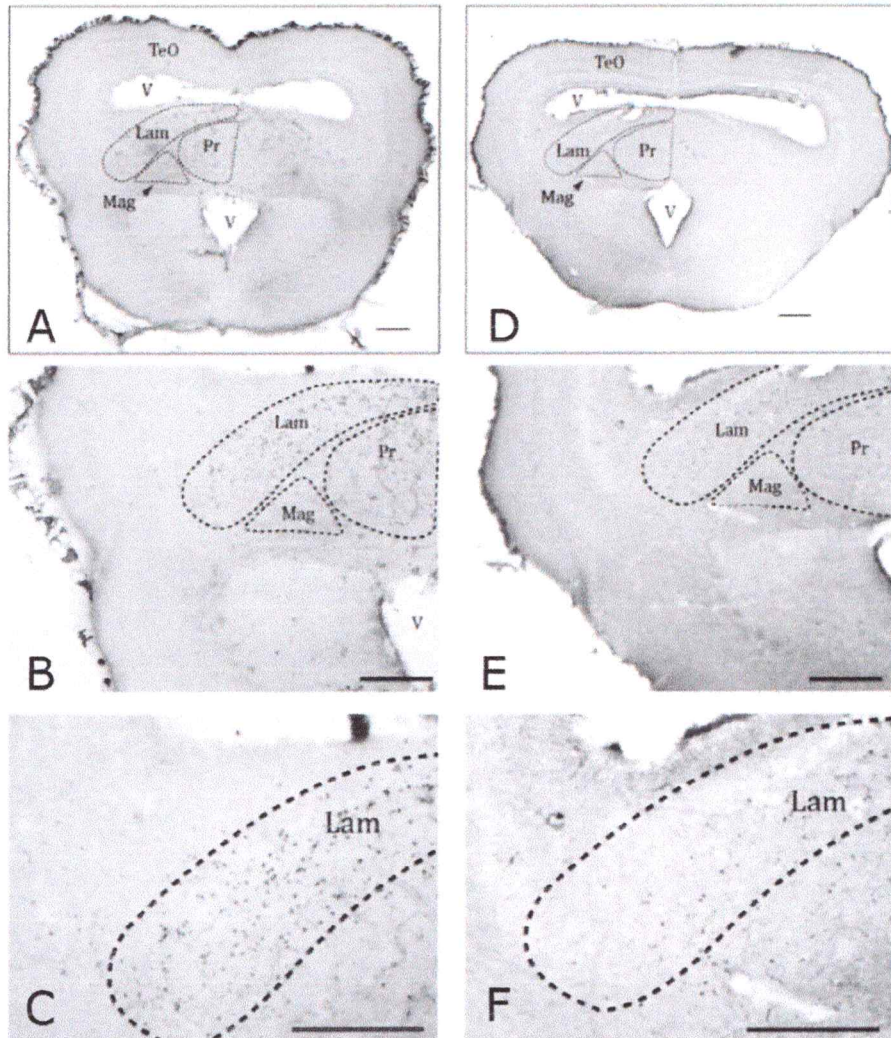


Figura 7. Expresión EGR1 en los núcleos Laminar y Principal del TS. Delimitación de los núcleos Laminar y Principal en los cuales se puede observar células positivas para EGR-1. En la columna izquierda (A, B y C) se muestra un ejemplo de un corte del TS de un animal estimulado con un coro, B y C corresponden a magnificaciones del corte en a. En el panel derecho (D, E y F se muestra un ejemplo de un corte del TS de un animal privado acústicamente por doce horas (tratamiento silencio) E y F corresponden a magnificaciones del corte en D. Se observa menor número de células positivas para EGR-1 en este último caso respecto a lo observado para el animal estimulado con coro. Barra de calibración: 200 μ m. TeO: Tectum óptico, Lam: núcleo Laminar, Pr: núcleo Principal.

La marca para EGR-1 fue observada en todos los grupos experimentales: animales que no recibieron estímulo acústico (grupo silencio) (N=3) (Figura 7D, E y F), animales estimulados con un coro de la especie (grupo coro sin implante) (N=5) (Figura 7A, B y C; Figura 9A), animales estimulados con un ruido blanco (grupo ruido blanco sin implante) (N=3) y animales estimulados con coro o ruido blanco pero que además previamente recibieron un implante de testosterona (grupo coro con implante) (N=4) (Figura 9B) y grupo ruido blanco con implante (N=3) (Figura 9C), respectivamente. Debido a que el grupo silencio no tuvo su contraparte de un grupo silencio con implante, no fue incluido en las comparaciones estadísticas que a continuación se describen.

i) Cuantificación de células EGR-1 positivas en el núcleo laminar.

El número de células positivas para EGR-1 en el núcleo laminar de estos grupos experimentales (Figura 8A), fue significativamente afectado por el tratamiento hormonal (ANOVA de dos vías; $P=0,020$). Por otra parte, el tratamiento acústico mostró una tendencia a afectar el número de células EGR-1 positivo estimado en los distintos grupos experimentales que no alcanzó a ser significativa (ANOVA de dos vías; $P=0,055$). La interacción entre los tratamientos acústico y hormonal no fue significativa.

Al analizar diferencias entre los grupos experimentales, encontramos que el grupo de ruido blanco con implante tuvo menor número de células positivas para EGR-1 respecto al grupo de ruido blanco sin implante (prueba de Tukey $P=0,038$) y también tuvo menor número de células positivas para EGR-1 respecto al grupo de coro con implante, aunque esta diferencia no alcanzó a ser significativa (prueba de Tukey $P=0,05$). Por otra parte, el grupo estimulado con coro sin implante tuvo un número

similar de células EGR-1 positivas que el grupo estimulado con coro que sí recibió implante (prueba de Tukey $P=0,189$) (Tabla 2).

Estos resultados podrían ser interpretados como que los machos que recibieron un implante de testosterona y fueron estimulados con ruido blanco, presentaron menos células activas en el núcleo laminar que los individuos expuestos al mismo estímulo pero que no recibieron el implante hormonal. Además, el grupo implantado y estimulado con ruido blanco mostró incluso menos células activas que el grupo implantado pero estimulado con un coro, aun siendo esta diferencia no significativa. Por otra parte el número de células activas del núcleo laminar no difirió entre los tratamientos acústicos de coro y ruido blanco en ausencia de implante hormonal.

ii) Cuantificación de células EGR-1 positivas en el núcleo Principal

El número de células positivas para EGR-1 en el núcleo Principal (Figura 8B), fue afectado por el tratamiento hormonal (ANOVA de dos vías; $P= 0,025$), sin embargo no hubo un efecto explicado por el tratamiento acústico (ANOVA de dos vías; $P= 0,772$). La interacción entre los tratamientos acústico y hormonal tampoco fue significativa. Una prueba a posteriori mostró que la única diferencia significativa ocurrió entre el grupo implantado estimulado con ruido blanco y el grupo estimulado con ruido blanco que no recibió implante hormonal, teniendo el grupo implantado menor número de células EGR-1 positivas que el grupo no implantado, de manera similar a lo encontrado para el núcleo Laminar (prueba de Tukey $P=0,04$). Sin embargo para este núcleo no hubo diferencia significativa entre el grupo implantado estimulado con coro y el grupo implantado estimulado con ruido blanco (prueba de Tukey $P= 0,383$) (Tabla 2).

De manera similar a lo encontrado para el núcleo Laminar, estos resultados indican un efecto de la testosterona en modular el número de células que se activan en el núcleo Principal de individuos estimulados con ruido blanco.

Núcleo	Factor	grados de libertad	F	P
Laminar	hormonal	1	7,331	0,020 *
Laminar	acústico	1	4,595	0,055 #
Laminar	hormonal x acústico	1	0,867	0,372
Principal	hormonal	1	6,695	0,025 *
Principal	acústico	1	0,089	0,772
Principal	hormonal x acústico	1	1,036	0,331

Tabla 1. Valores de significancia obtenidos en prueba de ANOVA de dos vías al comparar el número de células EGR-1 positivas cuantificadas en los núcleos Laminar y Principal en animales sometidos a distinto tratamiento hormonal (con y sin testosterona) y expuestos a distintos estímulos acústicos (coro o ruido blanco). * indican valores significativos ($P < 0,05$), # indica valor cercano a la significancia.

Núcleo	x	CORO	RUIDO BLANCO
Laminar	CORO	0,189	0,057#
	RUIDO BLANCO	0,399	0,038*
Principal	CORO	0,242	0,383
	RUIDO BLANCO	0,613	0,040*

Tabla 2. Valores de P obtenidos en prueba a posteriori de Tukey a partir del ANOVA mostrado en Tabla 1. En gris se representa al grupo implantado, en blanco al no implantado. * indica diferencia significativa ($P < 0,05$) entre el grupo ruido blanco sin implante y grupo ruido blanco con implante, tanto para el núcleo Laminar como Principal. # indica valor cercano a la significancia para los grupos coro con implante y ruido blanco con implante para el núcleo Laminar.

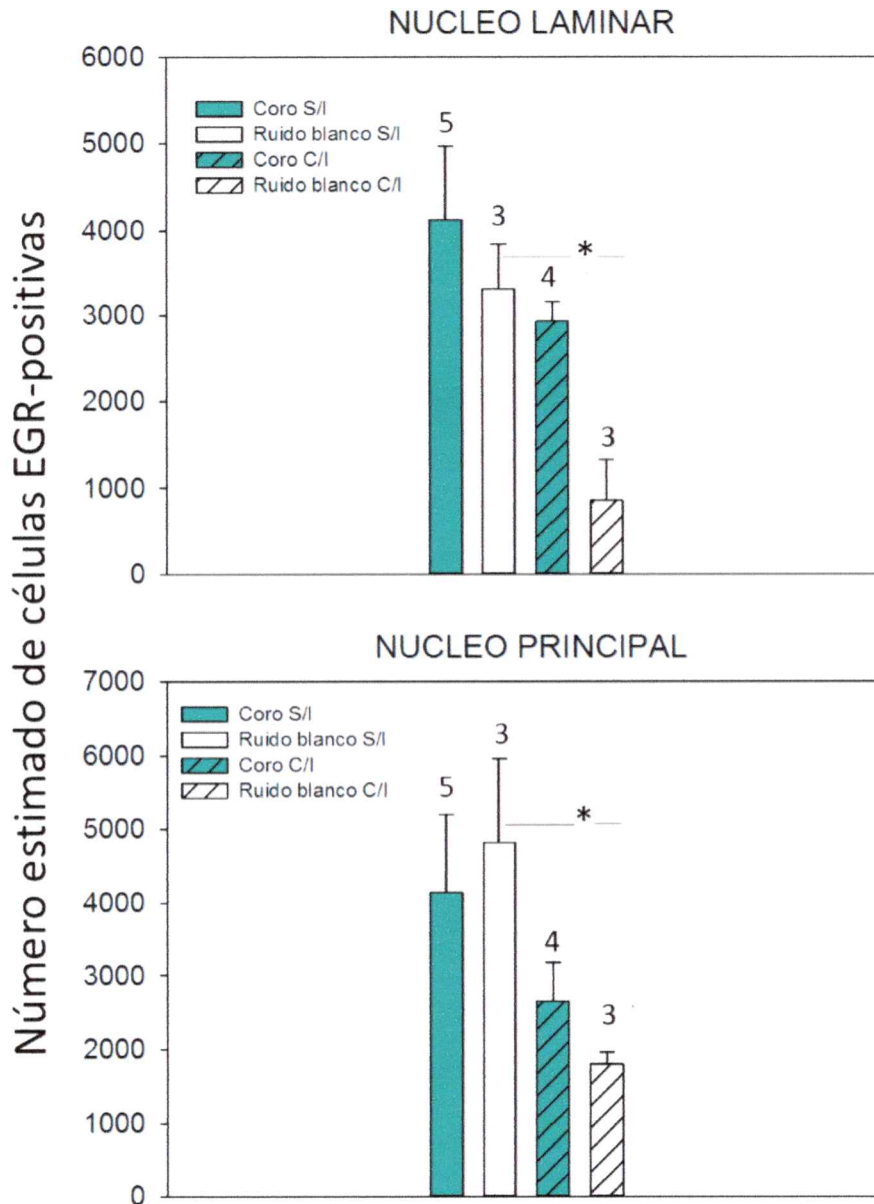


Figura 8. Número estimado de células positivas para EGR-1 en el núcleo Laminar y núcleo Principal del TS en animales con y sin implante de testosterona y sometidos a estímulo de coro o ruido blanco. A) Células positivas para EGR-1 en el núcleo Laminar. B) Células positivas para EGR-1 en el núcleo Principal. En ambos casos se grafican los promedios \pm error estándar, (*) indican diferencias significativas entre el grupo de ruido blanco sin implante y de ruido blanco con implante. Los números sobre las barras indican el número de animales en cada grupo. S/I significa sin implante; C/I con implante.

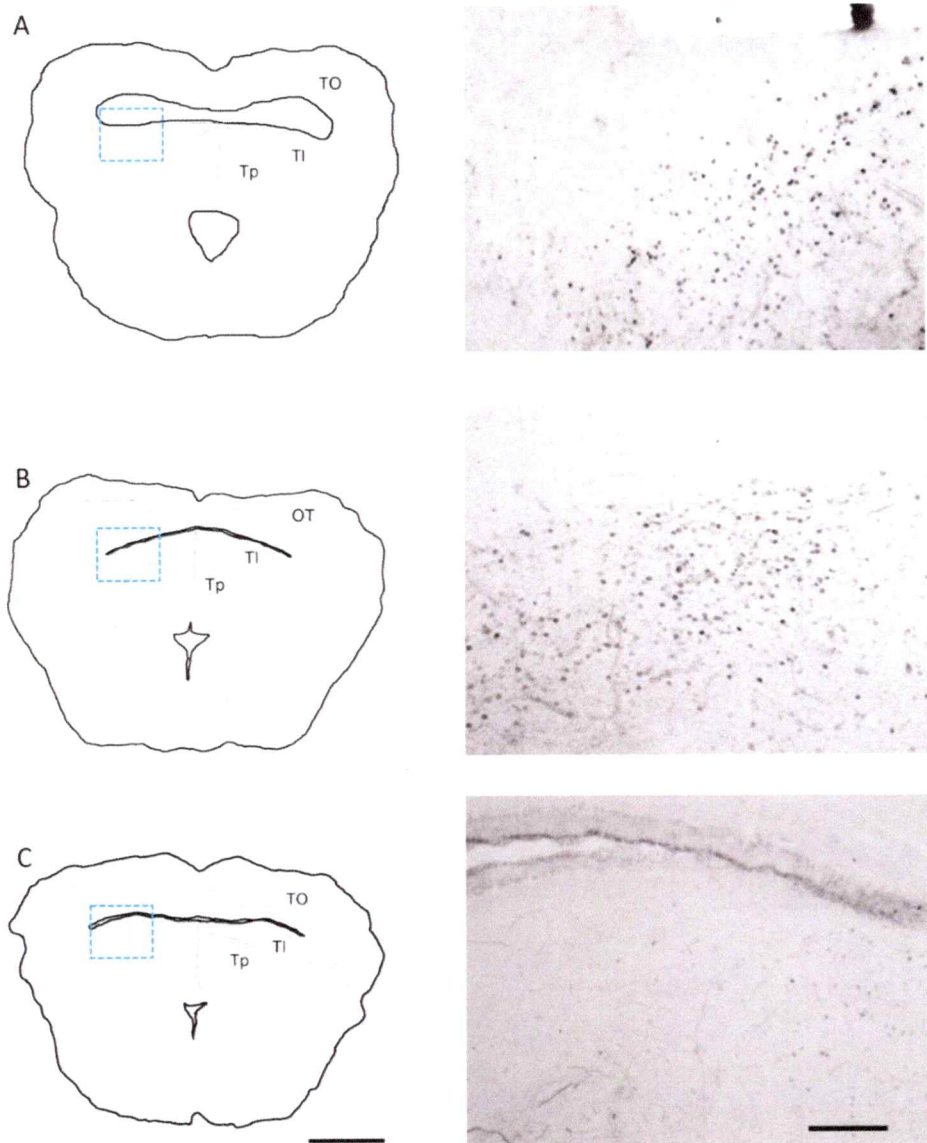


Figura 9. Expresión de EGR-1 en células del núcleo Laminar del TS en 3 animales con distinto tratamiento acústico y hormonal. A la izquierda de la figura se muestra el dibujo para tres cortes representativos del TS de tres animales. En cada corte se muestra un recuadro en línea punteada indicando una zona del núcleo laminar conteniendo células positivas para EGR-1 detectadas por inmunohistoquímica, las cuales se observan en las fotos a la derecha. A) Células EGR-1 positivas para un animal no implantado estimulado con coro. B) Células EGR-1 positivas para un animal estimulado con coro e implantado con testosterona C) Células EGR-1 positivas para un animal estimulado con ruido blanco e implantado con testosterona. Se observa claramente un menor número de células positivas para EGR-1 en este último caso. TO: Tectum óptico, TI: núcleo Laminar, Tp: núcleo Principal. Barra de calibración: 200 μ m.

En resumen estos resultados nos muestran que las células del núcleo Laminar y Principal del TS, se activan en menor número por un estímulo sin relevancia biológica como el ruido blanco, pero sólo si los individuos son previamente implantados con testosterona. Este resultado sugiere una posible modulación de la testosterona sobre la actividad del núcleo Laminar y Principal, principalmente disminuyendo la respuesta a un estímulo no relevante como un ruido blanco.

3.4 Respuesta de las neuronas del TS a estímulos con distintas características espectrales y/o temporales en animales implantados y no implantados.

Con el fin de estudiar el efecto de la testosterona sobre la selectividad de las neuronas del TS a características temporales y/o espectrales de un estímulo acústico de relevancia biológica, se realizaron registros unitarios extracelulares in vivo de las neuronas de los distintos núcleos del TS, en animales con y sin implante de testosterona.

Se registró la actividad de 37 neuronas del TS de 12 animales implantados y 35 neuronas de 13 animales no implantados. Los registros fueron realizados entre los meses de agosto y enero, en diferentes años (2011-2013). No analizamos la actividad espontánea de las neuronas del TS, pero esta fue muy baja tanto en el grupo implantado como en el grupo sin implante (1 espiga/segundo aproximadamente). En la Figura 10 se observa la descarga registrada para una neurona respondiendo a un estímulo de PI de 605 ms.

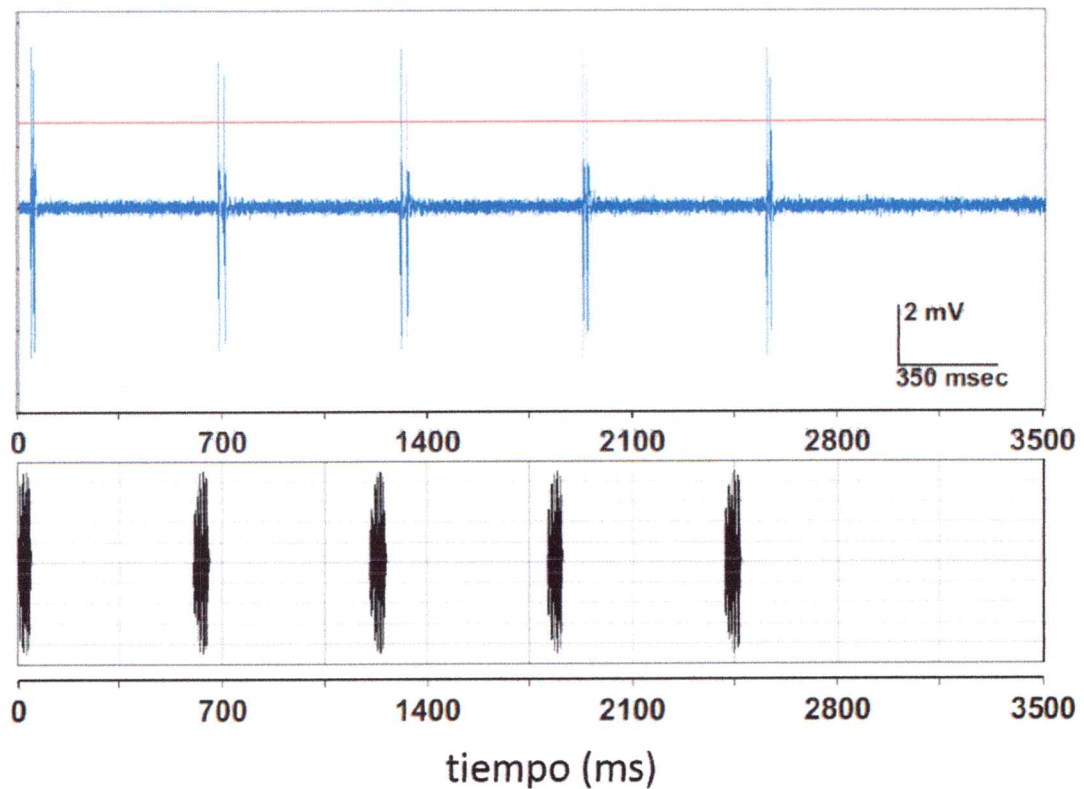


Figura 10. Potenciales de acción (trazado superior), en respuesta a los pulsos de un estímulo acústico de PI 605 ms (trazado inferior). El umbral de detección de potenciales de acción corresponde a la línea roja. Se indica arriba escala de amplitud del potencial de acción en milivoltios (mV) y escala temporal en milisegundos (msec).

i) Determinación de Frecuencia Característica (FC)

Durante la determinación de la FC, 7 de 37 neuronas de animales implantados no respondieron al estímulo de tono puro. Sólo 1 de 35 neuronas de los animales no implantados presentó esta característica. En estos casos la FC fue determinada utilizando el estímulo pulsado estándar de PI 102ms.

Se encontraron neuronas con FC entre 100 Hz y 2400 Hz tanto en animales implantados como no implantados. En ambos grupos se observó una distribución

bimodal de las FCs determinadas para las neuronas del TS (Figura 11). El rango para las FC altas fue entre 1500 y 2400 Hz para ambos grupos de animales, en cambio el rango de las FC bajas fue entre 100 y 600 Hz para el grupo no implantado y entre 100 y 300 Hz para los animales implantados. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre las distribuciones de FC bajas entre animales implantados y no implantados (prueba de Kolmogorov-Smirnov; $P= 0.9711$). Tampoco encontramos diferencias en la proporción de neuronas de FC menor y mayor de 1000 Hz entre los animales implantados (0,70) y no implantados (0,63) (prueba de $\chi^2 = 0,174$; $P = 0,677$).

Estos resultados muestran principalmente que el rango de frecuencias audibles para el grupo implantado y no implantado fue similar, y por otra parte que la selectividad espectral de las neuronas del TS no depende de los niveles de testosterona.

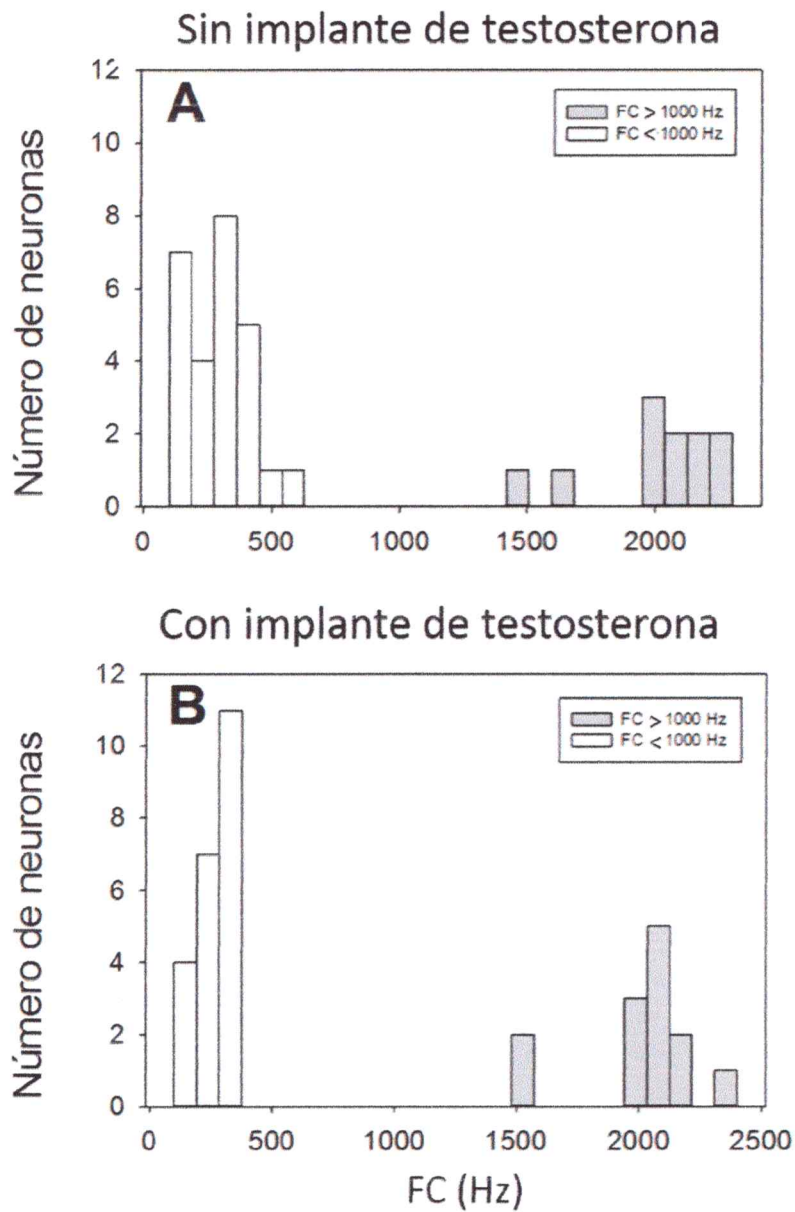


Figura 11. Distribución de Frecuencias características (FC) de las neuronas del TS en machos *P. thau* en A) mantenidos en cautiverio sin implante de testosterona (N= 35) y en B) mantenidos en cautiverio pero implantados con testosterona (N=37).

ii) Respuesta a un estímulo pulsado: Selectividad de las neuronas pasa banda

Una vez obtenida la FC de cada neurona se registró la respuesta a una serie de estímulos pulsados para 30 neuronas en animales implantados y para 34 neuronas en animales no implantados. En las neuronas restantes no se completó esta medición pues se perdió el registro, debido a movimiento del sujeto experimental.

La mayoría de las neuronas respondió a todos los estímulos, aunque con distinto número de descargas dependiendo del PI. Esto reveló neuronas de distinta selectividad a PI: neuronas pasa largo, neuronas pasa corto, neuronas pasa todo, neuronas complejas y neuronas pasa banda. En la Figura 12 se muestran ejemplos para cuatro de las curvas de selectividad. En la Figura 13 se muestra un caso de neurona pasa banda junto a un caso de neurona pasa todo, en la cual se contrasta la selectividad al periodo interpulso (PI) del estímulo, i.e. neurona pasa todo no mostrando selectividad a PI y una neurona pasa banda mostrando selectividad por el PI de 102 ms.

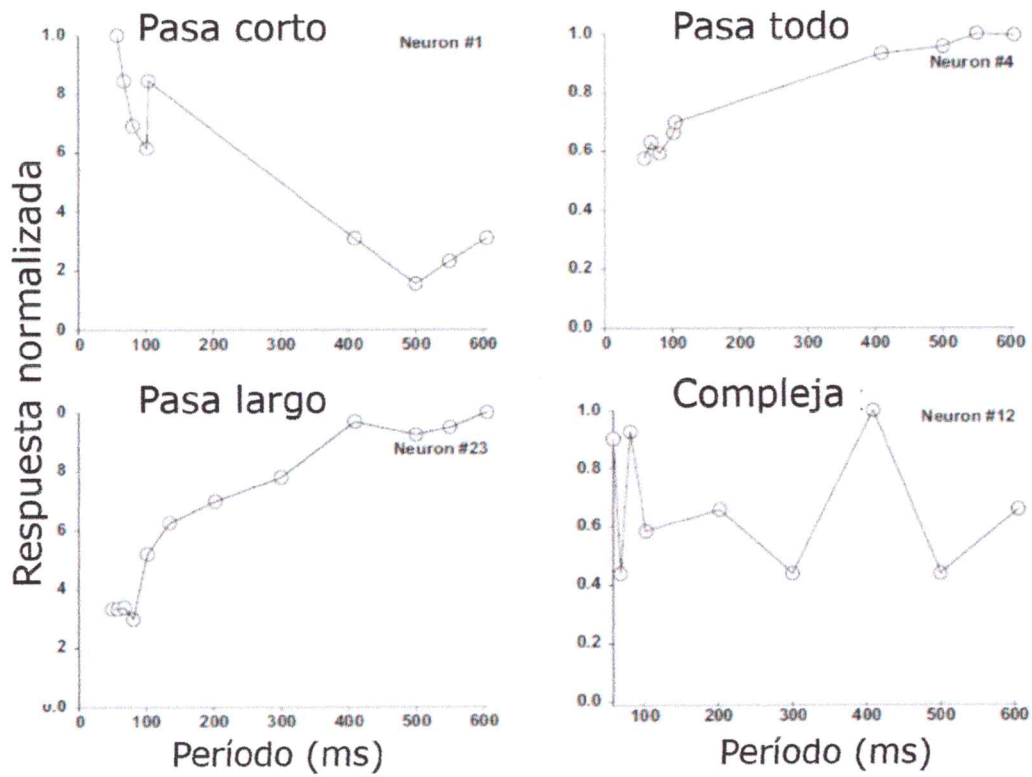


Figura 12. Ejemplos de curvas de selectividad a PI para cuatro neuronas del TS.

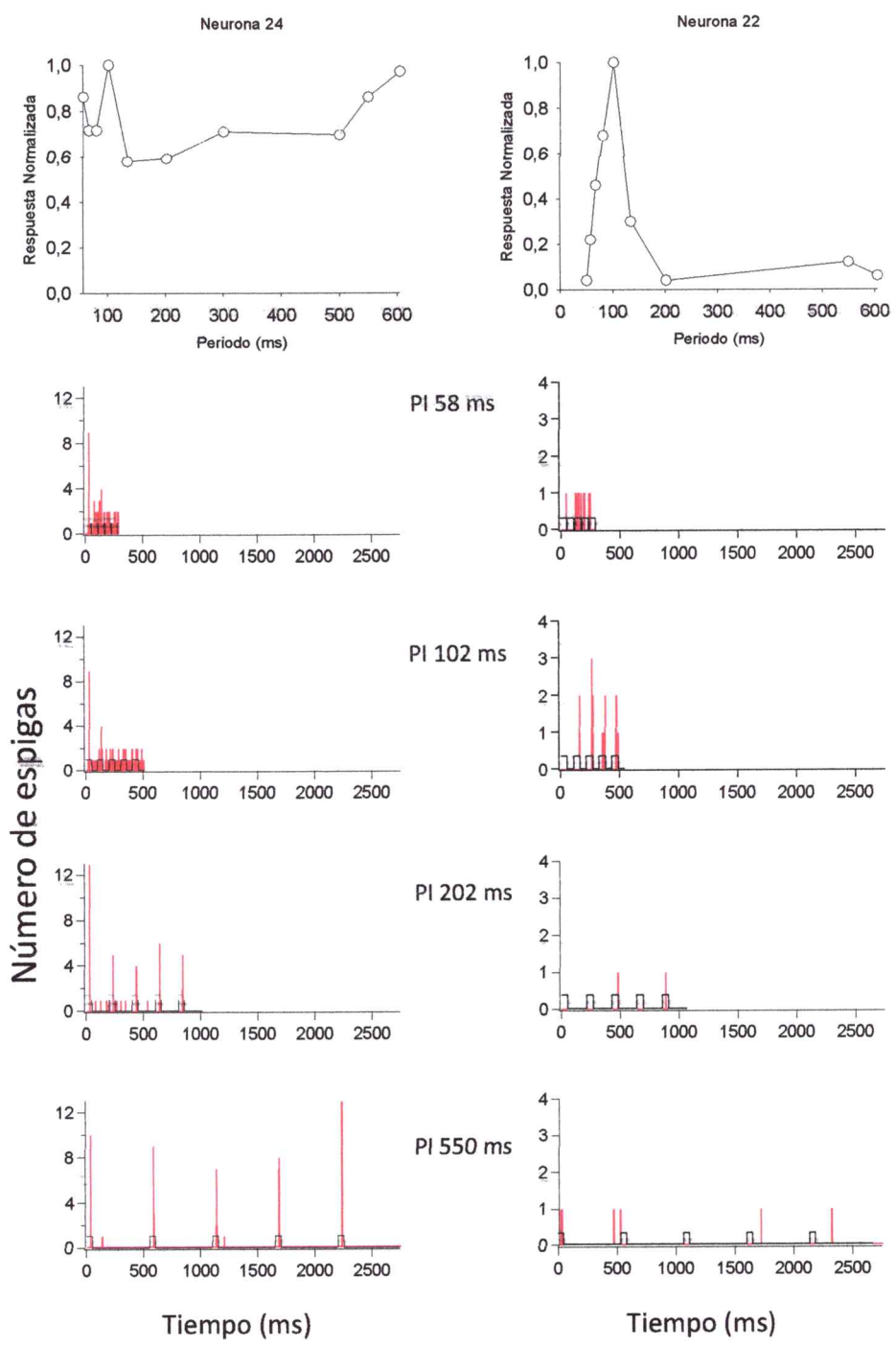


Figura 13. Neurona pasa todo (izquierda), Neurona pasa banda (derecha). En el panel de la izquierda arriba, se muestra curva de selectividad a PI para una neurona pasa todo y abajo se muestran 4 PSTH construidos con la respuesta de la neurona a estímulos de distinto PI (58, 102, 202 y 550 ms), de igual forma en el panel de la derecha se muestran la curva de selectividad y los PSTH para la respuesta de una neurona pasa banda.

La proporción para los tipos de neuronas pasa largo, pasa corto y pasa todo fue similar en los dos grupos experimentales, pero fue diferente para los tipos pasa banda y complejas (prueba de Fisher $P = 0,003$). La diferencia más clara correspondió a la categoría pasa banda ya que se registraron 7 neuronas de este tipo en el grupo implantado y 1 neurona en el grupo no implantado. En contraste, en el grupo implantado y no implantado se registraron 1 y 9 neuronas complejas, respectivamente (Figura 14).

Distribución de neuronas con distinta selectividad a período

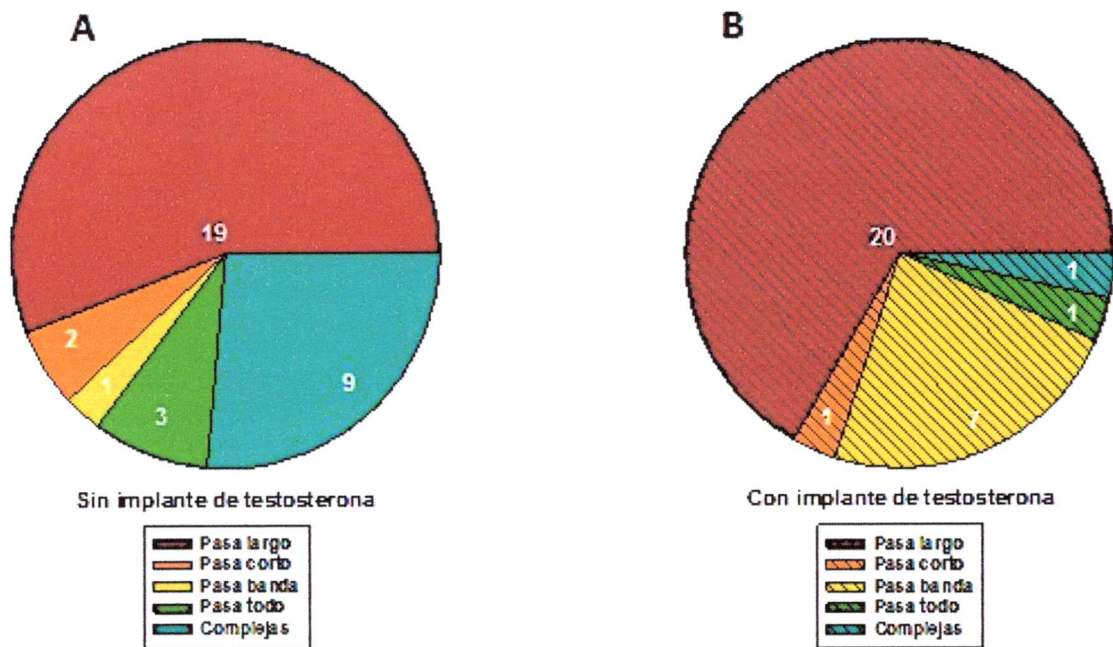


Figura 14. Distribución de neuronas del TS con distinta selectividad a período interpulso en animales sin y con implante de testosterona. A) Número de neuronas con distinta selectividad a período, en animales mantenidos en cautiverio y que no recibieron implante de testosterona. B) Número de neuronas con distinta selectividad a período interpulso en animales en cautiverio que recibieron implante de testosterona. En ambos grupos de animales las neuronas más numerosas fueron pasa largo (en café), sin embargo en animales implantados hubo además una segunda categoría más numerosa, i.e. neuronas pasa banda para el PI de la especie, 102 ms (en amarillo). En animales no implantados la segunda categoría más numerosa fue la compleja (en celeste). Existen diferencias significativas entre los dos grupos de animales al comparar las proporciones de neuronas clasificadas en las categorías pasa banda y complejas (prueba de Fisher, $P = 0,003$).

De las 7 neuronas pasa banda encontradas en animales implantados 6 fueron selectivas para el período de 102 ms y una a 135 ms, y la única neurona pasa banda de los animales no implantados fue selectiva a 135 ms. Esta selectividad indica que todas las neuronas

pasa banda encontradas respondían preferencialmente a valores de período interpulso cercanos al período promedio del canto de la especie, que corresponde a 102 ms. Este resultado indica que en los animales implantados las neuronas del TS mostraron mayor selectividad temporal que en los animales que no fueron implantados con la hormona.

iii) Latencias y tasa de descarga de las neuronas con distinta selectividad a período

En general las neuronas pasa largo y pasa todo mostraron poca variabilidad en las latencias de sus respuestas a los estímulos de distinto PI (Figura 15A). Sin embargo, las categorías pasa banda, pasa bajo y compleja mostraron una mayor variabilidad en las latencias de sus respuestas a los estímulos de distinto PI (Figura 15B). Por esta razón al comparar las latencias de las neuronas pertenecientes a las distintas categorías de selectividad a PI se utilizó para cada neurona la menor latencia obtenida en respuesta a un determinado PI entre los períodos a los cuales respondía con mayores descargas. Es decir por ejemplo para una neurona pasa largo, se eligió la menor latencia obtenida a partir de las respuestas a estímulos de $PI > 102$ ms.

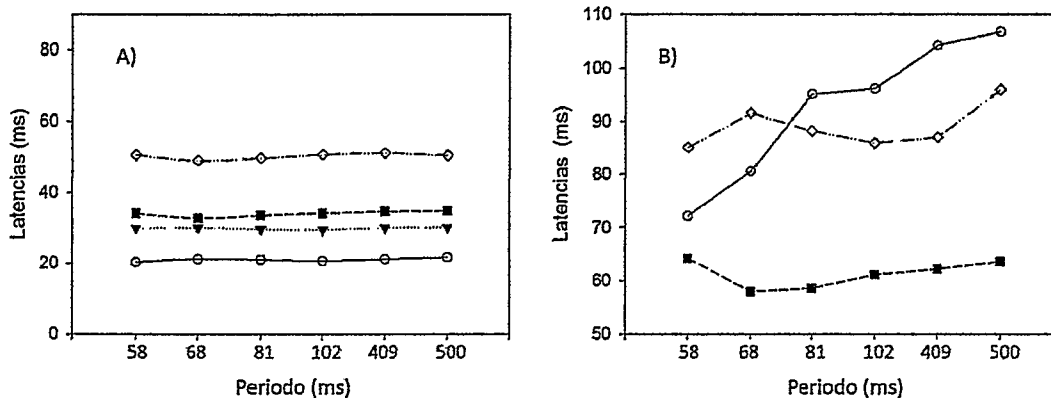


Figura 15. Variación de las latencias a estímulos con distintos periodos interpulso (PI) para neuronas de distinto tipo de selectividad a PI. A) Latencias de 4 neuronas a estímulos de distinto PI. Cuadrados y triángulos negros corresponden a una neurona pasa todo y pasa alto, respectivamente de animales implantados. Círculos y rombos blancos corresponden a una neurona pasa todo y pasa largo, respectivamente registradas en animales no implantados. B) Latencias de 3 neuronas en que círculos y rombos blancos corresponden una neurona pasa bajo y una neurona compleja, respectivamente, registradas en animales no implantados. Los círculos negros corresponden a una neurona compleja de un animal implantado.

Aunque el valor de latencia para las distintas categorías fue similar entre el grupo implantado y no implantado, debido al bajo número de neuronas registradas, esta tendencia sólo se pudo verificar estadísticamente para la categoría pasa largo (prueba de Mann-Whitney, $P=0,92$) (ver Tabla 3).

Se observa, también en la Tabla 3, que las neuronas pasa todo, que no presentan selectividad para PI del estímulo, siempre tuvieron latencias pequeñas, en comparación con las neuronas pasa banda, las más selectivas respecto al PI, que tuvieron las mayores latencias. Al comparar en los animales implantados la latencia de las neuronas pasa banda con la de las neuronas de las otras categorías, las pasa banda tuvieron latencias significativamente mayores (prueba de Mann-Whitney, $P=0,008$). Esta comparación no

se pudo realizar para los animales no implantados pues sólo encontramos una neurona pasa banda en este grupo. Sin embargo al comparar en los animales no implantados la latencias de las neuronas complejas, que corresponde a la segunda categoría más abundante en este grupo, con la latencia registrada para las neuronas de las otras categorías, no encontramos diferencias significativas (prueba de Mann-Whitney, $P=0,349$).

Selectividad a PI	N	Latencia (ms) - S/I	Latencia (ms)- C/I
pasa todo	3/1	28,8 (20,3 - 52,2)	29,4
pasa largo	19/20	40,8 (20,7 - 97,9)	38,7 (13,5 - 382,7)
pasa bajo	2/1	72,1 - 199,6	298,9
pasa banda	1/7	374,5	216,5 (43,6 - 505,6)
compleja	9/1	55,8 (27,2 - 118,6)	57,9

Tabla 3. Latencias para las neuronas del TS pertenecientes a distintas categorías de selectividad a período. N es el número de neuronas de en animales sin/con implante. S/I: sin implante; C/I: con implante. Para cada categoría, en cada grupo de animales, se observa la mediana; en paréntesis el valor mínimo y máximo de latencia alcanzado

En la Tabla 4 se presentan las tasas de descarga promedio para las distintas categorías de neuronas según selectividad a período. Estos valores se obtuvieron de las respuestas al mismo estímulo utilizado para medir latencias, según se explicó anteriormente. Los valores obtenidos para cada una de las categorías fueron similares entre el grupo implantado y no implantado. Sin embargo, debido al bajo número de neuronas por cada grupo, sólo se pudo verificar estadísticamente esta tendencia para el grupo pasa largo (prueba de Mann-Whitney, $P=0,546$). De manera descriptiva se observa en la Tabla 3 que las neuronas pasa todo tuvieron siempre valores altos de descarga, en cambio las neuronas pasa banda y pasa bajo tuvieron valores menores de

descarga. De hecho al comparar en los animales implantados la tasa de descarga de las neuronas pasa banda, con la descarga del resto de las neuronas, las neuronas pasa banda tuvieron significativamente menor tasa de descarga (prueba de Mann-Whitney, $P < 0,001$).

Selectividad a PI	N	espigas/estímulo - S/I	espigas/estímulo - C/I
pasa todo	3/1	9,4 (7,6 - 10,9)	11,3
pasa largo	19/20	7,1 (0,5 - 19,2)	8,5 (1,6 - 64,5)
pasa bajo	2/1	1,7 - 5,5	0,7
pasa banda	1/7	1,8	2,1 (0,4 - 4,6)
compleja	9/1	3,4 (1,0 - 7,9)	2,65

Tabla 4 Tasa de descarga (espigas/estímulo) para las neuronas del TS de distintas categorías de selectividad a período. Nomenclatura similar a Tabla 3.

Este resultado muestra que las neuronas con distinta selectividad a periodo poseen además un tipo de respuesta diferencial respecto a la tasa de descarga y a la latencia con la que responden a un estímulo acústico determinado. En particular, las neuronas pasa banda son claramente distinguibles de los otros grupos de neuronas, respecto a la latencia y tasa de descarga que éstas mostraron, i.e. baja tasa de descarga y latencia de larga duración.

iv) Respuesta a un estímulo pulsado: Selectividad de las neuronas pasa largo

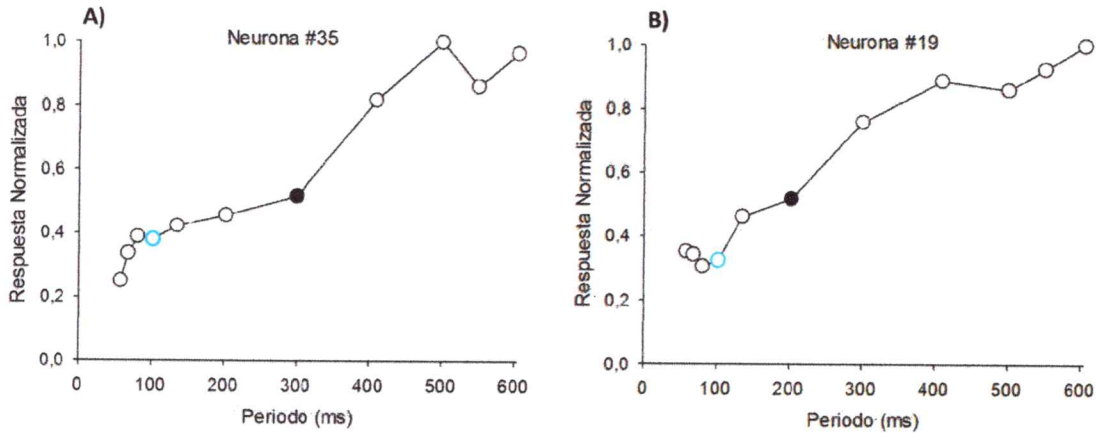
Aun cuando no encontramos diferencias significativas entre el grupo de las neuronas pasa largo de animales implantados y de animales no implantados respecto a sus latencias y tasa de descarga, la variación en los valores de estas dos mediciones, nos

indujo a explorar lo qué ocurría con el patrón temporal de descarga de esta categoría de neuronas para los dos grupos experimentales.

v) Neuronas pasa largo con distinto grado de selectividad

Al observar las curvas de selectividad de las neuronas pasa largo, encontramos dos tipos de respuestas: neuronas que presentan un aumento al 50% o más de su respuesta cuando los animales son estimulados con estímulos de $PI > 102$ ms (respuesta pasa largo tipo I) (Figura 16) y neuronas que presentan un aumento del 50% para un período igual o menor a 102 ms (respuesta pasa largo tipo II) (Figura 17).

SIN implante de testosterona



CON implante de testosterona

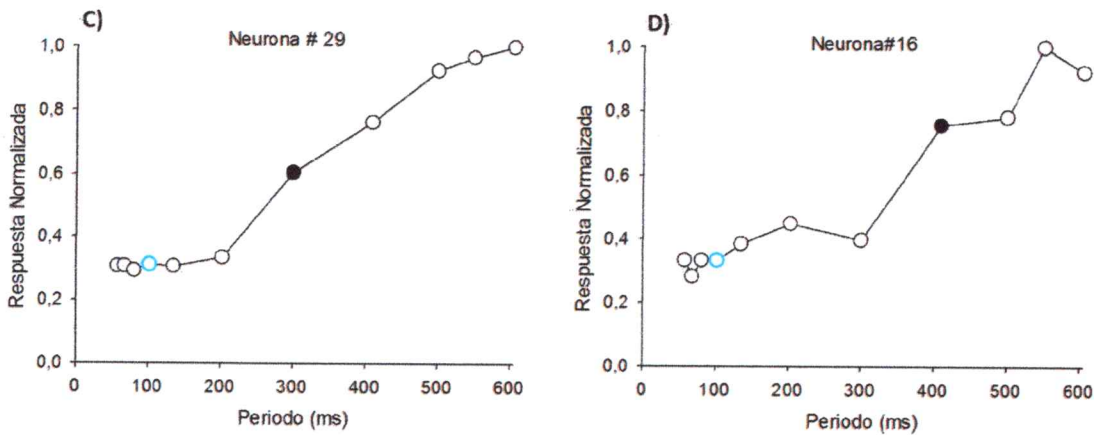
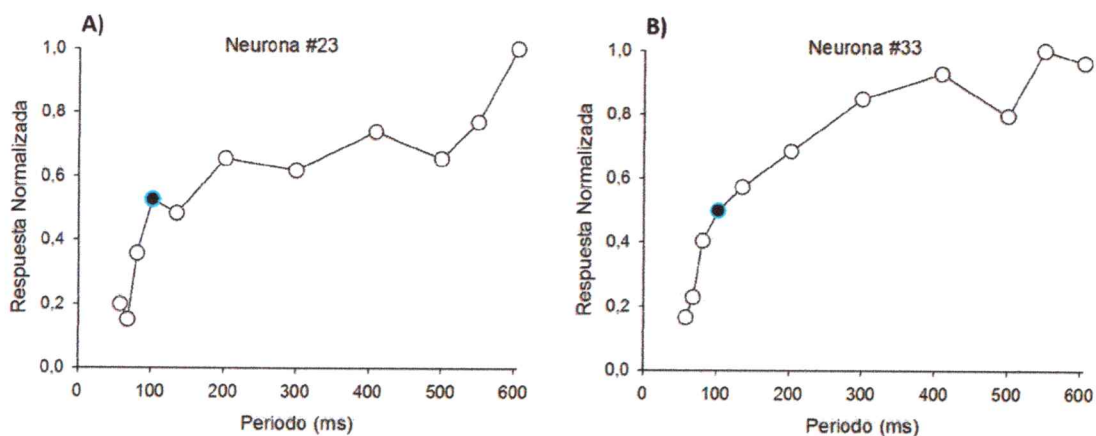


Figura 16. Respuestas pasa largo Tipo I para 4 neuronas del TS en animales no implantados (A y B) e implantados (C y D). En cada gráfico se señala con un círculo de color celeste el valor de la respuesta normalizada de la neurona para el PI de 102 ms. El círculo sólido de color negro indica la respuesta normalizada con un valor igual o superior al 50% de la respuesta. En los cuatro casos este valor se alcanzó para un PI mayor al del canto natural de la especie (102 ms).

SIN implante de testosterona



CON implante de testosterona

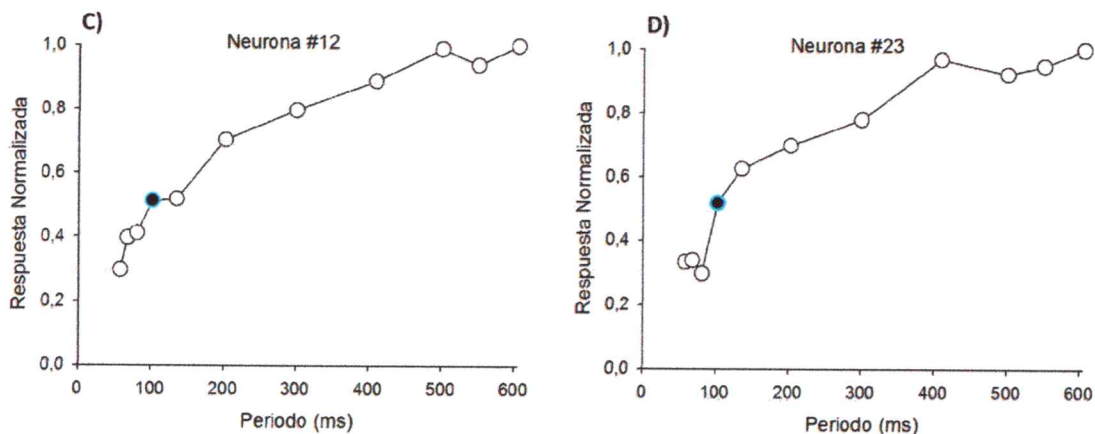


Figura 17. Respuestas pasa largo Tipo II en 4 neuronas del TS de animales no implantados (A y B) e implantados (C y D). En cada gráfico se señala con un círculo sólido de color negro la respuesta normalizada con un valor igual o superior al 50% de la respuesta máxima alcanzada en cada caso. Los círculos con contorno de color celeste indican que este valor coincide con la respuesta obtenida para el periodo de 102 ms. En la Figura 16 ambos símbolos no coinciden ya que el 50% de la respuesta corresponde a periodos mayores a 102 ms

Las respuestas de tipo I corresponden a neuronas cuya respuesta pasa largo es más selectiva que en las neuronas tipo II. En los animales implantados encontramos que

11 de las 20 neuronas pasa largo presentaron respuesta tipo I y 9 neuronas respuesta tipo II. Para los animales no implantados, 8 de las 19 neuronas pasa largo, tuvieron respuesta tipo I y 11 neuronas respuesta tipo II. La proporción de neuronas con respuesta tipo I y tipo II no fue diferente entre los grupos implantados y no implantados ($\text{Chi}^2 = 0,235$, 1 grado de libertad, $P = 0,628$)

iv) Análisis de las respuestas de neuronas pasa largo con distinta selectividad temporal

Las neuronas pasa largo respondieron preferentemente a los PI de duración mayor que el PI del canto de la especie, y como se ha señalado difieren en la sincronía de sus respuestas al estímulo. En la Figura 18 se observan 4 casos de neuronas con distinto patrón de descarga: 18A y 18C corresponden a neuronas que descargan con gran sincronía con el estímulo en tanto que las neuronas en 18B y 18D descargan con un mayor retardo y dispersión. La cuantificación de estas dos características de la respuesta se realizó mediante dos mediciones: CC (correlograma cruzado) y RIQ (rango intercuartílico) (ver Materiales y métodos). Por ejemplo, el valor de CC para las neuronas de las Figuras 18A y 18C fue 0,33 y 0,38 respectivamente, en cambio para las neuronas de 18B y 18D fue cercano a cero: 0,0092 y 0,0002 respectivamente. Estos dos últimos valores indican que la respuesta neuronal se produce en desfase con el estímulo. Los valores de RIQ tuvieron una menor variación: 0,021 y 0,013 para 18A y 18C respectivamente, y 0,036 y 0,029 para 18B y 18D, respectivamente.

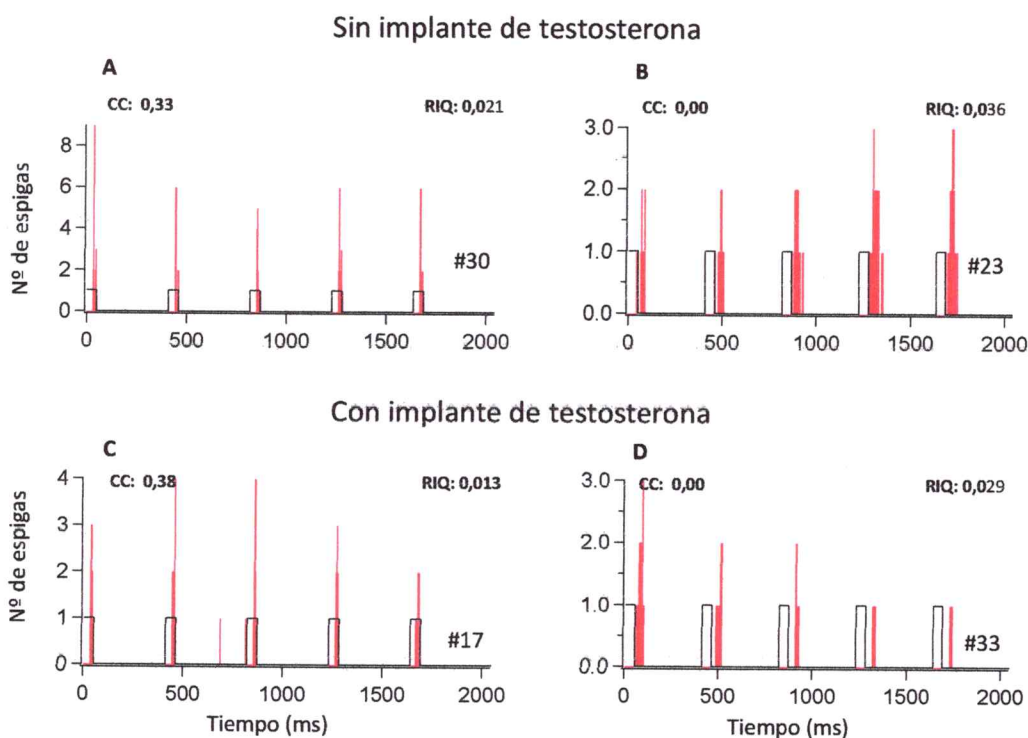


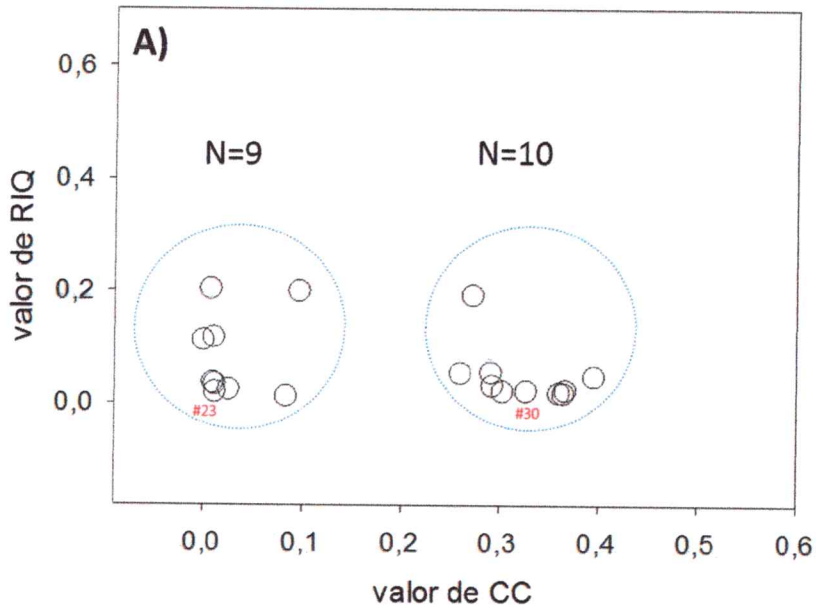
Figura 18. Histogramas peri estímulo (PSTH) para cuatro neuronas pasa largo que mostraron distintos valores de CC y RIQ. A y B corresponden a las respuestas de dos neuronas provenientes de individuos que no recibieron implante de testosterona (neuronas #30 y #23), y C y D a individuos que recibieron implante (neuronas #17 y #33). Las neuronas #30 y #17 tuvieron valores mayores de CC que las neuronas #23 y #33, lo cual indica que responden con mayor sincronía con el estímulo (i.e. la repuesta cae preferentemente dentro de los pulsos). Por otra parte, las neuronas #23 y #33 tuvieron valores mayores de RIQ lo cual se traduce en una respuesta más dispersa que la registrada para las neuronas #30 y #17. El estímulo, representado por rectángulo de color negro posee un PI de 409 ms. La respuesta, en rojo, corresponde al número de espigas obtenido para 20 repeticiones del estímulo.

Los valores de RIQ y CC tuvieron una considerable variación en neuronas de animales implantados y no implantados. Un análisis de clúster para estas dos variables en ambos grupos de animales, mostró una considerable variación en ambos grupos de animales, siendo mayor la variación en CC (Figura 19) tanto para animales implantados

como no implantados. No existen, sin embargo, diferencias en la proporción de neuronas que se encuentran en los dos clústeres entre animales implantados y no implantados (prueba de χ^2 , $P = 0,646$)

Debido a que el análisis de clúster estableció dos grupos de neuronas pasa largo presentes en similar proporción en animales implantados y no implantados, exploramos otras características de la descarga neuronal que podrían estar asociadas a cada una de estas clases de neuronas.

SIN implante de testosterona



CON implante de testosterona

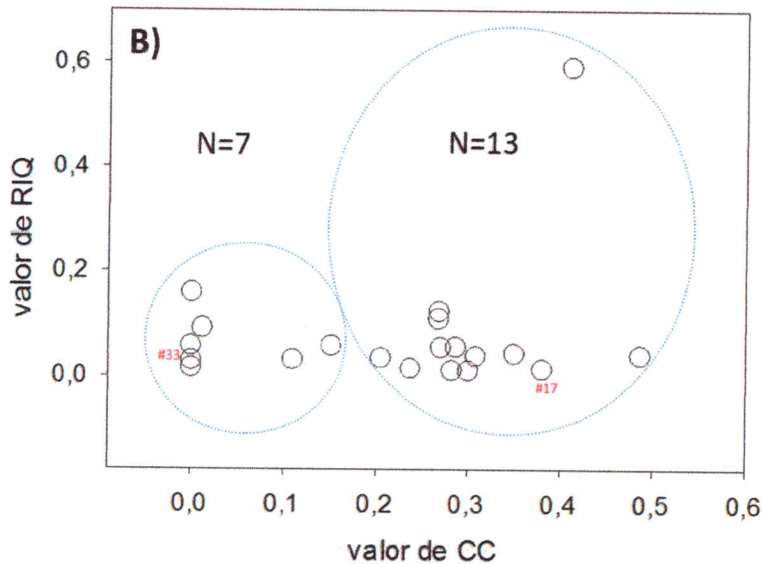


Figura 19. Valores de RIQ y CC de la respuesta de las neuronas pasa largo a un estímulo de período interpulso 409 ms. A) Valores para las neuronas pasa largo de animales sin implante. B) Valores para las neuronas pasa largo de animales con implante. Los círculos en azul indican dos categorías obtenidas mediante un análisis de clústeres.

Exploramos la relación de la FC de las neuronas con los clústeres obtenidos para ambos grupos experimentales y encontramos que esta característica espectral difiere en los animales implantados, ya que en este grupo de individuos el clúster de la derecha tuvo una mayor proporción de neuronas con FC cercana a 2000 Hz respecto a neuronas de frecuencias bajas (prueba de χ^2 $P=0,044$) (Tabla 5)

FC	Sin implante		Con implante (*)	
	cluster izquierda	cluster derecha	cluster izquierda	cluster derecha
baja	8	7	7	6
alta	1	3	0	7

Tabla 5. Proporción de neuronas pasa largo sintonizadas a distintas FC distribuidas en dos clústeres representados en la Figura 17. * indica diferencia significativa para la proporción de FC altas y bajas entre el clúster de la izquierda y el clúster de la derecha para animales implantados.

La existencia de una mayor proporción de neuronas pasa largo sintonizadas a frecuencias altas en los animales implantados indica una selectividad para estímulos de FC cercana a la frecuencia portadora del canto de la especie, lo que sugiere que en este grupo experimental que responden preferentemente a sonidos con características temporales y espectrales en el rango de sus señales de comunicación sonora.

Ubicación de las neuronas registradas

Las neuronas registradas se ubicaban a profundidades entre 540 y 1200 μm para los animales implantados, y entre 610 y 1500 μm para los animales no implantados. En

ambos grupos se registraron neuronas provenientes del hemisferio derecho e izquierdo, en similares proporciones. El sitio de registro, reconocido con marcaje con HRP, sólo se pudo ubicar para 5 neuronas en animales implantados y 14 neuronas de animales no implantados; estos sitios se pudieron inferir a partir de una contratinción del tejido con cresil violeta (Figura 20 para ver un ejemplo). En la Tabla N 6 se indican las localizaciones de las marcas de HRP registradas para ambos grupos. Aunque no se pudo obtener esta información para todas las neuronas, se observa que se registraron neuronas provenientes de los tres núcleos que conforman al TS (Laminar, Principal y Magnocelular), también a distintas profundidades de éstos.

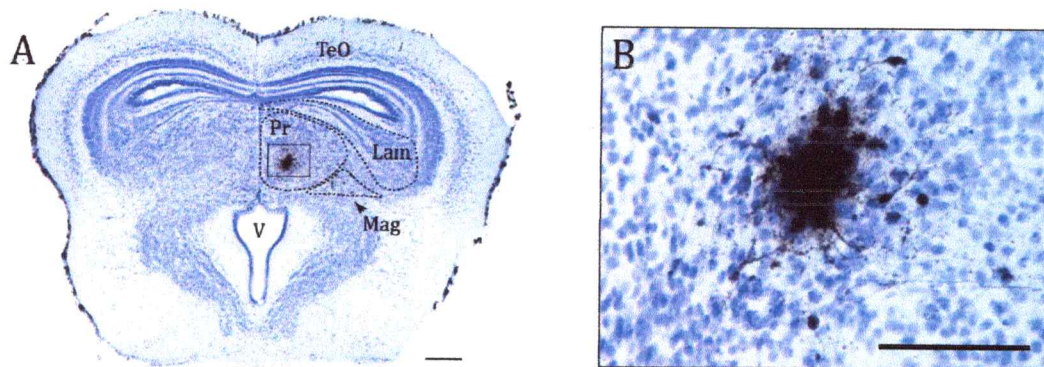


Figura 20. Ejemplo de marca de HRP dejada en el núcleo Principal del TS del cerebro de un macho *P. thaul*, durante una sesión de registro A) Corte transversal del cerebro de *P. thaul*, a nivel del mesencéfalo, mostrando las sub divisiones del TS. B) Ampliación de marca de HRP observada en núcleo Pr en el recuadro de la foto en A. TeO (Tectum óptico), Mag (Núcleo magnocelular), Pr (Núcleo Principal). Contratinción con cresil violeta. En ambas fotos barra de calibración corresponde a 200 µm.

Implante	# neurona	sitio de registro	profundidad (μm)	hemisferio
S/I	17	principal	770	HD
S/I	18	laminar	787	HI
S/I	20	principal	790	HI
S/I	21	principal	1040	HD
S/I	22	magnocelular	895	HI
S/I	23	laminar	810	HI
S/I	24	magnocelular	1100	HD
S/I	30	magnocelular	1050	HI
S/I	31	magnocelular	1240	HD
S/I	32	principal	865	HD
S/I	33	principal	990	HI
S/I	34	principal	820	HI
S/I	35	magnocelular	1330	HI
S/I	36	principal	1120	HI
C/I	12	magnocelular	935	HD
C/I	13	laminar	550	HI
C/I	14	laminar	1010	HI
C/I	15	principal	1020	HI
C/I	16	principal	1200	HD

Tabla 6 Sitios de registro en el TS, localizados mediante depósito de HRP. C/I: con implante de testosterona), S/I: sin implante de testosterona, HD: hemisferio derecho, HI: hemisferio izquierdo. La profundidad en μm corresponde a la distancia avanzada por el electrodo desde la superficie del mesencéfalo hasta el sitio en que se localizó la actividad de la neurona.

3.5 Detección de receptores de andrógenos en la vía auditiva mediante el anticuerpo PG21.

Encontramos marca positiva para el anticuerpo PG21, el cual reconoce receptores de andrógeno, en células de tres zonas o núcleos que forman parte de la vía auditiva en los anuros. La marca tuvo ubicación nuclear y citoplasmática. En la parte más caudal del cerebro posterior, encontramos células positivas para PG21 en el núcleo dorso medular (DMN), el cual es homólogo al núcleo coclear de los mamíferos. También hubo marca en el núcleo vestibular lateral (LVN), y en el núcleo vestibular medial (MVN). A nivel más rostral del cerebro posterior, encontramos células positivas para PG21, en el núcleo pre-trigeminal del área tegmental dorsal (DTAM), posiblemente homólogo al núcleo parabraquial de los mamíferos. A un nivel más rostral del cerebro, en el telencéfalo, encontramos células positivas para PG21 a nivel del palio lateral (Pl), del palio dorsal (Pd) y del palio medial (Pm), la cual es considerada una zona del telencéfalo con conectividad auditiva.

Para la marca PG21 en animales mantenidos en condiciones de cautiverio encontramos lo siguiente: Cuatro machos capturados durante la época reproductiva (octubre) y sacrificados 1 día post cautiverio mostraron marca positiva para PG21 en DMN, MVN y LVN (Figura 21A y 21B), DTAM (figura 22A y 22 B) y en Pd, Pl y Pm (Figura 23A y 23B). Un animal capturado durante la época reproductiva sacrificado luego de 63 días de cautiverio presentó marcas en los mismos núcleos, excepto en DTAM.

Tres machos sacrificados fuera de época reproductiva durante los meses de febrero, marzo y mayo mostraron marca PG21 en los mismos núcleos que los animales sacrificados dentro de la época reproductiva. En la Figura 21C y 21E se muestran marcas positivas para PG21 en el DMN, MVN y LVN para animales sacrificados en marzo y mayo respectivamente. Las Figuras 22C y 22D muestran marca positiva para PG21 en células del núcleo DTAM de un animal sacrificado en mayo. Las Figuras 23C and 23D muestran marca positiva para PG21 en distintas zonas del Palio de un macho sacrificado en Mayo.

Si bien los núcleos que presentaron marca para PG21, en animales sacrificados dentro y fuera de la época reproductiva son similares, no hemos realizado cuantificación del número o intensidad de la marca, por lo que no podemos descartar que existan diferencias de este tipo entre los dos grupos de individuos. Es sugerente que en un animal fuera de la época reproductiva (Figura 22D) las células del núcleo DTAM presentan una marca de menor tamaño que el observado en un animal durante la época reproductiva (Figura 22B).

Aun cuando no encontramos marca positiva para PG21 a nivel del TS, la presencia de marcas en otras regiones de la vía auditiva las señala como zonas putativas para la ubicación del receptor de andrógeno.

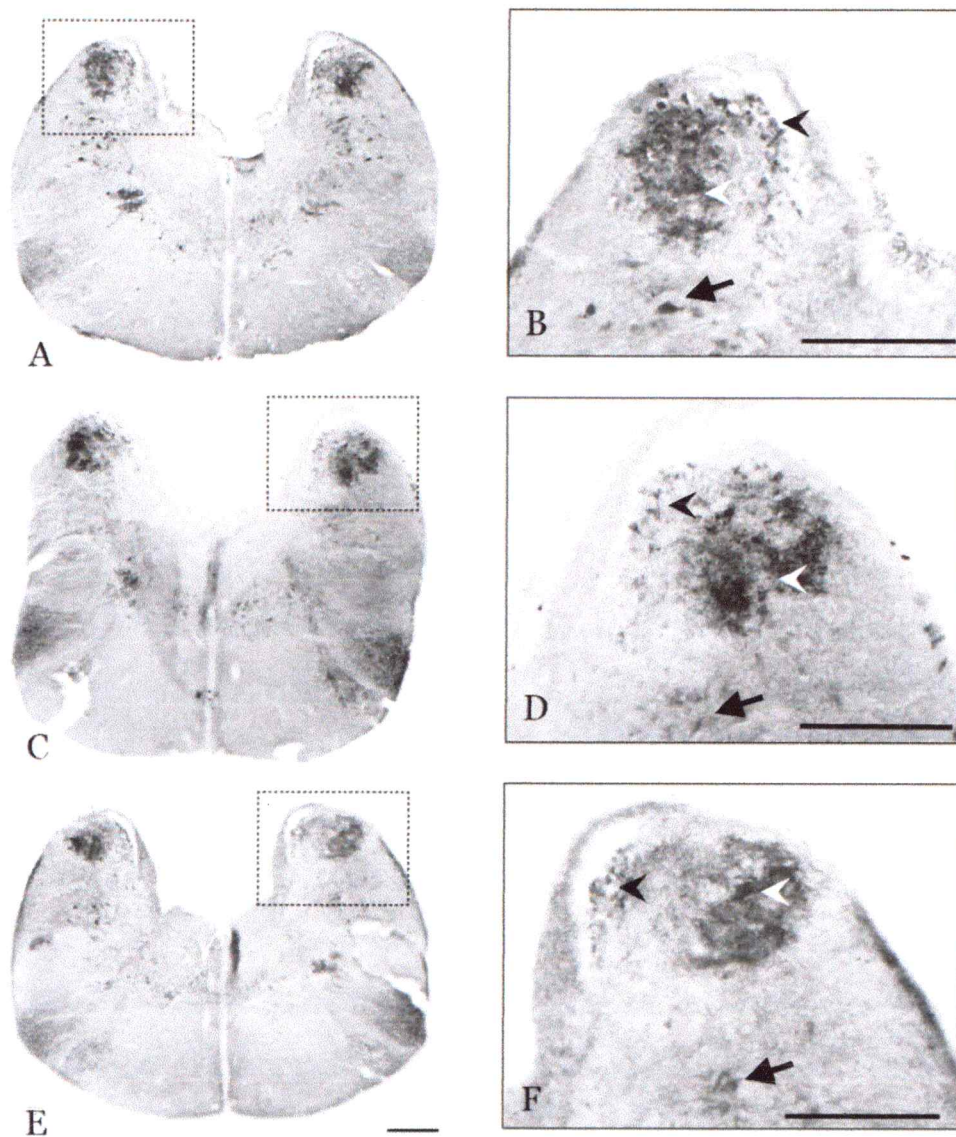


Figura 21. Cortes transversales del cerebro de *P. thaul* mostrando marca positiva para PG21 en núcleos del cerebro posterior de la vía auditiva. A y B muestran un corte de un animal sacrificado en condiciones de cautiverio durante época reproductiva (octubre) C y D muestran un corte de un animal sacrificado en condiciones de cautiverio fuera de la época reproductiva (marzo), y el corte en E y F corresponde a un animal sacrificado en cautiverio en el mes de mayo. En la columna de la derecha (B, D y E) se muestran ampliaciones de regiones delimitadas con un recuadro en la columna de la izquierda. Las flechas negras indican células del MVN, las cabezas de flecha en negro señalan el LVN y la cabeza de flecha blanca indican el DMN. Las barras de calibración en ambas columnas corresponden a 200 μm .

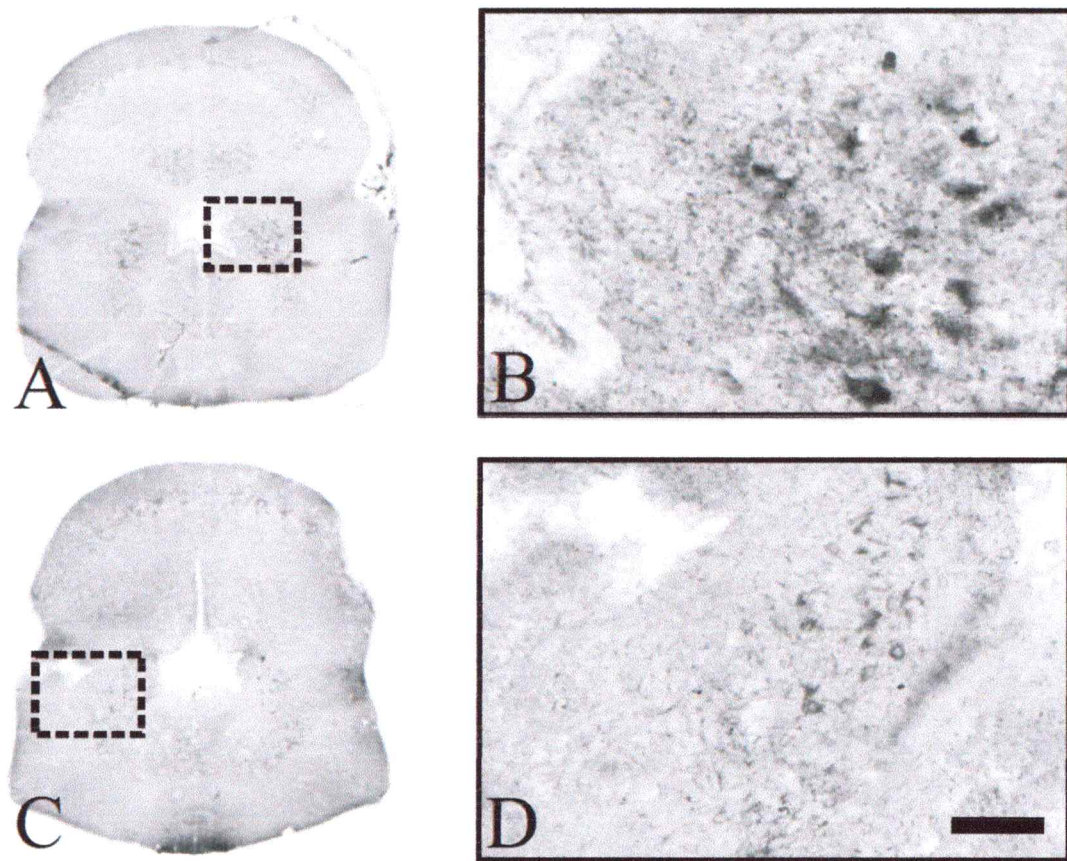


Figura 22. Células positivas para PG21 en DTAM ubicado en una zona del cerebro posterior más rostral que el DMN mostrado en A. Las fotos corresponden a cortes transversales de machos sacrificados en cautiverio. A y B muestran un corte del cerebro de un animal sacrificado en época reproductiva (octubre). C y D muestran un corte de un animal fuera de la época reproductiva (mayo). En la columna de la derecha (B, D) se muestran ampliaciones de regiones delimitadas con un recuadro en la columna de la izquierda. La barra de calibración corresponde a 50 μ m.

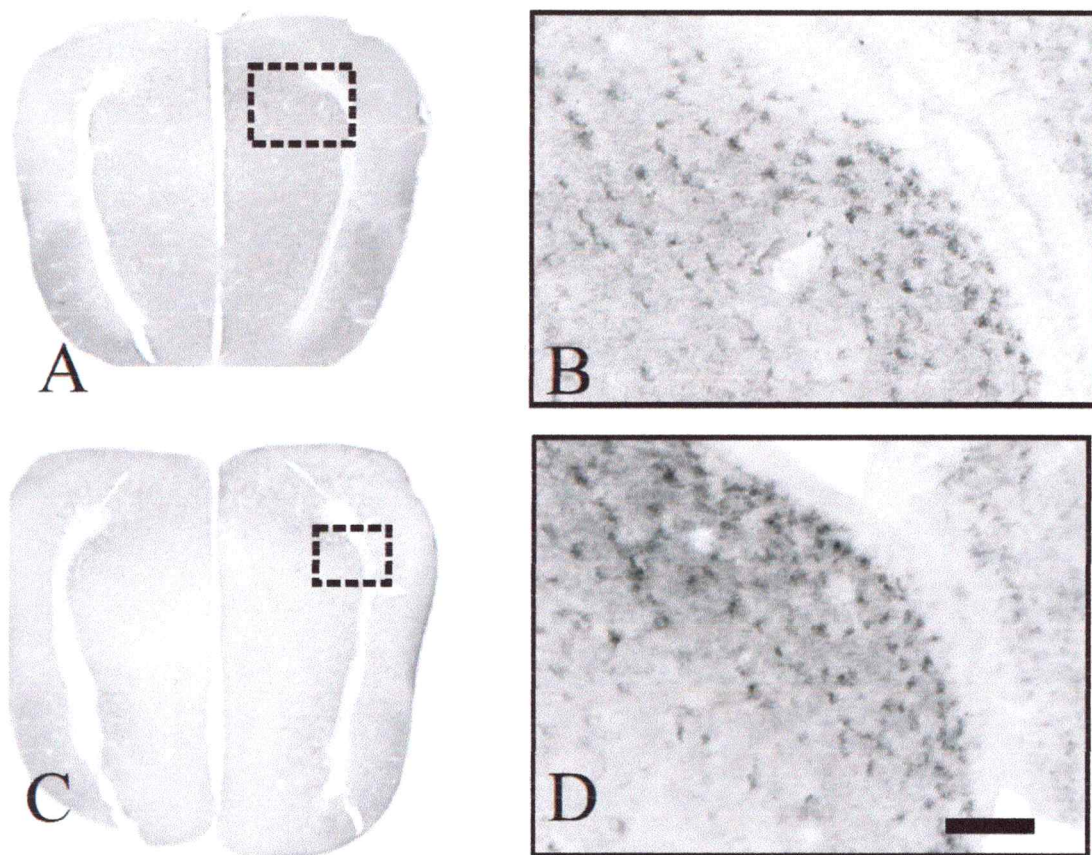


Figura 23. Células positivas para PG21 en el palio medial del telencéfalo de machos *P. thaul*. Las fotos corresponden a cortes transversales de machos sacrificados en cautiverio. Pm se ubica a nivel telencefálico, y es mostrado en los recuadros A y C. A y B muestran cortes del cerebro de un animal sacrificado en época reproductiva (octubre). C y D muestran cortes de un animal fuera de la época reproductiva (mayo). En la columna de la derecha (B, D) se muestran ampliaciones de regiones delimitadas con un recuadro en la columna de la izquierda. Las barras de calibración corresponden a 50 μ m.

DISCUSION

El propósito fundamental de esta tesis fue estudiar potenciales cambios en el sistema auditivo inducidos por testosterona en machos del anuro chileno, *Pleurodema thaul* (Anura-Leptodactilidae).

En particular estudiamos la modulación por testosterona de la respuesta de las neuronas del Torus Semicircularis de *P.thaul*, principal centro auditivo en los anuros, a estímulos acústicos diseñados según el canto que emiten los machos de esta especie en la naturaleza. Al analizar la respuesta de las neuronas del TS de machos *P. thaul*, mediante la cuantificación de células EGR-1 positivas, y mediante registros extracelulares unitarios encontramos que las células de este núcleo, fueron más sensibles a un estímulo acústico de relevancia biológica para la especie en sujetos que recibieron previamente un implante de testosterona. A continuación se discuten principales resultados que sustentan esta afirmación.

4.1 Expresión de EGR-1 en el TS en distintas condiciones acústicas y hormonales

Debido a que los machos implantados y no implantados no vocalizaron en condiciones de laboratorio, los resultados respecto a variaciones en el número de células EGR-1 positivas, que se discuten a continuación, pueden ser considerados como un efecto de la manipulación en la testosterona y/o la estimulación acústica utilizada durante los experimentos y no a un efecto de la actividad vocal inexistente. Este resultado nos parece relevante pues permite descartar efectos de la vía motora sobre la vía auditiva.



El número de células positivas para EGR-1 en el núcleo Laminar y en el núcleo Principal es menor en machos expuestos a ruido blanco e implantados con testosterona que en animales estimulados que no recibieron el implante hormonal. Estos resultados sugieren que el efecto de este sonido sobre las neuronas del TS de un animal con niveles de testosterona típicos de época reproductiva es diferente al efecto que provoca el mismo estímulo en un animal con niveles de testosterona plasmática más bajos.

Estos resultados contrastan con los obtenidos en un anuro europeo, *Rana temporaria*, que produce un canto de apareamiento de estructura pulsada como *P. thaul*, en que mediante registros electrofisiológicos se observó un aumento en el número de neuronas del TS que responden a un estímulo de ruido blanco, cuando los animales son registrados dentro de la época reproductiva, cuando éstos presentan normalmente niveles elevados de testosterona (Walkowiak 1980).

En contraste con los resultados de estimulación con ruido blanco, no hubo diferencias en el número de células EGR-1 positivas en el núcleo Laminar y Principal entre el grupo implantado y no implantado estimulado con coro. Es decir en animales con niveles de testosterona similares a los encontrados en condiciones naturales durante época reproductiva, ante la estimulación con un coro coespecífico, se activaría el mismo número de células que en animales con menores niveles de testosterona plasmática.

Estos resultados indicarían que la testosterona aumentaría la selectividad del TS por una disminución del número de células del TS que se activan con estímulos de características espectrales y temporales distintas a las del canto de la especie, y no por un aumento en la respuesta al estímulo coespecífico. Este modo de acción hormonal propuesto tiene especial relevancia para el núcleo Laminar, pues en este sitio el grupo

implantado estimulado con coro tiene una tendencia, cercana a la significancia, a un mayor número de células EGR-1 positivas que el grupo implantado y estimulado con ruido blanco. Esta diferencia debería comprobarse incrementando el número de individuos analizados. La disminución en el número de neuronas que responden a sonidos de estructura diferentes al canto coespecífico podría resultar en un aumento en la selectividad de las células del núcleo Laminar y de las respuestas vocales a señales de comunicación sonora de significado biológico.

Las diferentes tendencias entre las respuestas del núcleo Principal y Laminar, son congruentes con otros estudios realizados en anuros, en los cuales se ha mostrado mediante hibridación *in situ* para Egr-1, una mayor selectividad del núcleo laminar a estímulos coespecíficos respecto a estímulos alterados o heteroespecíficos (Hoke y col. 2004; Mangiamele y Burmeister 2011). Las diferencias de respuestas entre estos dos núcleos ha sido asociada a la distinta conectividad que estos tienen con otros núcleos de la vía auditiva (Feng y Lin 1991). En particular serían relevantes diferencias en las conexiones con el núcleo central del tálamo, que posee neuronas que responden selectivamente a características temporales de estímulos acústicos (Hall y Feng 1987).

Este estudio es el primero que propone explorar en el TS de anuros machos la modulación de la actividad neuronal por testosterona, utilizando inmunohistoquímica para la proteína EGR-1. Dos estudios relativamente recientes han mostrado modulación por estradiol en la actividad del TS de hembras de anuros, utilizando técnicas de hibridación *in situ* para Egr-1. En uno de estos estudios se mostró una mayor expresión de Egr-1 en el núcleo Laminar de hembras con elevados niveles de estradiol y estimuladas con un coro coespecífico en comparación a hembras no inyectadas y no

estimuladas (Lynch y Wilczynski 2008) y en otro estudio se encontró una mayor expresión de Egr-1 en el TS de hembras con elevados niveles de estradiol cuando fueron estimuladas con un estímulo coespecífico pero no con un estímulo heteroespecífico (Chakraborty y Burmeister 2015). Estos resultados también se corresponden con los hallazgos en otros grupos de vertebrados, como machos y hembras del ave *Zonotrichia albicollis*. En machos se ha observado una disminución en el número de células ZENK positivas a nivel de núcleos auditivos telencefálicos en individuos implantados con testosterona y estimulados con un tono puro, respecto a individuos implantados pero estimulados con un canto coespecífico (Matragrano y col. 2013). Asimismo, hembras de esta especie al ser implantadas con estradiol, mostraron diferencias similares a los machos a nivel telencefálico, y además a nivel mesencefálico en el núcleo Mld homólogo al colículo inferior (Maney y col. 2006). Estos resultados en aves son similares a nuestros hallazgos en anuros, y muestran que los niveles de testosterona y/o estradiol modularon la actividad de las neuronas de la vía auditiva disminuyendo sus respuestas a estímulos de menor relevancia en relación a estímulos coespecíficos.

Por otra parte, en hembras de lagartos del género *Anolis* implantadas con testosterona se ha encontrado un menor número de células positivas para la proteína c-Fos en la Amígdala y Area Preóptica, regiones asociadas a conductas de cortejo y apareamiento que en hembras no implantadas, aun cuando no hay diferencias en marcas neuronales en estas zonas cerebrales en esta especie entre machos que reciben testosterona y sus controles (Neal y Wade 2007).

4.2 Dependencia de las respuestas de neuronas auditivas a características temporales del sonido de la condición hormonal.

Nuestros resultados de registros unitarios extracelulares muestran que en animales que reciben un implante de testosterona durante al menos 2 semanas y que mantienen sus niveles plasmáticos de testosterona en niveles cercanos a los encontrados en la naturaleza durante la época reproductiva, existen neuronas que responden a características temporales de los estímulos de manera distinta a animales que no recibieron implantes. Sin embargo, nuestros resultados no muestran diferencias en la selectividad espectral entre animales que reciben y no reciben testosterona. Esta similitud contrasta con estudios que han reportado mayor proporción de neuronas del TS sintonizadas a bajas FC en anuros registrados dentro de la época reproductiva respecto a sujetos registrados fuera de este período (Goense y Feng 2005). En el presente estudio ambos grupos de animales presentan una distribución bimodal compuesta por un grupo de neuronas de FC bajas (100-300 Hz) y un grupo de neuronas de FC altas (2000-2400 Hz), lo cual refleja la segregación anatómica de las dos estructuras periféricas de la vía auditiva existente en los anuros: la papila anfibia, sensible a estímulos de frecuencias bajas y la papila basilar sensible a frecuencias altas.

Respecto a la selectividad temporal, en general las neuronas del TS de todos los animales respondieron a estímulos con un rango amplio de períodos interpulsos, de manera similar a lo reportado por Penna y col. (1992). Sin embargo existen algunas diferencias en los patrones de respuesta entre el grupo implantado y no implantado. En primer lugar, los animales implantados tenían una mayor proporción (7/30), de neuronas que sólo respondieron al estímulo pulsado y no al estímulo tonal que animales no

implantados (1/34). Esta diferencia sugiere una mayor relevancia de la estructura temporal del estímulo en animales que tienen niveles hormonales similares a los de la época reproductiva. En segundo lugar, la proporción de neuronas con selectividad para período interpulso fue mayor en los animales que recibieron implante hormonal. En particular en los animales implantados encontramos neuronas que tuvieron una respuesta preferente al PI del canto natural de la especie, i.e. 102 ms y casi nula respuesta a otros períodos. Estas neuronas pasa banda presentan una baja descarga neuronal y latencias mayores que las de otras categorías de neuronas (Figura 13, Tablas 3 y 4). Los rangos de latencia para las neuronas del TS en anuros, reportados en otros estudios, son de 10 a 60 ms, en registros unitarios intracelulares realizados en preparaciones in vitro (Luksch y Walkowiak 1998, Endepols y Walkowiak 2001) rango dentro del cual se encontraron principalmente las neuronas pasa largo y pasa todo, sin embargo latencias mayores a 200 ms, como las encontradas para las neuronas pasa banda se han reportado en menor proporción en registros extracelulares in vivo en otras especies de anuros (Walkowiak 1980; Goense y Feng 2005).

La categoría de neuronas pasa largo fue la más numerosa en animales implantados y no implantados. Este tipo de neuronas respondía preferentemente a PIs de duración mayor a 102 ms. Existen dos grupos de neuronas pasa largo con distintas características de selectividad temporal que están representados en similares proporciones en animales implantados y no implantados. Uno de estos grupos de neuronas respondía con más selectividad a PIs largos ya que más del 50% de su respuesta correspondió a estímulos con períodos de larga duración. También los potenciales de acción de estas neuronas estaban más en fase con el estímulo y su

dispersión temporal era menor. Si bien este grupo estuvo en similar proporción en los dos grupos de animales, sólo en los animales implantados las neuronas pasaron a tener una proporción alta de neuronas sintonizadas a FC entre 2000 y 2400 Hz, en el rango de la frecuencia dominante del canto de la especie (2100 Hz). Estas neuronas responden preferentemente a sonidos con características temporales y espectrales en el rango de sus señales de comunicación sonora.

La relación de la testosterona con la selectividad de las neuronas del TS en anuros para ciertas características temporales del estímulo acústico en *P.thaul*, es concordante con otros estudios, en los cuales se atribuyen diferencias estacionales en las respuestas de las neuronas del TS (Walkowiak 1980, Hillery 1984, Goense y Feng 2005) y de neuronas de la periferia del sistema auditivo (Zhang y col 2012) a posibles cambios hormonales.

Por otra parte nuestros resultados son similares a los de estudios realizados en aves, en los cuales se ha visto, al comparar la respuesta de época reproductiva y no reproductiva, en machos y hembras de aves paseriformes y piciformes, cambios en la amplitud y la latencia a estímulos tonales en distintos rangos de frecuencia a nivel del sistema auditivo periférico (Lucas y col. 2002, Lucas y col. 2007), cambios en umbrales y latencias en respuesta a un estímulo tonal, a nivel sistema auditivo periférico registrado en machos y hembras de *Zonotrichia leucophrys gambelii* (Caras y col 2010). También se han reportado durante la época reproductiva en aves hembras de *Sturnus vulgaris*, un aumento en el número de respuestas neuronales del palio auditivo (Field L) a un canto de apareamiento (Cousillas y col 2013). Por último, en hembras de *Zonotrichia leucophrys gambelii* se encontró una proporción mayor de neuronas

auditivas de distintas regiones telencefálicas selectivas a la estructura temporal de un canto de apareamiento, cuando hembras tratadas con estradiol fueron registradas y estimuladas durante la época reproductiva (Caras y col. 2015).

Los resultados obtenidos utilizando dos aproximaciones experimentales distintas, la inmunohistoquímica y registros electrofisiológicos, sugieren que la testosterona induce una disminución en la actividad neuronal, i.e. disminución de células EGR-1 en el TS de animales implantados y una mayor proporción de neuronas selectivas al PI de 102 ms. La acción de esta hormona determinaría que el cerebro de *P. thaul* procese de manera más selectiva sonidos de relevancia biológica.

4.3 Variación en los niveles plasmáticos de testosterona en machos de *P. thaul*.

Los niveles plasmáticos de testosterona de individuos medidos en condiciones naturales durante la época reproductiva (promedio 27.29 ± 15.05 ng/ml) fueron concordantes con el promedio de 30 ng/ml encontrado por Solís (1994). También el marcado descenso en las concentraciones una vez que los animales se mantuvieron en condiciones de laboratorio (promedio 2,5 ng/ml) es similar al reportado por este autor. En nuestros animales esta condición de descenso hormonal se mantuvo hasta por 1 mes en animales en cautiverio sacrificados durante la época reproductiva y hasta por cuatro meses en animales en cautiverio que se sacrificaron fuera de la época reproductiva. Esto indica que los machos *P. thaul* en condiciones de cautiverio mantienen bajos niveles plasmáticos de testosterona, independiente del periodo del año en que se encuentren.

No es posible determinar niveles de testosterona en ejemplares de *P. thaul* adultos fuera de la época reproductiva en condiciones naturales, ya que en ese período

no se encuentran ejemplares adultos en los lugares de estudio. Sin embargo, asumimos que al igual que en otras especies, los niveles de testosterona de machos *P. thaul* fuera de la época reproductiva en condiciones naturales, se mantendrían más bajos que los que medimos en condiciones naturales durante la época reproductiva.

Por otra parte los niveles bajos de testosterona en condiciones de cautiverio, facilitan la manipulación exógena de esta hormona, lo cual hace de los machos de esta especie un buen modelo para el estudio de la influencia de la testosterona en la función auditiva en condiciones controladas.

4.4 Receptores de andrógeno en núcleos de la vía auditiva de *P. thaul*.

El efecto de la testosterona sobre la respuesta de las neuronas del TS, podría ejercerse de manera directa en este centro o de manera indirecta sobre neuronas que aferentan al TS. Si bien se ha reportado la presencia de receptores de andrógeno para el sub núcleo laminar del TS, nosotros no pudimos reportar marcas conspicuas a este nivel de la vía auditiva, sin embargo sí encontramos células positivas para el receptor de andrógeno en el núcleo DMN, homólogo al núcleo coclear de mamíferos, en el núcleo DTAM y a nivel del Pm, dorsal y lateral. Dada la conectividad entre estas regiones y el TS, existe la posibilidad que la modulación de las propiedades sensoriales de la neuronas del TS en los machos de la especie *P. thaul* ocurra de manera indirecta.

Por otra parte debido al bajo número muestral en que se detectó la presencia de receptores de andrógeno y a la falta de cuantificación de éstos, no es posible relacionar variaciones en su expresión con distintos estados hormonales. Es posible que una disminución en los niveles de testosterona obtenidos mediante castración o

característicos de una época no reproductiva se acompañe de una disminución en los niveles de expresión de los receptores para la misma hormona, pudiendo éstos recuperarse cuando los animales reciben implantes o inyecciones de testosterona (Soma y col. 1999, Xiao y Jordan 2002; Pouso y col. 2010). Esta dependencia de la expresión de receptores de los niveles hormonales requeriría de estudios adicionales.

4.5 Selectividad neuronal y hormonas esteroidales

Los resultados obtenidos mediante registros electrofisiológicos y detección de la proteína EGR-1 mediante inmunocitoquímica en la células del Torus Semicircularis, sugieren la existencia de plasticidad en la sensibilidad auditiva a nivel del sistema nervioso en el anuro *Pleurodema thaul*, modulada por la hormona sexual testosterona. Este hallazgo es concordante con numerosos estudios en los cuales se ha demostrado modulación de la sensibilidad de distintos sistemas sensoriales por hormonas sexuales esteroidales en diferentes grupos de vertebrados: la modulación por estradiol de la sensibilidad auditiva en distintos núcleos de esta vía sensorial, a nivel periférico y central en aves (revisado en Maney y Pinaud 2011), el cambio en la sensibilidad del sáculo mediado por estradiol en el pez *Porychtus notatus* (revisado en Sisneros 2009), cambios en la sensibilidad de la vía olfativa a feromonas por hormonas sexuales (Parker y Mason 2012) en reptiles y en mamíferos roedores (revisado en Baum y Bakker 2013), y cambios en la sensibilidad del sistema visual en humanos por influencia de las hormonas sexuales (Little 2013).

4.6 Selectividad neuronal auditiva y conducta

El resultado de la modulación auditiva por testosterona encontrada en machos de *P. thaul* en condiciones de cautiverio, podría también tener implicancias para machos que se encuentran en condiciones naturales, ya que al igual que en otros vertebrados, en anuros se ha mostrado que los niveles de hormonas sexuales esteroidales, incluyendo testosterona, varían según la época del año. Por ejemplo en condiciones naturales, anuros machos de *Rana catesbeiana* (Licht y col. 1983), *Xenopus leavis* (Kang y col. 1995) y *Rana esculenta* (Polzonetti-Magni y col. 1998), presentan niveles de testosterona plasmática más elevados durante los meses del año correspondientes a la época reproductiva que fuera de éstos. Debería esperarse entonces que individuos que se encuentren dentro de época reproductiva en condiciones naturales presenten una mayor sensibilidad auditiva que los machos encontrados en condiciones naturales fuera de época reproductiva, dependiendo de sus niveles de testosterona.

La sensibilidad auditiva a ciertas características de estímulos pulsados ha sido puesta en evidencia a nivel conductual en distintas especies de anuros, tanto en experimentos de terreno como en experimentos en condiciones de laboratorio. Anuros machos de *Batrachyla antartandica* muestran disminución en su respuesta vocal evocada al ser estimulados con estímulos con tasa de pulsos mayores a las del canto de la especie (Penna y col. 1997). Anuros machos de *Batrachyla taeniata* en cambio muestran un aumento ante cambios similares en la estimulación (Penna 1997). Machos de la rana *Xenopus leavis* discriminan cantos de hembras receptivas de las no receptivas, en base a la distinta tasa de pulso que estas presentan (Elliot y col. 2007). También las

respuestas vocales de machos de *P. thaul* dependen de la tasa de pulsos y otras características temporales de los estímulos (Velásquez y col 2014).

4.7 Posibles mecanismos de acción de la testosterona

El mecanismo por el cual la testosterona ejerce su efecto inhibitorio sobre la actividad de las neuronas de TS queda fuera del ámbito de esta tesis. Sin embargo, es posible elaborar ideas acerca de la plasticidad mediada por hormonas sexuales esteroidales, como se detalla a continuación.

i) Modulación de GABA por hormonas esteroidales

La testosterona podría tener un efecto inhibitorio sobre la actividad de las neuronas del TS mediante en una modulación de sinapsis GABAérgicas a nivel de núcleos auditivos. Esta idea estaría apoyada en evidencias estructurales y fisiológicas, ya que diversos estudios han mostrado la existencia de terminales y somas positivos para GABA en neuronas del TS de varias especies de anuros (Endepols y col. 2000, Hollis y Boyd 2005). Además las neuronas del TS experimentan el cambio de su selectividad cuando se bloquean los receptores GABAA con bicuculina (Hall 1999). De manera similar a lo observado en anuros también este fármaco produce cambios en la selectividad temporal de neuronas del colículo inferior de murciélagos (Casseday y col. 1994).

La importancia de las sinapsis inhibitorias en los mecanismos de selectividad temporal ha sido corroborada en dos estudios realizados en la rana *Hyla regilla* (Edwards y col. 2007, Leary y col. 2008). La modulación del sistema inhibitorio por

hormonas sexuales esteroideas en la sinapsis GABAérgicas ocurre en distintos núcleos cerebrales que no son sólo auditivos y en distintos grupos de vertebrados, y posee cursos temporales cortos y prolongados. Un ejemplo de este tipo de modulación corresponde a la recuperación mediante la administración de testosterona, de los niveles de GABA en el septum y amígdala de ratas machos castradas (Earley y Leonard 1978). Sin embargo en contraste con esos estudios, ratas machos gonadectomizadas y tratadas con testosterona muestran disminución de la unión de muscimol (agonista de receptores GABAA) en el hipotálamo y adenohipófisis, indicando entonces una posible disminución de los receptores GABAA en estas regiones (Lasaga y col. 1988).

También se conocen cambios en estos receptores debidos a la acción de estradiol. Los niveles de expresión de las subunidades del receptor GABAA en el área preóptica y en el lecho de la estria terminal del cerebro de ratas hembras disminuyen con el aumento en los niveles de estradiol (Herbison y Fénelon 1995).

En aves se ha visto en aves que el estradiol disminuye la frecuencia de eventos inhibitorios post-sinápticos en el núcleo auditivo NCM (Tremere y col. 2009). Este efecto ocurre en el corto plazo, y aunque no es posible descartar que pudieran existir efectos del tipo modulación alostérica en el corto plazo de los receptores GABAA por testosterona o algún metabolito de ésta en el Torus de *P. thaul*, nuestros resultados sugieren la participación de modulación de la expresión receptores en el largo plazo por acción de testosterona. Verificar esta posibilidad requiere de futuros experimentos adicionales.

ii) Posible efecto de algún metabolito de la testosterona sobre células blanco.

No es posible descartar que los resultados obtenidos se deban al efecto directo de la testosterona plasmática, pues ésta a nivel del TS, podría metabolizarse mediante la enzima aromatasa a estradiol, como ocurre en otras especies de vertebrados. En este caso el efecto conductual o estructural se ejercería mediante receptores de estradiol (Vagell y McGinnis 1997, Tramontin y col. 2003). Esta hipótesis es apoyada por los estudios que han descrito tanto la presencia de receptores de estradiol a nivel telencefálico (pallio, hipotálamo, accumbens, amígdala), mesencefálico (Torus) como de cerebro posterior (núcleo pre-trigeminal) (Morrel y col. 1975, Endepols y col. 2000, Chakraborty y Burmeister 2010). Además existen estudios que describen la presencia de aromatasa principalmente a nivel hipotalámico, de la amígdala y en grado menor a nivel mesencefálico, tanto para anuros machos y hembras (Callard y col. 1978, Guerriero y col. 2000, Iwabuchi y col. 2007). Esta acción indirecta de la testosterona mediante su metabolito estradiol podría descartarse realizando estudios en los cuales animales reciban implantes sistémicos como los aplicados en nuestro estudio, pero de DHT (dihidrotestosterona). Esta hormona si bien se une a receptores de andrógeno, no es metabolizable a estradiol. Otra alternativa para determinar si el efecto de testosterona sobre las células del TS es mediado por estradiol o algún otro andrógeno, sería utilizando algún bloqueador de receptores de estradiol como el tamoxifeno, o un bloqueador de receptores de andrógeno como la flutamida o bien un inhibidor de la aromatasa como el ADT (Androstatriendiona) o fadrazola. Estas drogas podrían utilizarse de manera sistémica o aplicada directamente en el TS. Sin embargo este último procedimiento, aun cuando aporta especificidad, no permite explorar posibles efectos

indirectos de la hormona, que se ejerzan a través de otros núcleos que posean receptores de testosterona y estén conectados con el TS.

iii) Efectos de la testosterona a largo plazo

Existe la posibilidad de que los cambios registrados a nivel fisiológico en las neuronas del TS de animales implantados se deban a cambios estructurales de las células producidos en el largo plazo, ya que los animales se mantuvieron de 2 a 4 semanas con los implantes. Estos cambios estructurales podrían ser modificaciones de la arborización dendrítica, pues por ejemplo en peces eléctricos de género *Eigenmannia* la selectividad temporal se ha relacionado de manera directa con el grado de arborización que tengan las neuronas del Torus (Fortune y Rose 1997).

Se sabe además que la testosterona produce cambios estructurales en neuronas de diversos sistemas como en la arborización dendrítica de las motoneuronas de los núcleos cavernosos espinales en ratas (Kurz y col. 1986), y aumentando el volumen de las motoneuronas de otros anuros (Potter y col. 2005). Por otra parte también es posible que niveles de testosterona típicos de época reproductiva favorecieran la neurogénesis o retarden la muerte o recambio neuronal de manera cíclica durante el período de apareamiento de la especie, promoviendo un recambio de neuronas con ciertas propiedades de selectividad temporal por otras con una selectividad diferente. La idea de la ocurrencia de neurogénesis durante la época reproductiva del animal dependiente de niveles de testosterona ha sido sugerida por estudios en que se han reportado aumentos volumétricos de distintas áreas del cerebro: por ejemplo, del área preóptica del hipotálamo en la codorniz (Panzica y col. 1991), de los núcleos del canto y auditivos en

paseriformes (revisado en Chen y col. 2013; De Groof y col. 2009) o en el hipocampo de roedores (Spritzer y Galea 2007).

En anuros no se han realizado estudios de variaciones volumétricas de núcleos cerebrales dependientes de hormonas sexuales esteroidales. Sin embargo, sí se ha demostrado proliferación celular en anuros adultos a nivel sub ventricular del telencéfalo, hipotálamo ventral y mesencéfalo (Raucci y col. 2006; Almlí y Wilczynski 2007). También en el laboratorio se ha observado en forma preliminar que inyecciones de BrdU en la zona subventricular del telencéfalo inducen proliferación celular en el hipotálamo de hembras *P. thaul* adultas.

4.8 Conclusiones

Nuestros resultados sugieren que en machos de *P. thaul*, la elevación de los niveles de testosterona plasmática durante la época reproductiva en condiciones naturales, produciría un aumento de la sensibilidad a nivel del TS a señales acústicas coespecíficas de relevancia biológica, como es un coro coespecífico o un estímulo con un PI propio del canto de la especie. La contribución principal de este trabajo fue señalar el rol modulador de la testosterona a nivel sensorial en la vía auditiva de machos anuros, en correspondencia con el rol modulador que el estradiol ejerce en hembras de anuros demostrado en otros estudios. Un rol modulador de la testosterona a nivel auditivo ha sido también reportado en estudios recientes en aves, lo cual indicaría la generalidad de este mecanismo de acción hormonal en vertebrados. Sin embargo, en este grupo de vertebrados los cambios en la sensibilidad auditiva, modulado por testosterona, han sido

detectados a nivel de núcleos auditivos telencefálicos y no mesencefálicos como lo muestran los resultados de este trabajo para una especie de anuro chilena.

La mayor selectividad auditiva en machos de *P.thaul*, podría significar a nivel conductual una mayor selectividad de los machos al canto de machos vecinos coespecíficos en agrupaciones corales naturales, lo cual contribuiría a la mantención de la actividad vocal necesaria para el apareamiento y la reproducción.

Finalmente es pertinente destacar que este tipo de estudios sistémicos, si bien resultan complejos por la diversidad de posibles explicaciones de los fenómenos observados, tienen el atractivo de contribuir una visión más objetiva de la relevancia de los resultados obtenidos para la vida natural de las especies estudiadas.

BIBLIOGRAFIA

- Almli L y Wilczynski W. 2007. Regional distribution and migration of proliferating cell populations in the adult brain of *Hyla cinerea* (Anura, Amphibia). *Brain Res.* 1159: 112-118.
- Baum M y Bakker J. 2013. Roles of sex and gonadal Steroids in Mammalian pheromonal communication. *Front Neuroendocrinol.* 34:268-284. doi:10.1016/j.yfrne.2013.07.004.
- Brantley R y Bass A. 1994. Alternative Male Spawning Tactics and Acoustic Signals in the Plainfin Midshipman Fish *Porichthys notatus* Girard (Teleostei, Batrachoididae). *Ethology.* 96:213-232.
- Brudzynski S. 2013. Ethotransmission: communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats. *Curr Opin Neurobiol.* 23:310-317.
- Burmeister S y Wilczynski W. 2001. Social Context Influences Androgenic Effects on Calling in the Green Treefrog (*Hyla cinerea*). *Horm Behav.* 40:550-558.
- Callard G., Petro Z., y Ryan K. 1978. Androgen Metabolism in the Brain and Non-Neural Tissues of the Bullfrog *Rana catesbeiana*. *Gen Comp Endocrinol.* 34:18-25.
- Caras M, Sen K, Rubel E y Brenowitz E. 2015. Seasonal Plasticity of Precise Spike Timing in the Avian Auditory System. *J Neurosci.* 35:3431-3445.
- Caras M, Brenowitz E y Rubel E. 2010. Peripheral auditory processing changes seasonally in Gambel's white-crowned sparrow. *J Comp Physiol A.* 196:581-599.
- Casseday J, Ehrlich D y Covey E. 1994. Neural Tuning for Sound Duration: Role of Inhibitory Mechanisms in the Inferior Colliculus. *Science.* 264:847-850.
- Chakraborty M. y Burmeister S. 2010. Sexually dimorphic androgen and estrogen receptor mRNA expression in the brain of túngara frogs. *Horm Behav.* 58:619-627.
- Chakraborty M y Burmeister S. 2015. Effects of estradiol on neural responses to social signals in female túngara frogs. *J Exp Biol.* 218:3671-3677; doi: 10.1242/jeb.127738.

- Clayton D. 2000. The Genomic Action Potential. *Neurobiol Learn Mem.* 74:185-216.
- Cousillas H, George I, Alcaix S, Henry L, Richard J y Hausberger M. 2013. Seasonal female brain plasticity in processing social vs. sexual vocal signals. *Eur J Neurosci.* 37: 728-734.
- De Groof G, Verhoye M, Poirier C, Leemans A, Eens M, Darras V y Van der Linden A. 2009. Structural Changes between Seasons in the Songbird Auditory Forebrain. *J Neurosci.* 29:13557-13565.
- Edwards C, Leary C, y Rose G. 2007. Counting on Inhibition and Rate-Dependent Excitation in the Auditory System. *J Neurosci.* 27:13384 -13392.
- Earley C y Leonard B. 1978. GABA and Gonadal Hormones. *Brain Res.* 155: 27-34.
- Endepols H y Walkowiak W. 2001. Integration of ascending and descending inputs in the auditory midbrain of anurans. *J Comp Physiol A.* 186:1119-1133.
- Endepols H, Walkowiak W y Luksch H. 2000. Chemoarchitecture of the anuran auditory midbrain. *Brain Res Rev.* 33: 179-198.
- Elliott T, Christensen-Dalsgaard J y Kelley D. 2007. Tone and call responses of units in the auditory nerve and dorsal medullary nucleus of *Xenopus laevis*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.* 193: 1243-1257.
- Feng A y Lin W. 1991. Differential innervation patterns of three divisions of frog auditory midbrain (torus semicircularis). *J Comp Neurol.* 306:613-30.
- Forlano P, Marchaterre M, Deitcher D, y Bass A. 2010. Distribution of Androgen Receptor mRNA Expression in Vocal, Auditory, and Neuroendocrine Circuits in a Teleost Fish. *J Comp Neurol.* 518: 493-512.
- Fortune E y Rose G. 1997. Passive and Active Membrane Properties Contribute to the Temporal Filtering Properties of Midbrain Neurons In Vivo. *J Neurosci.* 10:3815-3825.
- Guerriero G, Rosellib Ch, Paoluccic M, Bottea V, y Ciarcia G. 2000. Estrogen receptors y aromatase activity in the hypothalamus of the female frog, *Rana esculenta*. Fluctuations throughout the reproductive cycle. *Brain Res.* 880: 92-101.

- Guerriero G, Prins G, Birch L y Ciarcia G. 2005. Neurodistribution of Androgen Receptor Immunoreactivity in the Male Frog, *Rana esculenta*. *Ann N Y Acad Sci.* 1040:332-336.
- Goense J y Feng A. 2005. Seasonal Changes in Frequency Tuning and Temporal Processing in Single Neurons in the Frog Auditory Midbrain. *J Neurobiol.* 65:22-36.
- Hall J y Feng A. 1987. Evidence for parallel processing in the frog's auditory thalamus. *J Comp Neurol.* 258:407-19.
- Hall J. 1999. GABAergic inhibition shapes frequency tuning and modifies response properties in the auditory midbrain of the leopard frog. *J Comp Physiol A.* 185: 479-491.
- Henry K y Lucas J. 2009. Vocally correlated seasonal auditory variation in the house sparrow. (*Passer domesticus*). *J Exp Biol.* 212:3817-3822.
- Herbison A y Fénelon V. 1995. Estrogen Regulation of GABA_A Receptor Subunit mRNA Expression in Preoptic Area and Bed Nucleus of the Stria Terminalis of Female Rat Brain. *J Neurosci.* 15: 2328-2337.
- Hillery C. 1984. Seasonality of Two Midbrain Auditory Responses in the Treefrog, *Hyla chrysoscelis*. *Copeia.* 4:844-852.
- Hoke K, Burmeister S, Fernald R, Rand S, Ryan M y Wilczynski W. 2004. Functional Mapping of the Auditory Midbrain during Mate Call Reception. *J Neurosci.* 24:11264 - 11272.
- Hoke K, Ryan M y Wilczynski W. 2005. Social cues shift functional connectivity in the hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 10712-10717.
- Hoke K, Ryan M y Wilczynski W. 2010. Sexually dimorphic sensory gating drives behavioral differences in túngara frogs. *J Exp Biol.* 213: 3463-3472.
- Hollis D y Boyd S. 2005. Distribution of GABA-Like Immunoreactive Cell Bodies in the Brains of Two Amphibians, *Rana catesbeiana* and *Xenopus laevis*. *Brain Behav Evol.* 65:127-142.

- Iwabuchi J, Wako S, Tanaka T, Ishikawa A, Yoshida Y y Miyata Sh. 2007. Analysis of the p450 aromatase gene expression in the *Xenopus* brain and gonad. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 107: 149-155.
- Kang L, Marin M y Kelley D. 1995. Androgen Biosynthesis and Secretion in Developing *Xenopus laevis*. *Gen Comp Endocrinol.*100:293-307.
- Kelley D, Lieberburg I, McEwen B y Pfaff D. 1978. Autoradiographic and Biochemical studies of Steroid hormone-concentrating cells in the brain of *Rana pipiens*. *Brain Res.* 140: 287-305.
- Kelley D. 1980. Auditory and Vocal Nuclei in the Frog Brain Concentrates Sex Hormones. *Science.* 207:553-555.
- Kurz E, Sengelaub D y Arnold A. 1986. Androgens Regulate the Dendritic Length of Mammalian Motoneurons in Adulthood. *Science.* 232:395-398.
- Lasaga M, Duvilanski B, Seilicovich A, Afione S y Debeljuk L. 1988. Effect of sex steroids on GABA receptors in the rat hypothalamus and anterior pituitary gland. *Eur J of Pharmacol.* 155:163-166.
- Leary C, Edwards C, y Rose G. 2008. Midbrain Auditory Neurons Integrate Excitation and Inhibition to Generate Duration Selectivity: An In Vivo Whole-Cell Patch Study in Anurans. *J Neurosci.* 28:5481-5493.
- Leary C. 2009. Hormones and acoustic communication in anuran amphibians. *Integr Comp Biol.* 49:452-470.
- Licht P, McCreery B, Barnes R y Pang R. 1983. Seasonal and Stress Related Changes in Plasma Gonadotropins, Sex Steroids, and Corticosterone in the Bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Gen Comp Endocrinol.* 50:124-145.
- Little A. 2013. The influence of steroid sex hormones on the cognitive and emotional processing of visual stimuli in humans. *Front Neuroendocrinol.* 34:315-328.
- Lucas J, Freeberg T, Krishnan A y Long A. 2002. A comparative study of avian auditory brainstem responses: correlations with phylogeny and vocal complexity, and seasonal effects. *J Comp Physiol A.* 188: 981-992.

- Lucas J, Freeberg T, Long G y Krishnan A. 2007. Seasonal variation in avian auditory evoked responses to tones: a comparative analysis of Carolina chickadees, tufted titmice and white-breasted nuthatches. *J Comp Physiol A*. 193:201-215.
- Luksch H y Walkowiak W. 1998. Morphology and axonal projection patterns of auditory neurons in the midbrain of the painted frog, *Discoglossus pictus*. *Hear Res*. 122:1-17.
- Lynch K, Crews D, Ryan M y Wilczynski W. 2006. Hormonal state influences aspects of female mate choice in the Túngara Frog (*Physalaemus pustulosus*). *Horm Behav*. 49:450-457.
- Lynch K y Wilczynski W. 2008. Brain Behav Evol. Reproductive Hormones Modify Reception of Species-Typical Communication Signals in a Female Anuran. 71:143-150.
- MacLusky N, Hajszan T, Prange-kiel J y Leranth C. 2006. Androgen modulation of hippocampal synaptic plasticity. *Neuroscience*. 138:957-965.
- Maney D. y Pinaud R. 2001. Estradiol-dependent modulation of auditory processing and selectivity in songbirds. *Front Neuroendocrinol*. 32:287-302.
- Maney D, Cho E, y Goode C. 2006. Estrogen-dependent selectivity of genomic responses to birdsong. *Eur J Neurosci*. 23:1523-1529.
- Maney D, Goode C, Lange H, Sanford S y Solomon B. 2008. Estradiol Modulates Neural Responses to Song in a Seasonal Songbird. *J Comp Neurol*. 511:173-186.
- Mangiamele L y Burmeister S. 2011. Auditory selectivity for acoustic features that confer species recognition in the tungara frog. *J Exp Biol*. 214:2911-2918.
- Marler P. Bird Calls, their potential for behavioral neurobiology. 2004. *Ann N Y Acad Sci*. 1016:31-44.
- Maruska K, Ung U y Fernald R. 2012. The African Cichlid Fish *Astatotilapia burtoni* Uses Acoustic Communication for. Reproduction: Sound Production, Hearing, and Behavioral Significance. *PLoS ONE*. 7(5): e37612. doi:10.1371/journal.pone.003761.

Matragrano L, Leblanc M, Chitrapu A, Blanton Z y Maney D. 2013. Testosterone Alters Genomic Responses to Song and Monoaminergic Innervation of Auditory Areas in a Seasonally Breeding Songbird. *Dev Neurobiology*. 73:455-468.

Meitzen J, Perkel D, y Brenowitz E. 2007. Seasonal changes in intrinsic electrophysiological activity of song control neurons in wild song sparrows. *J Comp Physiol A*. 193:677-683.

Meitzen J y Thompson C. 2008. Seasonal-like growth and regression of the avian song control system: Neural and behavioral plasticity in adult male Gambel's white-crowned sparrows. *Gen Comp Endocrinol*. 157:259-265.

Miranda J y Wilczynski W. 2009a. Female reproductive state influences the auditory midbrain response. *J Comp Physiol A*. 195:341-349.

Miranda J y Wilczynski W. 2009b. Sex differences and androgen influences on midbrain auditory thresholds in the green treefrog, *Hyla cinerea*. *Hear Res*. 252:79-88.

Morrel J, Kelley D y Pfaff D. 1975. Autoradiographic Localization of Hormone-concentrating Cells in the Brain of an Amphibian, *Xenopus laevis*. II ESTRADIOL. *J Comp Neurol*. 164:63-78.

Neal J y Wade J. 2007. Effects of season, testosterone and female exposure on c-fos expression in the preoptic area and amygdala of male green anoles. *Brain Res*. 1166:124-131.

Nottebohm F. 1981. A Brain for All Seasons: Cyclical Anatomical Changes in Song Control Nuclei of the Canary Brain. *Science*. 214:1368-1370.

Palka Y y Gorbman A. 1973. Pituitary and testicular Influenced sexual behavior in male frogs, *Rana pipiens*. *Gen Comp Endocrinol*. 21: 148-151.

Panzica G, Viglietti-Panzica C; Sanchez F, Sante P y Balthazart J. 1991. Effects of testosterone on a selected neuronal population within the preoptic sexually dimorphic nucleus of the Japanese quail. *J Comp Neurol*. 303:443-56.

Panzica G, Aste N, Viglietti-Panzica C y Ottinger M. 1995. Structural sex differences in the brain: Influence of gonadal steroids and behavioral correlates. *J Endocrinol Invest*. 18:232-252.

Parducz A, Hajszan T, Maclusky J, Hoyk Z, Csakvari E, Kurunczi A, Prange-kiel J y Leranath C. 2006. Synaptic remodeling induced by gonadal hormones: Neuronal plasticity as a mediator of neuroendocrine and behavioral responses to steroids. *Neuroscience*. 138:977-985.

Park K, Meitzen J, Moore I, Brenowitz E y Perkel D. 2005. Seasonal-like plasticity of spontaneous firing rate in a songbird premotor nucleus. *J Neurobiol*. 64:181-191.

Parker R y Mason R. 2012. How to make a sexy snake: estrogen activation of female sex pheromone in male red-sided garter snakes. *J Exp Biol*. 215: 723-730.

Penna M, Capranica R y Somers J. 1992. Hormone-induced vocal behavior and midbrain auditory sensitivity in the green treefrog, *Hyla cinerea*. *J Comp Physiol A*. 170:73-82.

Penna M. 1997. Selectivity of Evoked Vocal Responses in the Time Domain y frogs of the genus *Batrachyla*. *J Herpetol*. 31:202-217.

Penna M, Feng A y Narins P. 1997. Temporal selectivity of evoked vocal responses of *Batrachyla antartandica* (Amphibia: Leptodactylidae). *Anim Behav*. 54:833-84.

Penna M, Velásquez N, Solís R. 2008. Correspondence between evoked vocal responses and auditory thresholds in *Pleurodema thaul* (Amphibia; Leptodactylidae). *J Comp Physiol A*. 194:361-37

Phillmore L, Veysey A, y Roach S. 2011. Zenk expression in auditory regions changes with breeding condition in male Black-capped chickadees (*Poecile atricapillus*) *Behav Brain Res*. 225:464- 472.

Polzonetti-Magni A, Mosconi G, Carnevali O y Yamamoto K, Hanaoka Y y Kikuyama S. 1998. Gonadotropins and Reproductive Function in the Anuran Amphibian, *Rana esculenta*. *Biol Reprod*. 58:88-93.

Potter K, Bose T y Yamaguchi A. 2005. Androgen-Induced Vocal Transformation in Adult Female African Clawed Frogs. *J Neurophysiol*. 94:415-428.

Pouso P, Quintana L, Bolatto C y Silva A. 2010. Brain androgen receptor expression correlates with seasonal changes in the behavior of a weakly electric fish, *Brachyhypopomus gauderio*. *Horm Behav*. 58:729-736.



Raucci F, Di Fiore M, Pinelli C, D'Aniello B, Luongo L, Polese G y Rastogi R. 2006. Proliferative activity in the frog brain: A PCNA-immunohistochemistry analysis. *J Chem Neuroanat.* 32:127-142.

Sisneros J, Forlano P, Deitcher D y Bass A. 2004. Steroid-Dependent Auditory Plasticity Leads to Adaptive Coupling of Sender and Receiver. *Science.* 305: 404-407.

Sisneros J. 2009. Steroid-dependent auditory plasticity for the enhancement of acoustic communication: Recent insights from a vocal teleost fish. *Hear Res.* 2: 529-14.

Smith G, Brenowitz E, Beecher M y Wingfield J. 1997. Seasonal Changes in Testosterone, Neural Attributes of Song Control Nuclei, and Song Structure in Wild Songbirds. *J Neurosci.* 17:6001-6010.

Solís Rigoberto. 1994. Factores moduladores de las interacciones sociales acústicas de *Pleurodema thaul*. Tesis doctoral.

Solís R y Penna M. 1997. Testosterone Levels and Evoked Vocal Responses in a Natural Population of the Frog *Batrachyla taeniata*. *Horm Behav.* 31:101-109.

Soma K, Hartman V, Winfield J, y Brenowitz E. 1999. Seasonal Changes in Androgen Receptor Immunoreactivity in the Song Nucleus HVc of a Wild Bird. *J Comp Neurol.* 409:224-236.

Spritzer M y Galea L. 2007. Testosterone and Dihydrotestosterone, but not Estradiol, Enhance Survival of New Hippocampal Neurons in Adult Male Rats. *Dev Neurobiol.* 67:1321-1333.

Tang Y-Z, Piao Y-S, Zhuang L-Z y Wang Z-W. 2001. Expression of Androgen Receptor mRNA in the Brain of *Gekko gekko*: Implications for Understanding the Role of Androgens in Controlling Auditory and Vocal Processes. *J Comp Neurol.* 438:136-147.

Tobet A y Hanna I. 1997. Ontogeny of Sex Differences in the Mammalian Hypothalamus and Preoptic Area. *Cell Mol Neurobiol.* 7:565-601.

Tobias M, Marin M y Kelley D. 1993. The Roles of Sex, *Xenopus laevis* Innervation, and Androgen in Laryngeal Muscle of *Xenopus laevis*. *J Neurosci.* 13:324-333.

Tramontin A, Wingfield J y Brenowitz E. 2003. Androgens and Estrogens Induce Seasonal-Like Growth of Song Nuclei in the Adult Songbird Brain. *J Neurobiol.* 57:130-140.

Tremere L, Jeong J y Pinaud R. 2009. Estradiol Shapes Auditory Processing in the Adult Brain by Regulating Inhibitory Transmission and Plasticity-Associated Gene Expression. *J Neurosci.* 29:5949-5963.

Vagell M y McGinnis M. 1997. The Role of Aromatization in the Restoration of Male Rat Reproductive Behavior. *J Neuroendocrinol.* 9:415-421.

Velásquez N, Opazo D, Díaz J y Penna M. 2014. Divergence of Acoustic Signals in a Widely Distributed Frog: Relevance of Inter-Male Interaction. *PLoS ONE* 9(1): e87732. doi:10.1371/journal.pone.0087732.

Walkowiak W. 1980. The Coding of Auditory Signals in the Torus semicircularis of the Fire-Bellied Toad and the Grass Frog: Responses to Simple Stimuli and to Conspecific Calls. *J Comp Physiol A.* 138:131-148.

Wells K y Schwartz J. 2007. The Behavioral Ecology of Anuran Communication. En Narins P, Fay R y Popper A (eds.), *Hearing and Sound Communication in Amphibians.* pp: 44-86. Springer.

West M, Slomianka L y Gundersen H. 1991. Unbiased Stereological Estimation of the Total Number of Neurons in the Subdivisions of the Rat Hippocampus Using the Optical Fractionator. *Anat Rec.* 231:482-497.

Wetzel D y Kelley D. 1983. Androgen and Gonadotropin effects on male mate calls in South African clawed frogs, *Xenopus laevis*. *Horm Behav.* 17:388-404.

Wilczynski W, Lynch K y O'Bryant E. 2005. Current research in amphibians: Studies integrating endocrinology, behavior, and neurobiology. *Horm Behav.* 48: 440-450.

Wilczynski W y Endepols H. 2007. Central Auditory Pathways in Anuran Amphibians: The Anatomical Basis of Hearing and Sound Communication. En Narins P, Fay R Popper A (eds.), *Hearing and Sound Communication in Amphibians.* pp: 235-236. Springer.

Williams H. 2004. Birdsong and Singing Behavior. *Ann N Y Acad Sci.* 1016: 1-30.

Xiao L y Jordan C. 2002. Sex Differences, Laterality, and Hormonal Regulation of Androgen Receptor Immunoreactivity in Rat Hippocampus. *Horm Behav.* 42:327-336.

Yang E, Nasipak B y Kelley D. 2007. Direct action of gonadotropin in brain integrates behavioral and reproductive functions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:2477-2482.

Yovanof S y Feng A. 1983. Effects of Estradiol on auditory evoked responses from frog's auditory midbrain. *Neurosci Lett.* 36:291-297.

Zhang D., Cui J. y Tang Y. 2012. Plasticity of Peripheral Auditory Frequency Sensitivity in Emei Music Frog. *PLoS ONE* 7(9):e45792. doi:10.1371/journal.pone.0045792.