

Informe final publicable de proyecto

Modulación nonapeptidérgica de la conducta reproductiva

Código de proyecto ANII: FCE_3_2022_1_172447

Fecha de cierre de proyecto: 01/04/2025

POUSO, Paula (Responsable Técnico - Científico)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE MEDICINA (Institución Proponente) \\ FACULTAD DE MEDICINA. FUNDACIÓN MANUEL PEREZ

Resumen del proyecto

Si bien la base neural de la conducta social ha sido ampliamente estudiada, aún queda mucho por conocer debido a la gran diversidad interespecífica existente. En vertebrados, las conductas sociales están controladas por una red de núcleos centrales altamente conservada: la red cerebral de la conducta social (RCCS). Los nonapéptidos hipotalámicos son reconocidos moduladores de esta conducta y se caracterizan por ser conservados evolutivamente. La vasotocina (AVT, vasopresina en mamíferos), es un reconocido nonapéptido que interviene en el control de una amplia variedad de conductas sociales, como la conducta reproductiva. Los anuros son animales campeones en el despliegue de señales de cortejo, un comportamiento social básico determinante para reproducirse exitosamente. Sin embargo, hay escasos trabajos que describen el rol modulador de nonapéptidos en su conducta social, y en particular sobre la acción de la AVT en la modulación del comportamiento vocal. *Boana pulchella* es un anfibio anuro autóctono. Los machos emiten cantos en coros al unísono o en forma alternada durante el cortejo. Planteamos la hipótesis de que la AVT modula la conducta reproductiva y en particular el comportamiento vocal en machos de *B. pulchella*. Para testear esta hipótesis, identificamos y describimos las áreas de la RCCS: el área preóptica (APO), la amígdala medial, el hipotálamo anterior y ventromedial, y el septum lateral mediante técnicas de histología clásica. Luego, inmunoidentificamos la presencia y distribución de AVT en el APO de *B. pulchella*, y finalmente mediante ensayos farmacológicos en campo describimos que la administración exógena del antagonista de AVT disminuye la probabilidad de cantar respecto a los animales no tratados y, además, tiende a reducir la frecuencia dominante de las vocalizaciones. Encontramos por primera vez en un anuro autóctono, que la AVT está involucrada en la modulación de la conducta reproductiva, y en particular, en el comportamiento vocal.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Otros Tópicos Biológicos / neurociencia

Palabras clave: vasotocina / comportamiento social / anuro /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

En las últimas décadas se han investigado intensamente las bases neurales de la conducta social en diferentes taxa de vertebrados incluido el ser humano [1]–[6]. Sin embargo, dada la enorme diversidad interespecífica ha sido difícil dilucidar las reglas generales que lo gobiernan. En vertebrados esta conducta es controlada por una red de núcleos centrales altamente conservada (red cerebral del comportamiento social, RCCS, [7]). La RCCS del cerebro está constituida por áreas del cerebro anterior y medio que son esenciales para la expresión de comportamientos básicos sociales [8]. El área preóptica (APO), perteneciente a la RCCS, está presente en el cerebro de todos los vertebrados y se ubica en el hipotálamo, y rostral al quiasma óptico [9]. El APO es relevante en ciertos aspectos de la conducta reproductiva [2]. En anuros, el APO es un área acústicamente sensitiva, modulada por estímulos sociales [10]–[13] y su neuroanatomía no se ha descrito exhaustivamente [9].

Los nonapéptidos hipotalámicos están implicados en la modulación de comportamientos sociales en varias especies de vertebrados, lo que evidencia una alta conservación en estructura y función. En mamíferos, estos incluyen la vasopresina (AVP) y la oxitocina (OT), y en vertebrados no mamíferos la vasotocina (AVT), la isotocina (IT) y mesotocina (MT) [14], [15]. En vertebrados amniotas, estos nonapéptidos son producidos mayoritariamente por neuronas de los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo y en anamniotas por núcleos homólogos en el APO [16]. Estas neuronas se clasifican de acuerdo con su tamaño y distribución espacial en parvocélulas, magnocélulas y gigantocélulas [42]. En ambos casos, las prolongaciones de estas neuronas llegan a la neurohipófisis, desde donde los péptidos se liberan a la sangre. En particular, las neuronas AVP/AVT del APO proyectan a diversas áreas del SNC donde se postula que ejercen acciones moduladoras de la conducta social [17]. En anuros existen escasos reportes acerca de la distribución de nonapéptidos y en particular del AVT en el cerebro [18]–[22].

La conducta reproductiva es un tipo de conducta social que comprende toda interacción entre ambos sexos que conduzca a la unión de los gametos [23]. El comportamiento previo a la gametoposición que involucra la búsqueda, atracción y excitación de una potencial pareja se denomina cortejo [24]. Las señales de cortejo son usadas para estimular y atraer a la pareja y en la mayoría de las especies son iniciadas por machos [25].

En aves cantoras, anuros y peces teleósteos, se ha descrito la modulación que ejercen los nonapéptidos y en particular el AVT y su antagonista (Manning Compound (MC)), en conductas reproductivas que involucran la emisión de señales comunicativas [17], [26], [27], [30].

En anuros la emisión de señales comunicativas es un comportamiento social básico esencial durante el cortejo [28]. En muchas especies, el cortejo comprende la formación de coros compuestos por machos que suman sus cantos en sincronía para aumentar la amplitud de la señal emitida y atraer hembras a largas distancias. Los patrones temporales particulares de estas emisiones son específicos de cada especie [28]. La base neural de vocalizaciones producidas por anuros subyace en núcleos del tronco encefálico conectados con otras áreas del cerebro, incluida el APO [28]. El AVT ha sido estudiado como modulador de la emisión de vocalizaciones en la conducta reproductiva en varias especies ([17], [29]), logrando el incremento de la frecuencia de emisión del canto o la producción de distintos tipos de vocalizaciones, lo que sugiere que el AVT puede estar involucrado con el aumento de la motivación para cantar luego de recibir el tratamiento ([30]–[36]).

Boana pulchella es un anfibio anuro de la familia Hylidae, de mediano tamaño (3- 4,6 cm, 1,7-4,7 g), distribuido en Uruguay, sur de Brasil, centro y noreste de Argentina, y sur de Paraguay [37]. Esta especie presenta dimorfismo sexual, caracterizado por la coloración de la piel y la prominencia del saco vocal en machos. Durante el período reproductivo vive en grupos en charcos temporales de aguas naturales y/o artificiales [38], [39]. La distancia observada entre los individuos de esta especie, durante el cortejo ha sido aproximadamente entre 0,5 y 1,5

m, que indica una gran tolerancia entre coespecímenes en anuros. Durante el cortejo, actividad nocturna, se observa interacción entre machos manifestada por el canto en coros al unísono o en forma alternada. Los meses de mayor actividad de los coros son de setiembre a abril [38]. En Uruguay existen reportes sobre las características acústicas del canto en la especie [39], [40]. Sin embargo, no hay descripciones neuroanatómicas y no se ha explorado el rol modulador de nonapéptidos sobre la conducta reproductiva y en particular sobre la emisión del canto en la especie.

Teniendo en cuenta los antecedentes descriptos del rol modulador de AVT en la emisión del canto en machos de anuros, hipotetizamos que el AVT se encuentra presente en neuronas de la RCCS y modula la conducta reproductiva, teniendo un efecto sobre la emisión del canto en machos del anuro autóctono *Boana pulchella*.

En este proyecto exploramos por primera vez el rol modulador de AVT en la conducta reproductiva y en particular en la emisión del canto en un modelo neuroetológico novedoso en Uruguay. Este animal presenta ventajas para el estudio de las bases neuroendocrinas del comportamiento social: primero, porque nos permite explorar, a través de su comportamiento vocal, cambios en el sistema nervioso [44]. Segundo, en anuros es conocida la modulación nonapeptidérgica sobre el comportamiento vocal [30], [42]. Tercero, es una especie abundante en Uruguay cuya población es estable y sin preocupación prioritaria, y que presenta despliegues vocales y locomotores robustos durante el cortejo [37], [38], [40] [43]. Cuarto, a diferencia de otros modelos animales neuroetológicos, podemos estudiar su comportamiento en la naturaleza sin perturbarlo, porque los registros son de simple y accesible implementación. Quinto, contamos con resultados preliminares que describen las características del canto en la especie y la variabilidad de este [44]. También hemos realizado experimentos pilotos realizados en el campo que muestran que es posible estimular el canto de los machos con la estimulación acústica de la grabación del canto de conespecíficos. Sexto, hemos realizado una descripción preliminar de la presencia de AVT en cerebro en esta especie [45]. Entendemos que este trabajo de investigación permitió por primera vez contribuir al conocimiento de las bases neuroendocrinas de la conducta reproductiva en un anuro autóctono silvestre.

Objetivo general:

Este proyecto propuso como objetivo general:

Explorar el rol de nonapéptidos hipotalámicos sobre la conducta reproductiva en un anuro autóctono

Teniendo en cuenta la organización general del proyecto, se desarrollaron 2 objetivos operativos generales

Objetivo general 1:

Describir la presencia de neuronas AVTérgicas en áreas de la RCCS y en particular en el APO de machos de *Boana pulchella*.

Objetivo general 2:

Describir el efecto del AVT sobre la emisión del canto en machos de *Boana pulchella*.

Objetivos específicos

1-Identificar las áreas de la RCCS y en particular el APO, de machos de *B. pulchella* por técnicas de histología clásica.

2-Identificar la presencia de neuronas AVTérgicas en áreas de la RCCS y en particular en el APO, de machos de *B. pulchella* por técnicas de inmunohistoquímica.

3-Caracterizar el número, morfología y patrón de distribución espacial de neuronas AVTérgicas en áreas de la RCSS y en particular en el APO de machos de *B. pulchella*.

4-Poner a punto el protocolo conductual farmacológico para inyecciones de AVT en machos de *B. pulchella*.

5-Describir el efecto del AVT sobre la emisión del canto de machos de *B. pulchella*.

Metodología/Diseño del estudio

Estrategia

Nuestra estrategia consistió en integrar un enfoque conductual llevado a cabo en el hábitat natural con abordajes histocelulares desarrollados en el laboratorio. El proyecto estuvo diseñado en dos capítulos. En el primero, abordamos objetivos neuroanatómicos e inmunohistoquímicos en cerebro de machos (Objetivo General 1 y específicos 1-3) y en el segundo exploramos objetivos farmacológicos con AVT (Objetivo general 2 y específicos 4-6).

Metodología

Trabajo de campo - Paraje Zanja del Tigre ruta 12 km 40, Maldonado, Uruguay. Los experimentos se realizaron durante la noche (22 pm a 2 am) entre setiembre y abril de 2023 y 2025. En el transcurso de los experimentos se utilizaron dataloggers para medir temperatura del aire, horas luz/oscuridad, todas variables relacionadas con la emisión del canto en la especie [38].

Animales- Usamos 76 machos (Peso: $2,85 \pm 0.55$; SVL: $3.55 \pm$; LF: 1.68 ± 0.19). Esta especie presenta dimorfismo sexual, caracterizado por coloración de la piel y la prominencia del saco vocal en machos [37]. Se realizó la caracterización biométrica de machos con balanza de resorte y se midió longitud hocico-cloaca (SVL) y largo del fémur (LF) con calibre digital. Los machos usados en capítulo 2 fueron medidos luego de los ensayos farmacológicos. En todos los experimentos se minimizó el estrés de los animales siguiendo el protocolo aprobado por CEUA Facultad de Medicina (N.º 1492, expediente No 070151-000013-23).

Capítulo I

Experimentos neuroanatómicos e inmunohistoquímicos.

Machos adultos ($n=4$) fueron colectados en forma manual [56] y se tomaron medidas morfométricas de los mismos. Luego fueron

anestesiados con Metansulfonato de tricaina (por inmersión, y se realizó la perfusión intracardiaca para fijación con PFA al 4% en el campo. Los cerebros fueron disecados y trasladados al laboratorio para su procesamiento.

Procesamiento de muestras para describir áreas de la RCCS y en particular el APO.

Los cerebros luego de posfijados, se pasaron a buffer fosfato (BF) y luego fueron encastrados en albúmina–gelatina y cortados serialmente con vibrátomo a 50-70 μm en orientación transversal y luego almacenados en BF. Cada primer corte obtenido se inmunomarcó con AVT y luego los cortes se montaron con un marcador nuclear (DAPI). Cada segundo corte se tiñó con Azul de Toluidina. Entre cada serie de dos cortes hubo 100 μm en el eje rostro-caudal del cerebro. Usamos atlas neuroanatómicos para identificar áreas de la RCCS y el APO [9].

Inmunohistoquímica para AVT

Los cortes obtenidos por vibrátomo se lavaron en BF, se bloquearon con solución seroalbúmina bovina (SAB) (SIGMA) y se incubaron con anticuerpo (AC) primario (anti-AVT hecho en conejo, Immunostar) de 24 a 48 horas a 4°C. Luego los cortes se lavaron con BF, se bloquearán con SAB en BF y se incubaron con anticuerpo secundario conjugado a fluoróforo (2 horas a temperatura ambiente). Luego de lavados los cortes con BF se realizó el montaje en medio para fluorescencia con tinción nuclear (DAPI). Como parte de los controles de especificidad del anticuerpo se realizaron los controles de preabsorción con péptido (AVT y Mesotocina) debido a la similitud en la estructura aminoácídica entre esos nonapéptidos [46], [48]. También de forma rutinaria en algunos cortes se realizó la omisión de anticuerpo primario y/o secundario.

Adquisición, procesamiento de imágenes y cuantificación.

Utilizamos un microscopio de luz transmitida con cámara digital asociada (OLYMPUS) y un microscopio láser confocal espectral (Leica). Las imágenes se importaron al software LASAF para generar z-stacks. Se realizó la descripción de los tipos de neuronas y su cuantificación en el APO de acuerdo con métodos ya descriptos [46].

Capítulo II

Experimentos farmacológicos con AVT y antagonista.

Puesta a punto del protocolo conductual farmacológico para inyecciones de AVT en machos

Para evaluar el efecto de la inyección con AVT, antagonista (Manning Compound, MC) o salino sobre el bienestar del animal, se realizó una prueba manteniendo a los animales en cautiverio por 48 horas para monitorizarlos. Una vez realizado este monitoreo, se realizó la serie experimental en campo con otros animales y luego de finalizada los animales fueron devueltos al tajamar. El sistema de registro acústico para campo implica dos pasos: primero, se realiza el registro vocal del macho vocalizador previo a la administración del tratamiento, utilizando un micrófono unidireccional. Segundo, tras la inyección intraperitoneal de AVT, MC o salino en dosis de acuerdo con la literatura ([30]-[36], [65]), el macho se coloca en una bolsa plástica humedecida, equipada con un micrófono conectado a una grabadora portátil, la cual registra las vocalizaciones emitidas.

Se utilizaron 72 machos adultos en tres grupos experimentales (adjudicados de forma aleatoria: AVT, MC y salino).

Procesamiento semiautomático y validación manual

Los datos fueron procesados de forma semiautomática con un código de programación en R studio y también se realizó la validación manual usando el Software Raven por al menos dos personas, en forma ciega y aleatoria.

Estadística

El procesamiento estadístico se realizó usando modelos lineales mixtos generalizados de acuerdo con [46], [48].

Resultados, análisis y discusión

A continuación, detallo los resultados y discusión de acuerdo con los objetivos planteados.

Capítulo I

1-Identificar las áreas de la RCCS y en particular el APO, de machos de *B. pulchella* por técnicas de histología clásica.

Resultado logrado

Identificamos las siguientes áreas de la RCCS: el área preóptica (APO), la amígdala medial, el hipotálamo anterior y ventromedial, y el septum lateral. Nos enfocamos en la descripción neuroanatómica del APO en cortes transversales del cerebro de machos de *B. pulchella*.

El APO, se localiza entre la comisura anterior y el quiasma óptico, abarca una extensión de aproximadamente 800 μm en el eje rostro-caudal. En cortes rostrales del APO se identifican columnas de somas densamente teñidas rodeando el receso preóptico, mientras que en niveles más caudales los somas delimitan el sector ventral del tercer ventrículo, organizándose en columnas orientadas dorsal y lateralmente, con una disposición celular más dispersa hacia los márgenes laterales.

2-Identificar la presencia de neuronas AVTérgicas en áreas de la RCCS y en particular en el APO, de machos de *B. pulchella* por técnicas de inmunohistoquímica.

Resultado logrado

Exploramos la presencia de inmunoreactividad para AVT en cortes transversales de áreas de la RCCS, en particular el APO en machos de *B. pulchella*.

Previo a la exploración de inmunoreactividad en los cortes se realizaron tres controles técnicos (omisión del anticuerpo primario, del secundario y de ambos) sin detección de señal, lo que confirmó la ausencia de auto fluorescencia tisular. La detección de somas AVT+ en el APO validó la presencia de AVT, mientras que la ausencia de señal tras el bloqueo con AVT confirmó la especificidad del anticuerpo. Finalmente, la persistencia de fluorescencia tras la preabsorción con MST demostró que el anticuerpo no reconoce estructuras similares como MST, reforzando su especificidad exclusiva para AVT.

Confirmamos la presencia de neuronas AVT+ en el APO de machos de la especie, tanto a nivel de cortes rostrales como caudales que mostraron diferente distribución en los ejes rostro-caudal y dorsoventral de acuerdo con la altura de corte (ver resultado objetivo 3).

3-Caracterizar el número, morfología y patrón de distribución espacial de neuronas AVTérgicas en áreas de la RCSS y en particular en el APO de machos de *B. pulchella*.

Resultado logrado

En el APO, tanto en niveles rostrales como caudales, se identificaron somas AVT+ distribuidos adyacentes al receso preóptico, con prolongaciones que se extienden en diversas direcciones, incluidas las regiones laterales. En cortes rostrales del APO pudo observarse la presencia de neuronas AVTérgicas periventriculares y próximas a la superficie ventral. Las prolongaciones de estas neuronas se dirigen ventrolateralmente. En cortes medios del APO, aumenta la densidad de neuronas AVTérgicas encontrándose ordenadas en filas (de dos o tres neuronas) próximas al ventrículo y distribuidas más dorsalmente. Las prolongaciones se dirigen ventrolateralmente y caudalmente. En cortes caudales, disminuye el número de neuronas AVTérgicas, las cuales se dispusieron más dorsales y se alejaron del ventrículo. Las prolongaciones se dispusieron paralelas al ventrículo o en dirección ventro-lateral. En todos los cortes, las prolongaciones neuronales AVT+ se observan tanto en orientación longitudinal como transversal y tenían el aspecto varicoso característico para el neuropéptido en estudio. Respecto a la morfología de neuronas AVT inmunoreactivas, se observaron somas con morfologías variadas (redondeada, ovalada, piriforme) y núcleos esféricos, con marcaje puntiforme característico de AVT. En un corte rostral del APO pueden observarse neuronas AVT+ con somas esféricos y otros piriformes. Respecto al número de prolongaciones la mayoría de las neuronas observadas fueron bipolares. En un corte medio del APO, las neuronas AVT+ presentaron somas ovoides y esféricos, fueron neuronas monopolares y algunas bipolares y presentaron prolongaciones varicosas. En un corte caudal, se observaron somas AVT+ esféricos o piriformes. Las prolongaciones se observaron varicosas y cortas.

Con el objetivo de obtener medidas morfométricas, se realizó la medida del diámetro mayor de cada célula AVT+ en cortes seriados del APO. Al final del último año realizamos más experimentos para aumentar el número de muestras a analizar y actualmente se está completando el proceso de cuantificación. Nuestros resultados preliminares muestran que en cortes rostrales la media del diámetro mayor fue de $11,2 \pm 1,3$, en cortes medios fue de $13,9 \pm 3,0$ y en cortes caudales fue de $17,8 \pm 3,9$. Teniendo en cuenta el tamaño del soma, morfología y ubicación de las células en el eje rostro-caudal y ventro-dorsal, las células de menor diámetro remedian a las poblaciones parvocélulas, las de mediano y mayor tamaño las magnocélulas y gigantocélulas respectivamente.

NOTA: para profundizar en los resultados de este capítulo puede consultar:[59].

Discusión

Primero se identificaron áreas cerebrales de la RCCS en machos vocalizadores de *B. pulchella*: el APO, la amígdala medial, el hipotálamo anterior y ventromedial, y el septum lateral. Estas áreas fueron caracterizadas utilizando técnicas citoarquitecturales y siguiendo referencias bibliográficas de estudios similares realizados en otras especies de anuros. Segundo, se realizó la caracterización neuroanatómica del APO. Por último, se inmunoidentificó la presencia de neuronas AVT+ en el APO de machos vocalizadores de *B. pulchella*. Existen pocos informes sobre neuroanatomía en anuros [9], [60], [61], en estos, los detalles para identificar áreas son limitados. Sin embargo, en *Rana esculenta* miembro de la familia Ranidae, se proporciona una descripción detallada de cómo identificar las áreas de nuestro interés [62]. Aunque *R. esculenta* se encuentra filogenéticamente de *B. pulchella* miembro de la familia Hylidae [63], los reperes anatómicos eran evidentes y fáciles de identificar al comparar cortes de los cerebros de ambas especies. Para el caso del APO se utilizó la aparición del receso preóptico para indicar el comienzo de esta área. El APO fue ubicado entre la comisura anterior y el quiasma óptico.

La presencia de somas y fibras de neuronas nonapéptidérgicas es característica del APO y está conservada tanto en vertebrados y en particular en anuros [6], [20], [21], [23]), lo que refleja un elemento evolutivo compartido relacionado con la regulación del comportamiento social. Los estudios descriptivos de distribución de neuronas inmunoreactivas para AVT en cerebros de anuros son escasos [18], [19], [20], [21]. A diferencia de lo que ocurre en peces teleósteos, en anuros la distribución de somas neuronales parece ser más extensa abarcando el APO y otras regiones como el núcleo accumbens y la amígdala, núcleo supraquiasmático, núcleo del trigémino, núcleo estría terminal, hipotálamo dorsal y ventral [30]. En el APO, tanto en cortes rostrales como caudales, se inmunoidentificaron neuronas AVT+. En *B. pulchella*, la distribución de las neuronas AVTérgicas y el tamaño de estas remeda la existencia de tres tipos de poblaciones neuronales que se describen en otros vertebrados, en particular en peces teleósteos, que son: parvocélulas, magnocélulas y gigantocélulas [17]. Por otra parte, la morfología de estas neuronas es acorde con lo descrito en otras especies de anuros. En *Xenopus laevis* se describen células AVT+ a nivel rostral del APO, estas fueron descritas como células pequeñas ubicadas dorsolateralmente al receso óptico [20]. En *Rana temporaria*, *Rana esculenta* y *Bufo bufo*, se reporta una predominancia de células AVT+ en el área ventral del APO [64]. En la especie en estudio las fibras AVT+ presentan un patrón característico de "cuentas de rosario" típico de nonapéptidos hipotalámicos descriptos en anuros y otros vertebrados [20], [21] [46].

Capítulo II

4-Poner a punto el protocolo conductual farmacológico para inyecciones de AVT en machos de *B. pulchella*.

Resultado logrado

El protocolo conductual farmacológico para inyecciones de AVT, antagonista y salino en machos de *B. pulchella* en contexto natural, quedó exitosamente optimizado. De forma randomizada se le adjudicó a cada macho el grupo experimental. Los datos fueron colectados y grabados de forma ciega por parte del experimentador.

El protocolo consistió en realizar registros de vocalizaciones de machos, pre-inyección con micrófono unidireccional por 5 minutos y luego registros post-inyección con micrófono conectado a grabadora durante 90 minutos. El protocolo se ajustó teniendo en cuenta la calidad de los registros acústicos. El setup de registro se logró que fuera de fácil y ágil implementación en el campo.

Realizamos la puesta a punto para el procesamiento de datos automático que fue validado manualmente y que permitió generar un código publicable para procesar el gran volumen de datos.

5-Describir el efecto del AVT sobre la emisión del canto de machos de *B. pulchella*.

Resultado logrado

En el primer año de proyecto realizamos ensayos farmacológicos en dos grupos experimentales: animales tratados (AVT) versus animales control (solución salina). En estos ensayos, no encontramos entre los grupos experimentales, diferencias significativas en la probabilidad de cantar ni en la dinámica temporal de la emisión de notas registradas o en parámetros espectrales.

6-Cuantificar el efecto de AVT sobre la emisión del canto de macho de *B. pulchella*.

Resultado logrado

En el segundo año agregamos un grupo experimental con antagonista de AVT (MC), en este caso los animales tratados con antagonista tienen menor probabilidad de cantar que los que reciben AVT ($P<0.001$). También los animales tratados con MC tienen menor probabilidad de cantar que los que reciben solución salina ($P<0.001$). Sin embargo, no se observa una diferencia significativa en la probabilidad de cantar entre animales tratados con AVT y aquellas tratadas con solución salina ($P=0.08$).

Sumado a esto, comenzamos el análisis de parámetros espectrales y encontramos que los animales tratados con MC tienden a reducir la frecuencia dominante en comparación con aquellos tratados con AVT ($p=0.06$). Al final del último año realizamos más experimentos para aumentar el número de animales en todos los grupos experimentales y actualmente estamos procesando los datos haciendo énfasis en el análisis de la variabilidad de emisión de las notas y en los parámetros espectrales de las mismas.

Discusión

En nuestro trabajo encontramos que los machos de *B. pulchella* tratados con antagonista de AVT (MC) aumentan la probabilidad de cantar respecto a los que reciben AVT o salino. Además, en los machos tratados con MC encontramos una tendencia a disminuir la frecuencia dominante respecto a los que recibieron AVT y a los que recibieron solución salina.

El AVT ha sido estudiado como modulador de la emisión de vocalizaciones en la conducta reproductiva en varias especies de anuros ([17], [29]), logrando el incremento de la frecuencia de emisión del canto o la producción de distintos tipos de vocalizaciones, lo que sugiere que el AVT puede estar involucrado en el aumento de la motivación para cantar luego de recibir el tratamiento ([30]-[36]). También estos trabajos evidencian cambios en las propiedades espectrales del registro de canto en algunas especies de anuros ([30]-[36]). Contrario a lo que se reporta en la literatura, no encontramos efecto de la administración exógena del AVT sobre la probabilidad cantar, y tampoco sobre los parámetros temporales y espectrales de vocalizaciones. A pesar de que la ausencia de efecto del AVT podría explicarse por la dosis empleada [30], en este trabajo se usó una dosis previamente reportada en la literatura que tiene en cuenta el peso y tamaño del animal ([30]-[36]). En anuros, hasta donde conocemos, se ha reportado que el antagonista de AVT tiene efecto en el comportamiento reproductivo en hembras [65], pero no se ha reportado su efecto sobre el comportamiento vocal ni sobre parámetros espectrales de las vocalizaciones. Nuestro trabajo es el primero en mostrar un efecto del antagonista de AVT sobre el comportamiento vocal, disminuyendo la probabilidad de cantar. Además, nuestros datos preliminares muestran que hay una tendencia del antagonista de AVT a disminuir la frecuencia dominante respecto a los machos tratados con AVT y salino. Como se ha documentado en anuros, la frecuencia dominante puede incrementarse o reducirse en algunas especies en relación con el tamaño corporal, el contexto acústico y la cercanía de un conespecífico activo vocalmente, como mecanismo para minimizar interferencias y diferenciarse acústicamente [28]. En nuestro caso, la modulación del antagonista de AVT podría estar vinculada a la competencia intrasexual, ya que esta frecuencia es un parámetro espectral que la hembra considera para la selección del macho durante el cortejo [28]. Por lo que la modulación de esta frecuencia puede, en última instancia, afectar la toma de decisión de la hembra.

Nuestros hallazgos indican que el sistema AVTérgico participa en la emisión y modulación espectral de vocalizaciones contribuyendo al conocimiento sobre el rol de los nonapéptidos hipotalámicos en la regulación de conductas reproductivas y su impacto en el comportamiento vocal de anuros en su contexto natural.

Conclusiones y recomendaciones

Las principales conclusiones para el capítulo I:

1) Por primera vez en la especie identificamos las siguientes áreas de la RCCS: el área preóptica (APO), la amígdala medial, el hipotálamo anterior y ventromedial, y el septum lateral. El APO, se localiza entre la comisura anterior y el quiasma óptico, abarca una extensión de aproximadamente 800 μm en el eje rostro-caudal.

2) Por primera vez en la especie inmunoidentificamos la presencia de neuronas AVTérgicas en el APO de machos vocalizadores de *B. pulchella*. En el APO encontramos somas con características que remedian a tres tipos celulares de acuerdo con el tamaño y distribución, parvocélulas, magnocélulas y gigantocélulas.

Las principales conclusiones para el capítulo II:

1) El antagonista de AVT tiene efecto sobre el comportamiento vocal de machos de *B. pulchella* en contexto natural, produciendo una menor probabilidad de cantar respecto a los grupos tratados con AVT y salino.

2) El antagonista de AVT muestra una tendencia a reducir la frecuencia basal de machos *B. pulchella* respecto a los que reciben AVT y

salino.

En suma, confirmamos la hipótesis planteada: el AVT se encuentra presente en neuronas de la RCCS, en particular el APO y modula la conducta reproductiva, teniendo un efecto sobre la emisión del canto en machos del anuro autóctono *Boana pulchella*.

Perspectivas

En relación con el capítulo I, continuaremos el procesamiento de muestras para completar el proceso de cuantificación relativo al número y tipo de neuronas AVTérgicas presentes en el APO. Nos interesa extender este estudio de descripción y cuantificación a otras áreas de la RCCS y RSM en machos de la especie.

Respecto al capítulo II, actualmente estamos profundizando en el procesamiento y análisis de datos farmacológicos en los grupos experimentales, con especial enfoque en dos aspectos: primero, evaluar el efecto de los tratamientos sobre la variabilidad de la emisión del canto, tomando como referencia los parámetros previamente descritos por nuestro laboratorio; segundo, realizar un análisis detallado de las propiedades espectrales, incluyendo la frecuencia dominante, máxima y mínima, así como la distribución de energía espectral, entre otros.

A largo plazo, nos interesa caracterizar los aspectos neuroanatómicos de los circuitos del canto en machos de la especie. Además, buscamos explorar la presencia de receptores AVTérgicos en regiones de la RCSS, con especial atención a los núcleos y áreas cerebrales que integran los circuitos del canto.

Contribuciones

Formación de recursos humanos

Estudiante de grado _Mikaela Cúparo: Validación manual de registros acústicos pasivos de *Boana pulchella*. Pasantía de investigación, Licenciatura en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay. 2023

Estudiante de grado _Clara Nieto Methol: Estudio de las bases neuroanatómicas del comportamiento social en un anuro autóctono, *Boana pulchella*. Informe, Licenciatura en Biología Humana, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay, 2025. Clara fue contratada como técnica en el proyecto trabajando en la realización de experimentos neuroanatómicos y farmacológicos. Esto le posibilitó poder realizar su tesis de grado y obtener el título de Licenciada en Biología Humana de la Facultad de Ciencias, Universidad de la República. 2025

Estudiante de posgrado _Clara Nieto Methol. Durante el desarrollo del proyecto Clara realizó experimentos neuroanatómicos y farmacológicos que le permitieron recabar datos para sus estudios de maestría en Ciencias Biológicas del PEDECIBA, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Ingreso al programa en 2025.

Publicaciones y comunicaciones a congresos nacionales, regionales e internacionales

-Estudio de las bases neuroanatómicas del comportamiento social en un anuro autóctono, *Boana pulchella*. Tesis de grado. Nieto Methol, C. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay. 2025 Disponible en <https://hdl.handle.net/20.500.12008/48327>

- Effects of vasotocin on the vocal behavior of the South American tree frog *Boana pulchella*. Nieto Methol C., Zornik E., Hoke K., Pouso P. Manuscrito en preparación

-Exploración de las bases nonapeptidérgicas del comportamiento reproductivo en un anuro sudamericano. Presentación en formato póster. Nieto, C., Pouso P. IV Reunión de Biología del Comportamiento del Cono Sur, Argentina, 2023.

-Bases nonapeptidérgicas del comportamiento reproductivo: estudio neuroanatómico. Presentación oral. Nieto, C. Jornadas anuales de la Unidad Académica de Histología y Embriología, Uruguay, 2023.

-Calling activity modulations in a south American treefrog: from physical factors to hypothalamic nonapeptides. Pouso P, Rodriguez-Santiago, M, Russi, E, Zornik, E, Hoke, K. Society for Behavioral Endocrinology Meeting, Francia, 2023.

-Caracterización neuroanatómica de áreas cerebrales vinculadas con el comportamiento reproductivo en un anuro autóctono. Presentación en formato póster. Nieto C, Pouso P. XX Jornadas de la Sociedad de Neurociencias del Uruguay, 2024.

-Implications of nonapeptides in the calling behavior of a South American treefrog. Presentación en formato póster. Pouso P, Cabana, A., Nieto, C., Zornik E, Hoke K. International congress of neuroethology, Alemania, 2024.

-Los anuros como animales de experimentación no convencionales: el caso de una rana arbórea sudamericana. Presentación oral por invitación. Pouso P. Simposio de expertos, XXVI Jornadas Anuales de la Sociedad Argentina de Biología, Argentina, 2024.

-Hypothalamic nonapeptides in the social behavior of electric fish and frogs. Pouso, P. Presentación oral por invitación. Ciclos seminarios internacionales, Institut of neuroscience, Paris-Saclay, Paris, Francia, 2024.

Actividades de divulgación científica

-Una visita al mundo anfibio: ranas y el cerebro. Recorrido por el laboratorio con interacción directa con investigadora. Día Mujer y Niña en la Ciencia, Laboratorio Paula Pouso, Unidad Académica de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay, 2023

-Qué nos dicen las ranas sobre el cerebro y el canto? Neurobiología del comportamiento reproductivo. Stand interactivo. Medicina Investiga, Feria de Ciencias, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay. 2023 2024

-Canto, cerebro y ranas. Neurobiología del comportamiento reproductivo. Semana del Cerebro, Espacio Modelo, Sociedad de Neurociencias del Uruguay, 2023

-Una visita al mundo anfibio I: el canto en las ranas. Actividad de taller realizada en Escuela rural número 73, Zanja del Tigre, Maldonado, Uruguay

-Una visita al mundo anfibio II: el canto y el cerebro de las ranas. Actividad de taller realizada en Escuela rural número 73, Zanja del Tigre, Maldonado, Uruguay

-Una visita al mundo II: Exhibición del cortometraje, La vida toda en un charco, Actividad en Escuela Rural número 73, Zanja del Tigre, Maldonado, Uruguay

Materiales audiovisuales creados para divulgación científica:

-"La vida toda en un charco", cortometraje de divulgación científica: que narra el trabajo de investigación que realizamos en el laboratorio Bases Neurales de la Comunicación Acústica en la Unidad Académica de Histología y Embriología de la Facultad de Medicina, Universidad de la República. Este corto fue financiado por este proyecto y la Universidad de la República. Realizador: Mateo de León Mac Key.

El cortometraje fue exhibido tanto en la Escuela Rural número 73, Zanja del Tigre, así como a vecinos del campo. El día 9 de mayo de 2025 fue presentado en la Sala Paulina Luisi de Biblioteca, Facultad de Medicina, Universidad de la República, y luego se realizó un conversatorio moderado por la periodista científica Alexandra Perrone, en el que participaron, Mateo de León Mac Key y Paula Pouso.

Cortometraje disponible en:

<https://www.youtube.com/watch?v=Fri7g71CA-4>

Promoción y Desarrollo profesional

Uno de los mayores impactos del proyecto fue la creación del Laboratorio Bases Neurales del Comunicación Acústica, en la Unidad Académica de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Permitiendo adquirir el equipamiento tecnológico básico y fungibles para el trabajo de laboratorio y de campo. Por otra parte, se generó las plataformas de comunicación del laboratorio en redes sociales (@labpouso), canal de youtube (Lab Pouso) y web del laboratorio (<https://sites.google.com/view/lab-pouso/>).

Productos derivados del proyecto

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Artículo científico	Effects of vasotocin on the vocal behavior of the South American tree frog <i>Boana pulchella</i>	Nieto Methol C., Zornik E., Hoke K., Pouso P.			En proceso
Videograbación	La vida toda en un charco	Mateo de León Mac Key	https://www.youtube.com/watch?v=Fri7g71CA-4		Finalizado
Otro	Exploración de las bases nonapeptidérgicas del comportamiento reproductivo en un anuro sudamericano.	Clara Nieto Methol, Paula Pouso	Poster IV Reunión de Biología del Comportamiento del Cono Sur, Argentina, 2023.	https://hdl.handle.net/20.500.12008/50527	Finalizado
Otro	Bases nonapeptidérgicas del comportamiento reproductivo: estudio neuroanatómico	Clara Nieto Methol, Paula Pouso	Presentación oral. Jornadas anuales de la Unidad Académica de Histología y Embriología, Uruguay, 2023.		Finalizado
Otro	Calling activity modulations in a south American treefrog: from physical factors to nonapeptides	Pouso P., Rodriguez- Santiago, M, Russi, E, Zornik, E, Hoke, K.	Poster. Society for Behavioral Endocrinology Meeting, Francia, 2023.	https://hdl.handle.net/20.500.12008/50517	Finalizado
Otro	Caracterización neuroanatómica de áreas cerebrales vinculadas con el comportamiento reproductivo en un anuro autóctono	Nieto C., Pouso P.	Póster. Jornadas de la Sociedad de Neurociencias del Uruguay, 2024.	https://hdl.handle.net/20.500.12008/50518	Finalizado

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Otro	Implications of nonapeptides in the calling behavior of a South American treefrog.	Pouso P, Cabana, A., Nieto, C., Zornik E, Hoke K.	Póster. International congress of neuroethology, Alemania, 2024.	https://hdl.handle.net/20.500.12008/50530	Finalizado
Otro	Los anuros como animales de experimentación no convencionales: el caso de una rana arbórea sudamericana.	Pouso P.	Presentación oral por invitación. Simposio de expertos, XXVI Jornadas Anuales de la Sociedad Argentina de Biología, Argentina, 2024.	https://hdl.handle.net/20.500.12008/50529	Finalizado
Otro	Hypothalamic nonapeptides in the social behavior of electric fish and frogs.	Pouso, P	Presentación oral por invitación. Ciclos seminarios internacionales, Institut of neuroscience, Paris-Saclay, Paris, Francia, 2024.		Finalizado
Tesis de grado/monografías	Estudio de las bases neuroanatómicas del comportamiento social en un anuro autóctono, <i>Boana pulchella</i>	Nieto, C., Pouso P		https://hdl.handle.net/20.500.12008/48327	Finalizado
Tesis de maestría	Exploración del rol de los nonapéptidos hipotalámicos en la conducta reproductiva de un anuro autóctono, <i>Boana pulchella</i>	Nieto C, Pouso P.			En proceso

Referencias bibliográficas

- [1] L. J. Young, J. T. Winslow, R. Nilsen, y T. R. Insel, Behav. Neurosci., vol. 111, n.o 3, pp. 599-605, 1997.
- [2] J. L. Goodson, Horm. Behav., vol. 34, n.o 1, pp. 67-77, 1998.
- [3] J. L. Goodson, Gen. Comp. Endocrinol., vol. 111, n.o 2, pp. 233-244, 1998.
- [4] A. K. Dewan, K. P. Maruska, , T. C. Tricas, J. Neuroendocrinol., vol. 20, n.o 12, pp. 1382-1394, 2008.
- [5] R. Hari, M. V. Kujala, Physiol. Rev., vol. 89, n.o 2, pp. 453-479, 2009.

- [6] L. A. O'Connell, H. A. Hofmann, J. Comp. Neurol., vol. 519, n.o 18, pp. 3599-3639, 2011.
- [7] S. W. Newman, Ann. N. Y. Acad. Sci., vol. 877, pp. 242-257, 1999.
- [8] J. L. Goodson, Horm. Behav., vol. 48, n.o 1, pp. 11-22, 2005.
- [9] A. B. Butler, W. Hodos, Comparative vertebrate neuroanatomy: evolution and adaptation. John Wiley & Sons, 2005.
- [10] D. J. Albert, M. L. Walsh, B. B. Gorzalka, S. Mendelson, C. Zalys, Physiol. Behav., vol. 38, n.o 2, pp. 169-173, 1986.
- [11] Gore, C, Fundamental neuroscience, 2008.
- [12] K. L. Hoke, M. J. Ryan, W. Wilczynski, Proc. R. Soc. B Biol. Sci., vol. 274, n.o 1610, pp. 641-649, 2007.
- [13] L. M. Almli, W. Wilczynski, Brain. Behav. Evol., vol. 74, n.o 2, pp. 143-154, 2009
- [14] J. L. Goodson, Progress in Brain Research, vol. 170, Elsevier, 2008, pp. 3-15.
- [15] C. H. Hoyle, Brain Res., vol. 848, n.o 1-2, pp. 1-25, 1999.
- [16] J. L. Goodson, M. A. Kingsbury, Horm. Behav., vol. 64, n.o 1, pp. 103-112, 2013.
- [17] J. L. Goodson, A. H. Bass, Brain Res. Brain Res. Rev., vol. 35, n. 3, pp. 246-265, 2001.
- [18] W. B. Mathieson, Histochem. Cell Biol., vol. 105, n.o 4, pp. 305-318, 1996.
- [19] C. A. Lowry, C. F. Richardson, T. R. Zoeller, L. J. Miller, L. E. Muske, , F. L. Moore, J. Comp. Neurol., vol. 385, n. 1, pp. 43-70, 1997.
- [20] A. González, W. J. Smeets, J. Comp. Neurol., vol. 315, n.o 1, pp. 53-73, 1992.
- [21] A. González, W. J. Smeets, J. Chem. Neuroanat., vol. 5, n.o 6, pp. 465-479, 1992.
- [22] W. J. A. J. Smeets,A. González, Microsc. Res. Tech., vol. 54, n.o 3, pp. 125-136, 2001.
- [23] E. K. Balon, J. Fish. Board Can., vol. 32, n.o 6, pp. 821-864, 1975.
- [24] N. R. Liley,N. E. Stacey, en Fish physiology, vol. 9, Elsevier, 1983, pp. 1-63.
- [25] D. B. Kelley, Brenowitz, E, en Behavioral endocrinology, 2002.
- [26] [C. A. Marler, S. K. Boyd, W. Wilczynski, Horm. Behav., vol. 36, n.o 1, pp. 53-61, 1999.
- [27] B. C. Trainor, K. L. Rouse, y C. A. Marler, Brain. Behav. Evol., vol. 61, 4, pp. 165-171, 2003.
- [28] D. B. Kelley, Brenowitz, E. Behavioral Endocrinology, 2002.
- [29] A. Yamaguchi, D.B. Kelley. "Hormonal Mechanisms in Acoustic Communication". En: Acoustic Communication, vol 16. Springer, 2003.
- [30] S. K. Boyd. "Vasotocin modulation of social behaviors in amphibians". En Oxytocin, Vasopressin and Related Peptides in the Regulation of Behavior. Cambridge Press, 2012.
- [31] J. Chu, C.A. Marler, W. Wilczynski. Horm. Behav. 34, 248-261, 1998.
- [32] K.E. Klomberg, C..A., Marler. Anim. Behav. 59, 807-812, 2000.
- [33] G.R. Ten Eyck. Horm. Behav. 47, 223-229, 2005.
- [34] S. Burmeister, C. Somes, W. Wilczynski, W.. Gen. Comp. Endocrinol. 122, 189-197, 2001.
- [35] N.M. Kime, T.K. Whitney, E.S. Davis ,C. A. Marler. Brain Behav. Evol. 69, 254-265, 2007.
- [36] N. Clapp., M. Reichert.,Journal.Comp. Physiol. B vol. 192, pp.115-125, 2022
- [37] R. Maneyro ,S. Carreira, Guía de Anfibios del Uruguay. Montevideo: Ediciones de la Fuga, 2012.
- [38] A. Canavero, O., Arim, Matías, Naya, Daniel, Camargo, Arley, Da Rosa, Inés, Maneyro, Raúl, North-West. J. Zool., vol. 4, 1, 2008
- [39] L. Ziegler, M. Arim, P. M. Narins, Behav. Ecol., vol. 22, 3, pp. 520-526, 2011.
- [40] L. Ziegler, Maestría, UdeLaR, PEDECIBA, 2009.
- [41] D. B. Kelley, Curr. Opin. Neurobiol., vol. 14, 6, pp. 751-757, 2004.
- [42] W. Wilczynski, M. Quispe, M. I. Muñoz, M. Penna, Front. Endocrinol., vol. 8, 2017.
- [43] A. Kwet, L. Aquino, E. Lavilla, I. di Tada, «*Hypsiboas pulchellus*. IUCN Red List of Threatened Species 2004. », Boana pulchella, 2004.
- [44] M. Rodriguez-Santiago, E. Russi, E. Zornik, P. PPouso,K. Hoke. «Call activity, temperatura and light intensity in males chorus of a South american anuran », SICB, Annual Meeting, 2022.
- [45] M. Godoy, P. Pouso. «Bases neuroanatómicas del comportamiento reproductivo en un anuro autóctono» II Congreso Uruguayo de Biociencias, 2019.
- [46] P. Pouso, M. Radmilovich, y A. Silva, Tissue Cell, vol. 49, 2, pp. 257-269, 2017.
- [47] P. Pouso, Á. Cabana, A. C. Silva, Vasotocin is involved in the establishment of dominance in a fish model of non-breeding territorial aggression». Preparación.
- [48] P. Pouso, Á. Cabana, J. L. Goodson, y A. Silva, Front. Integr. Neurosci., vol. 13, 2019.
- [49] P. Pouso, L. Quintana, G. C. López, G. M. Somoza, A. C. Silva, y V. L. Trudeau, Gen. Comp. Endocrinol., vol. 222, pp. 158-166, 2015.
- [50] P. Pouso, R. Perrone, R. y A. Silva. Gen. Comp. Endocrinol, 313, 2021.
- [51] P. Pouso. Tesis doctoral. UdeLaR, PEDECIBA, 2017.
- [52] K. L. Hoke, M. J. Ryan, W. Wilczynski, Proc. R. Soc. B Biol. Sci., vol. 274, 1610, pp. 641-649, 2007.
- [53] K. L. Hoke, M. J. Ryan, W. Wilczynski, Proc. Natl. Acad. Sci., vol. 102, 30, pp. 10712-10717, 2005.
- [54] E. Zornik, D. B. Kelley, en Hormones, Brain and Behavior (Third Edition), Academic Press, 2017, pp. 131-144.
- [55] R. Maneyro , G. Francescoli, Boletín Sociedad Zoológica del Uruguay, v.: 28 2 , p.:79 - 89, 2019
- [56] R. Maneyro. Experimentación con animales no tradicionales en Uruguay, 2019.
- [57] L. Ziegler, A. Canavero, Experimentación con animales no tradicionales en Uruguay, 2019

- [58] P. Pouso, Á. Cabana. «Call activity, temperature and light intensity in a males chorus of a South American anuran » ABS. Conf. 2022.
- [59] C. Nieto Methol. Estudio de las bases neuroanatómicas del comportamiento social en un anuro autóctono, *Boana pulchella*. Tesis de grado. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay. 2025. Disponible en <https://hdl.handle.net/20.500.12008/48327>.
- [60] A.S. Manzano, A. Herrel, A.C. Fabre, V. Abdala. *J Anat.* 2017;231(1):38–58. doi: 10.1111/joa.12613.
- [61] H. Endepols, F. Helmbold, W. Walkowiak. *Brain Res.* 2007; 1138:76–85. doi: 10.1016/j.brainres.2006.12.088.
- [62] H.J. Ten Donkelaar. Chapter 19. Anurans. In: R. Nieuwenhuys, H.J. Ten Donkelaar, C. Nicholson (Eds.), *The Central Nervous System of Vertebrates*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, 1998, pp. 1151–1314.
- [63] D.M. Portik, J.W. Streicher, J.J. Wiens. *Mol Phylogenet Evol.* 2023; 188:107907. doi: 10.1016/j.ympev.2023.107907.
- [64] F. Vandesande, K. Dierickx. *Cell Tissue Res.* 1976; 175:289–296. doi: 10.1007/BF00218707.
- [65] S.K. Boyd. *J Comp Physiol A.* 2019; 205:505–513. doi: 10.1007/s00359-019-01340-6.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)

