



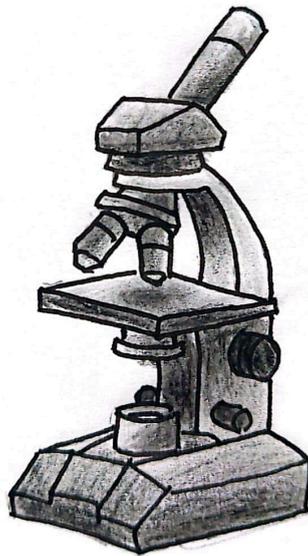
UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Unidad Académica de
Histología y Embriología

Universidad de la República
Licenciatura en Biología Humana
Informe de pasantía de grado

“Estudio de las bases neuroanatómicas del comportamiento social en un anuro autóctono, *Boana pulchella*”



Estudiante: Clara Nieto Methol
Tutora/Orientadora: Dra. Paula Pouso

Lugar de realización: Unidad Académica de Histología y Embriología, Facultad de Medicina,
UdelAR

Lista abreviaturas

Apl	Amygdala pars lateralis
Apm	Amygdala pars medialis
APO	Área preóptica
AVP	Vasopresina
AVT	Vasotocina
Bncp	Bed nucleus of the pallial commissure
BNST	Núcleo de la estría terminal
BON	Nucleus of the basal optic root
C	Nucleus centralis thalami
CA	Comisura anterior
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DH	Nucleus hypothalamic dorsalis
Dp	Pallium dorsal
Ea	Nucleus entopeduncularis anterior
Ep	Nucleus entopeduncularis posterior
Estc	Estriado caudal
Estd	Estriado dorsal
Hbd	Nucleus habenularis dorsalis
Hbv	Nucleus habenularis ventralis
La	Nucleus lateralis thalami, división anterior
lfb	Lateral forebrain bundle
Lp	Pallium lateral
Lpv	Nucleus lateralis thalami, división posteroventral
Ls	Núcleo septal lateral
mfb	Medial forebrain bundle
Mg	Nucleus preopticus magnocellularis

Mp	Pallium medial
Ms	medial septal nucleus (Núcleo septal medial)
MST	Mesotocina
NAcc	Núcleo accumbens
NB	Nucleus of Bellonci
NPv	Nucleus of the periventricular organ
optl	Tractus opticus lateralis
OXT	Oxitocina
P	Nucleus posterior thalami
PB	Phosphate buffer
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehído
QO	Quiasma óptico
RCCS	Red cerebral del comportamiento social
rpr	Receso preóptico
RTD	Red toma de decisiones
SRM	Sistema de recompensa mesolímbico
tm	Tectum mesencephali
TP	Tuberculum posterius
tth	Tectothalamic tract
VL	Nucleus ventrolateralis thalami
vl	Ventrículo lateral (ventriculus lateralis)
VM	Nucleus ventromedialis thalami
VMH	Hipotálamo ventromedial
vt	Tercer ventrículo (Ventriculus tertius)
VTA	Área tegmental ventral

Índice

Resumen.....	5
Introducción y Antecedentes.....	6
Red Cerebral del Comportamiento Social y Sistema de Recompensa Mesolímbico.....	6
Nonapéptidos hipotalámicos.....	10
Bases neurales del comportamiento social en un anuro autóctono: <i>Boana pulchella</i>	14
Objetivos.....	17
Objetivo general.....	17
Objetivos Específicos.....	17
Métodos.....	17
1. Animales.....	17
2. Histología.....	18
3. Inmunohistoquímica.....	19
4. Adquisición de imágenes.....	19
5. Dificultades.....	20
Resultados.....	22
Identificación y caracterización de áreas de la RCCS: APO, NAcc y VMH, en machos vocalizadores de <i>B. pulchella</i>	23
Puesta a punto de la técnica de la técnica inmunohistoquímica para identificar AVT.....	26
Inmunodetección de AVT en APO y NAcc en machos vocalizadores de <i>B. pulchella</i>	27
Discusión.....	30
Áreas de la RCCS y SRM: conservación neuroanatómica y funcional.....	30
Puesta a punto de la técnica de Inmunohistoquímica de AVT en <i>Boana pulchella</i>	33
Distribución de AVT en áreas involucradas en la RCCS y SRM.....	34
Conclusiones.....	37
Perspectivas.....	38
Contribuciones.....	40
Bibliografía.....	41

Resumen

Entendemos al comportamiento social como aquella acción dirigida hacia o en respuesta a un co-especímen. En humanos y otros vertebrados, la red cerebral del comportamiento social (RCCS) es una red de estructuras que se activa durante el comportamiento social. La RCCS forma, junto con el sistema de recompensa mesolímbico (SRM), la red de toma de decisiones (RTD). Diversas áreas y estructuras forman parte de la RTD como son el área preóptica (APO), el núcleo accumbens (NAcc) y el hipotálamo ventromedial (VMH). En humanos, los nonapéptidos hipotalámicos (vasopresina (AVP)/oxitocina (OXT)) regulan diversos comportamientos sociales y son producidos en los núcleos supraóptico y paraventricular. La AVP es homóloga a la vasotocina (AVT), presente en anfibios, y su estructura es altamente conservada. Los anfibios anuros son reconocidos modelos para estudiar las bases neurobiológicas del comportamiento, ya que a través de su actividad vocal podemos explorar cambios en el sistema nervioso. En anuros, la AVT modula el comportamiento social y la actividad vocal; y es producida por núcleos de la RTD homólogos a los presentes en humanos.

Boana pulchella es un anuro autóctono que durante la época reproductiva presenta un comportamiento social, que se manifiesta en la actividad vocal flexible de los machos para atraer a las hembras. En esta especie no hay reportes que describan su neuroanatomía y en particular la RCCS; y tampoco sobre la distribución de neuronas AVTérgicas en el APO y NAcc. Trabajamos en machos vocalizadores de *B. pulchella* con los siguientes objetivos: a) Identificar áreas involucradas en la RCCS (APO, NAcc y VMH); b) describir las características neuroanatómicas de NAcc, APO y VMH c) realizar la puesta a punto de la técnica de inmunohistoquímica para AVT; d) identificar mediante inmunohistoquímica los somas y prolongaciones neuronales que contienen AVT en APO y NAcc. Para esto realizamos colecta de animales, técnicas histológicas e inmunohistoquímicas y microscopía confocal. Los cortes seriados en orientación transversal y en sentido rostro-caudal se distribuyeron en dos series de manera alterna: una fue teñida con azul de toluidina (AT) y la otra se trató con inmunohistoquímica contra AVT. Se obtuvieron imágenes, a diversos aumentos, de cortes (APO, NAcc, y VMH) teñidos con AT y de cortes (APO, NAcc) inmunoreactivos para AVT. Los resultados mostraron que el APO está ubicado entre la comisura anterior y el quiasma óptico, con una extensión de 800 μm en dirección rostro-caudal. Se inmunoidentificó la presencia de fibras y somas AVT+ tanto en cortes rostrales como caudales. El NAcc fue identificado en el tercio rostral de la pared ventromedial del telencéfalo, rodeando el vértice inferior del ventrículo. El NAcc se extiende aproximadamente 840 μm en sentido rostro-caudal. Se inmunoidentificaron fibras AVT+. El VMH fue localizado en un sector más caudal con respecto a las áreas ya mencionadas con una extensión de 360 μm en el eje rostro-caudal.

Este trabajo abona al conocimiento de las bases neuroanatómicas y neuroendócrinas del comportamiento social en vertebrados.

Introducción y Antecedentes

La conducta social puede ser definida como aquella acción dirigida hacia o en respuesta a un co-especímen (Wersinger et al, 2009), más específicamente, el comportamiento social refiere a las interacciones de los individuos de una misma especie, el objetivo de estas interacciones es obtener algún tipo de beneficio como territorio, alimento o pareja (Tinbergen, 1964; Nelson, 2006; Blumstein et al., 2010). Las especies pueden clasificarse en distintos grados de asociación según su tendencia a relacionarse con otros individuos y a formar grupos sociales. Es así que las especies pueden ser solitarias, gregarias o sociales. Las especies solitarias realizan todas sus actividades de manera solitaria. Las especies gregarias, en cambio, forman grupos sociales altamente inestables siguiendo las reglas de costo/beneficio. Por último, las especies sociales son sociales para todas sus interacciones y siguen una serie de reglas complejas (Lee, 1994).

El foco principal de este proyecto será dentro del marco del comportamiento reproductivo, entendemos al mismo como el conjunto de comportamientos y acciones que los organismos llevan a cabo para asegurar la reproducción y el éxito en la transmisión de sus genes a la siguiente generación. Estas interacciones presentan un extenso repertorio además de la liberación de gametos, este repertorio abarca secuencias complejas como la defensa territorial, preparación de nido, formación de pareja y protección de la cría (Balon, 1975). Se reconocen tres etapas en el comportamiento reproductivo en especies con fecundación externa: cortejo, desove, y cuidado parental.

Red Cerebral del Comportamiento Social y Sistema de Recompensa Mesolímbico

En humanos y otros mamíferos, diversas áreas del cerebro están vinculadas con el comportamiento social y sus aspectos motivacionales (Galizia & Lledo, 2013). Estas áreas se agrupan en la red cerebral del comportamiento social (RCCS) (Newman, 1999) y el sistema de recompensa mesolímbico (SRM). La RCCS está compuesta por áreas del cerebro anterior, dentro de las cuales se destaca la amígdala medial, el área preóptica, el hipotálamo anterior y ventromedial, y el septum lateral (O'Connell & Hofmann, 2011). En la figura 1 se ilustran las conexiones entre las distintas áreas que conforman la RCCS y el SRM, las cuales se superponen para formar la red de toma de decisiones (RTD). Todas estas áreas están conectadas de manera recíproca y son indispensables para la expresión de comportamientos básicos sociales (Goodson, 2005). El SRM se compone de diferentes estructuras, incluyendo el núcleo accumbens (NAcc), el cuerpo estriado, el hipocampo, el pallium ventral y la amígdala basolateral. La RCCS y SRM están conectados en lo que se denomina la red de toma de decisiones (RTD) (O'Connell & Hofmann, 2011). La RTD desempeña un papel crucial en la mediación de la motivación y el refuerzo de estímulos gratificantes naturales, como la búsqueda de pareja sexual y la conducta alimentaria. Es un componente central en la regulación de la respuesta motivacional y reforzadora ante estos estímulos, influyendo en nuestra conducta y en la búsqueda de recompensas (Kalivas & Volkow, 2005). En este trabajo nos enfocaremos en el área preóptica (APO) y el hipotálamo ventromedial (VMH) del RCCS y el NAcc del SRM.

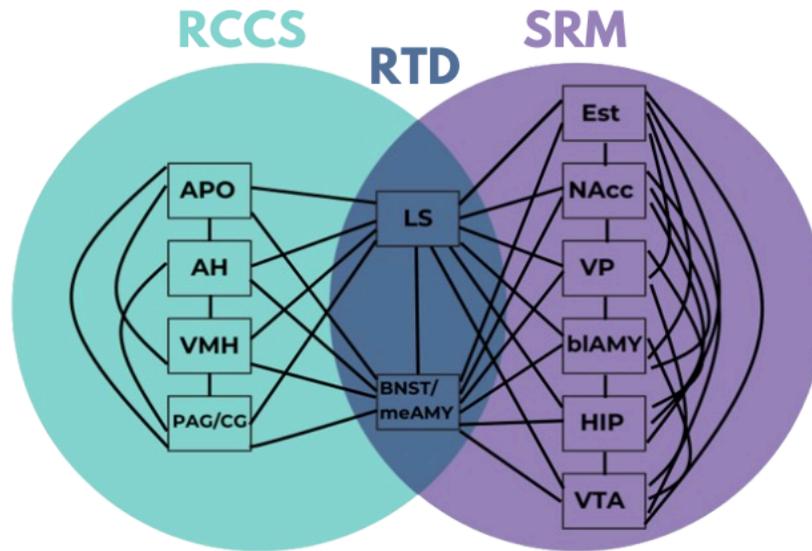


Figura 1. Tomado y adaptado de O'Connell & Hofmann, 2011. Se muestran las conexiones entre las distintas áreas que forman parte de la red cerebral del comportamiento social (RCCS) y el sistema de recompensa mesolímbico (SRM). Estos se superponen formando la red de toma de decisiones (RTD). AH, hipotálamo anterior; bIAMY, amígdala basolateral; BNST/meAMY, núcleo de la estría terminal / amígdala medial; HIP, hipocampo; LS, septum lateral; NAcc, núcleo accumbens; PAG/CG, sustancia gris periacueductal/sustancia gris central; APO, área preóptica; Est, cuerpo estriado; VMH, hipotálamo ventromedial; VP, pallium ventral; VTA, área tegmental ventral.

El APO, situado en el hipotálamo rostral e inmediatamente rostral al quiasma óptico, está implicado en el comportamiento parental, reproductivo y agresivo (Albert et al, 1986; Gore, 2008). El APO es un área homóloga en anuros y peces teleosteos además de ser una de las regiones del SNC que se encuentra presente en todos los vertebrados (Butler & Hodos, 2005). Como se mencionó, el APO se encuentra involucrado en diversas funciones en los distintos grupos de vertebrados. Presenta un rol en la regulación del comportamiento sexual, la agresión, el cuidado parental y la integración de las distintas señales sociales (O'Connell & Hofmann, 2011). En mamíferos la estimulación del APO aumenta la conducta sexual (van Dis & Larsson, 1970; Malsbury, 1971), y existen estudios donde lesiones en el APO perjudicaron la eyaculación tanto en roedores como en monos (Sлимп et al., 1978; Powers et al., 1987). En anfibios el APO también regula el comportamiento reproductivo. Lesiones en el APO del anuro *Rana pipiens* disminuyeron el número de llamadas emitidas por los machos (Wada & Gorbman, 1977).

Uno de los tipos neuronales predominantes en el APO son las neuronas GABAérgicas, estas neuronas promueven el sueño e inhiben la excitación, contribuyendo a la regulación de los ciclos de sueño-vigilia (Brown & Mckenna, 2015). Además, el APO contiene neuronas glutamatérgicas, que están involucradas en la señalización excitatoria y han sido implicadas en diversas respuestas conductuales, incluido el comportamiento maternal (Tsuneoka et al., 2013).

En el APO de mamíferos también se encuentran diversos neuropéptidos en los distintos grupos de vertebrados. En el APO mamíferos se ha reportado la presencia de oxitocina (OXT) y vasopresina (AVP) vinculada a comportamientos sociales como la agresión y el comportamiento parental. Tanto en anfibios como en reptiles se ha reportado AVT en el APO. En el anuro *Pelophylax esculentus* el APO ha sido identificado como una región clave para la expresión de neuropéptidos y hormonas que influyen el comportamiento reproductivo (Pinelli et al., 2014).

En varias especies de vertebrados el NAcc desempeña un papel crucial en la mediación de comportamientos relacionados con la recompensa, la motivación y la regulación emocional. En mamíferos el NAcc es una de las estructuras basales de la porción anterior del encéfalo, ubicado rostral al APO. Este núcleo se encuentra asociado a la modulación de respuestas conductuales frente a estímulos gratificantes y motivacionales, i.e., recompensas como son la búsqueda de pareja sexual en el cortejo (O'Connell & Hofmann, 2011). En anuros el NAcc se encuentra en la pared telencefálica rostral. Comparte una gran cantidad de características, tanto a nivel funcional o químico como estructural, con mamíferos (O'Connell & Hofmann, 2011). Al igual que en mamíferos, el NAcc en anuros recibe aferencias del pallium ventral (Marin et al., 1997a, 1998a). El pallium ventral es una región de procesamiento auditivo en anuros (Mangiamele et al., 2008). Otra conexión que nos revela la importancia del NAcc en anuros es su conexión con la amígdala, lo que nos vuelve a indicar la posibilidad de un rol en la regulación de respuestas emocionales y comportamientos motivacionales (Freudenmacher et al., 2019). La amígdala, que está involucrada en el procesamiento de emociones, envía proyecciones al NAcc, lo que sugiere que este núcleo puede integrar información emocional y motivacional para guiar el comportamiento (Freudenmacher et al., 2019). Asimismo, el NAcc también se conecta con el sistema límbico, lo que refuerza su papel en la mediación de la conducta relacionada con la recompensa y la emoción (Loonen & Ivanova, 2015).

El NAcc está intrínsecamente ligado al comportamiento social humano. Un estudio investigó cómo responde el NAcc a las ganancias en reputación, tanto propias como de otros, y cómo esta respuesta predice el uso de las redes sociales. Se encontró que las diferencias individuales en la actividad del NAc estaban asociadas con la motivación para interactuar en redes sociales, lo que sugiere que el NAc desempeña un papel en el procesamiento de recompensas relacionadas con la reputación social (Meshi et al., 2013). Este estudio destaca la participación del NAcc en comportamientos sociales influenciados por recompensas sociales percibidas. También se ha demostrado que, en humanos, la actividad en el NAcc aumenta durante la anticipación de recompensas, lo cual es crucial para comprender cómo se procesan las recompensas sociales en el cerebro (Cohen et al., 2011). Mediante fMRI se ha demostrado que en humanos alteraciones en la actividad del NAc estaban asociadas con mejoras en el estado de ánimo y el afecto, lo que sugiere que el NAc está involucrado en los aspectos emocionales de las interacciones sociales y el bienestar general (Heller et al., 2013). La conservación de estas funciones en diferentes especies sugiere que el NAcc es fundamental para la adaptación conductual y la supervivencia en vertebrados.

En el NAcc podemos encontrar diversos tipos de neuronas que utilizan distintos neurotransmisores. El tipo neuronal predominante en el NAcc son las neuronas GABAérgicas de

proyección (MSN), estas constituyen las neuronas de salida del NAcc (Sazdanovic et al., 2016; Gangarossa et al., 2013). Estas neuronas se caracterizan por presentar largas espinas dendríticas y desempeñan un papel crucial en el procesamiento de la información relacionada con la recompensa y en la mediación de los efectos de sustancias adictivas (Sazdanovic et al., 2016; Gangarossa et al., 2013).

El NAcc también presenta interneuronas de tipo GABAérgicos y colinérgico responsables de modular la actividad de las neuronas GABAérgicas de proyección. Las interneuronas GABAérgicas regulan la salida inhibitoria de las neuronas GABAérgicas de proyección. Las interneuronas colinérgicas se encargan de regular la modulación de la señal dopaminérgica dentro del NAcc, en particular en respuesta a la recompensa (Trecki et al., 2010). Además, el NAcc recibe entradas excitatorias por parte de neuronas glutamatérgicas que se originan de regiones como el VTA, área involucrada en el sistema de recompensa mesolímbico (Beaudry et al., 2003).

La dopamina es un neurotransmisor clave involucrado en la vía de recompensa. Las neuronas dopaminérgicas presentan un rol de gran importancia en las funciones del NAcc. Estas neuronas se originan principalmente en el VTA y proyectan hacia el NAcc, donde liberan dopamina. (Calipari et al., 2017; Corre et al., 2018). El NAcc contiene poblaciones de neuronas que expresan diferentes receptores de dopamina, específicamente los receptores D1 y D2, los cuales están involucrados de manera diferencial en la modulación de la actividad de las neuronas GABAérgicas de proyección (Al-Muhtasib et al., 2018; Fauchey et al., 2000). Se ha documentado la presencia de nonapéptidos hipotalámicos en el NAcc de vertebrados, incluyendo diversas especies de anuros (Wilczynski et al., 2017, Gonzalez & Smeets, 1992; Goodson & Bass, 2001).

El hipotálamo ventromedial (VMH) en mamíferos se encuentra ubicado en la región caudal del hipotálamo. El mismo presenta receptores de hormonas esteroideas sexuales y se destaca su conexión con la amígdala así como con otras regiones del hipotálamo. Una de sus funciones más estudiadas es su papel central en la regulación de la receptividad femenina. En anfibios el VMH presenta una organización similar a la encontrada en mamíferos. No hemos encontrado estudios sobre el rol VMH en la receptividad femenina en otras especies de anuros pero en otras especie de anfibios, como las salamandras, se ha observado un aumento en la actividad neuronal medido por un gen marcador de actividad neuronal c-fos en el VMH al ser expuestas a feromonas masculinas, lo que sugiere la implicación de esta área en la receptividad femenina en una clase de anfibios (Laberge, 2008; O'Connell & Hofmann, 2011).

El VMH es una estructura clave en la regulación de diversos procesos fisiológicos, incluyendo funciones reproductivas, ya que se ha reportado la presencia de receptores de estrógenos y andrógenos en el VMH (Rhen & Crews, 2001). El VMH se encuentra también vinculado a la respuesta al estrés, lo cual puede influenciar la conducta reproductiva (Gourine et al., 2012). Presenta un rol en la agresión y en diversos comportamientos sociales. Estudios han identificado poblaciones neuronales dentro del VMH que son activadas durante los encuentros agresivos y de apareamiento, especialmente en machos (Viskaitis et al., 2017; Lee et al., 2014). Los comportamientos reproductivos son otro aspecto crítico de la función del VMH. Tradicionalmente, el VMH se asocia con la activación de los comportamientos sexuales femeninos, como la lordosis

(Flanagan-Cato, 2011). Sin embargo, también está involucrado en los comportamientos reproductivos masculinos, lo que indica que el VMH desempeña un papel en el circuito límbico que regula las funciones reproductivas tanto en machos como en hembras (Cohen & Wade, 2012; Lin et al., 2011).

Existen neuronas dopaminérgicas que se proyectan desde el VTA hacia el VMH. Esta entrada dopaminérgica se encuentra vinculada a la integración motivacional de las señales vinculadas a la conducta alimentaria (Folgueira et al., 2019). Como se señaló en la introducción, el VMH es parte del SRM, sistema rico en fibras dopaminérgicas. Se ha registrado que la liberación de dopamina en el VMH puede afectar aspectos motivacionales vinculados a la alimentación (Volkow et al., 2011; Pandit et al., 2016). Además, se han encontrado receptores dopaminérgicos en el VMH, en particular D2 (Kim et al. 2010).

Por otra lado, el VMH contiene poblaciones de neuronas glutamatérgicas, que son principalmente excitatorias y juegan un papel en la mediación de la respuesta del VMH a diversos estímulos (Yamamoto et al., 2018). La presencia de neuronas GABAérgicas, aunque menos prevalente, contribuye al control inhibitorio dentro del VMH (Yamamoto et al., 2018; Rahy et al., 2022). La identificación de estos tipos neuronales podría ser una estrategia para ubicar la localización más exacta del VMH, especialmente teniendo en cuenta la falta de bibliografía sobre repere anatómicos para situar al mismo en el cerebro de anuros y la falta de información sobre otros tipos neuronas y neurotransmisores presentes en el área.

Se encontró escasa bibliografía sobre el rol y la presencia de nonapéptidos hipotalámicos en el VMH. Se ha identificado la existencia de la expresión del gen de la AVP en el VMH en roedores, tanto machos como hembras, especialmente en el contexto del comportamiento materno (Wang et al., 2000). También se ha identificado la presencia de receptores V1a de AVP en el VMH (Young et al., 2000). La presencia de estos receptores sugiere que la AVP podría actuar dentro del VMH para influir en los comportamientos sociales y agresivos, particularmente en respuesta a estímulos sociales (Young et al., 2000).

Nonapéptidos hipotalámicos

Los nonapeptidos, pertenecientes a la superfamilia de los neuropéptidos, están encargados de la modulación de las conductas sociales en numerosas especies de vertebrados, incluidos los humanos, evidenciando así una alta conservación evolutiva en su estructura y función (Goodson 2008; Hoyle, 1999). Los nonapéptidos, denominados así debido a su estructura de 9 aminoácidos, incluyen la vasopresina (AVP) y la oxitocina en mamíferos, y la vasotocina (AVT), la isotocina y mesotocina en vertebrados no mamíferos (Hoyle, 1999; Goodson, 2008).

Como se mencionó previamente los nonapéptidos se encuentran en todas las clases de vertebrados. Las especies suelen tener dos tipos de nonapeptidos hipotalámicos, y estos presentan una gran estabilidad dentro de una misma clase de vertebrados, además de encontrarse extremadamente conservados evolutivamente (Acher, 1974). Podemos dividir a los vertebrados en cuatro grupos según qué pareja de nonapeptidos presenten. Por un lado tenemos a los mamíferos donde es posible encontrar oxitocina y arginina vasopresina (AVP)/lisina vasopresina. En los

tetrápodos no-mamíferos (aves, reptiles, anfibios, peces pulmonados), encontramos mesotocina y vasotocina (AVT). En los teleósteos es posible encontrar isotocina y vasotocina (AVT). En último lugar, en peces cartilagosos, encontramos nuevamente vasotocina (AVT). Sin embargo, en este último grupo, es posible encontrar tres tipos de nonapeptidos homólogos a la oxitocina. Estos son: glumitocina, valitocina y aspargotocina (Acher, 1974).

De esta manera podemos describir seis hormonas homólogas a la oxitocina y tres hormonas homólogas a la vasopresina (AVP) en diferentes animales. Como se puede observar en la figura 2, de los nueve aminoácidos presentes en estas moléculas, seis se mantienen constantes en todas las clases de vertebrados. En la oxitocina los cambios de un aminoácido en sus homólogos solo ocurre en la posición 4 u 8. En el caso de los homólogos a la vasopresina la sustitución aminoacídica solo ocurre en la tercera posición. En la figura 3 se puede observar cómo se sustituye la fenilalanina, presente en AVP, por isoleucina para resultar en AVT (Acher, 1974).

En anamniotas estos péptidos son fabricados por núcleos, homólogos a los encontrados en vertebrados amniotas, en el APO parvocelular y magnocelular. Tanto en amniotas como en anamniotas las prolongaciones de estas neuronas llegan a las neurohipófisis, desde donde los nonapeptidos se liberan al torrente sanguíneo. En anuros se ha descrito la presencia de neuronas que contienen vasotocina en el NAcc de cuatro especies distintas (Wilczynski et al, 2017).

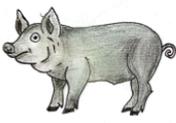
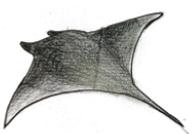
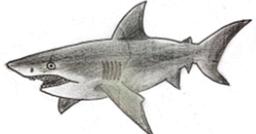
	1 2 3 4 5 6 7 8 9 Cys-Tyr-Ile- Gln -Asn-Cys-Pro- Leu -Gly-NH ₂ Oxitocina	1 2 3 4 5 6 7 8 9 Cys-Tyr- Phe -Gln-Asn-Cys-Pro- Arg -Gly-NH ₂ Arginina vasopresina
Mamíferos (excepto cerdo)		
	Cys-Tyr-Ile- Gln -Asn-Cys-Pro- Leu -Gly-NH ₂ Oxitocina	Cys-Tyr- Phe -Gln-Asn-Cys-Pro- Lys -Gly-NH ₂ Lisina vasopresina
Cerdo (<i>Sus domesticus</i>)		
	Cys-Tyr-Ile- Gln -Asn-Cys-Pro- Ile -Gly-NH ₂ Mesotocina	Cys-Tyr- Ile -Gln-Asn-Cys-Pro- Arg -Gly-NH ₂ Vasotocina
Anfibios		
	Cys-Tyr-Ile- Gln -Asn-Cys-Pro- Ile -Gly-NH ₂ Mesotocina	Cys-Tyr- Ile -Gln-Asn-Cys-Pro- Arg -Gly-NH ₂ Vasotocina
Aves		
	Cys-Tyr-Ile- Gln -Asn-Cys-Pro- Ile -Gly-NH ₂ Mesotocina	Cys-Tyr- Ile -Gln-Asn-Cys-Pro- Arg -Gly-NH ₂ Vasotocina
Reptiles		
	Cys-Tyr-Ile- Ser -Asn-Cys-Pro- Ile -Gly-NH ₂ Isotocina	Cys-Tyr- Ile -Gln-Asn-Cys-Pro- Arg -Gly-NH ₂ Vasotocina
Peces óseos		
	Cys-Tyr-Ile- Ser -Asn-Cys-Pro- Gln -Gly-NH ₂ Glumitocina	Vasotocina?
Peces cartilagosos (mantarrayas)		
	Cys-Tyr-Ile- Gln -Asn-Cys-Pro- Val -Gly-NH ₂ Valitocina	Vasotocina?
Peces cartilagosos (tiburones)		
	Cys-Tyr-Ile- Asn -Asn-Cys-Pro- Leu -Gly-NH ₂ Aspargotocina	Vasotocina?

Figura 2. Estructuras de los distintos nonapeptidos encontrados en vertebrados. Tomado y adaptado de Acher, 1974. Ilustraciones: Joaquín Sharoian.

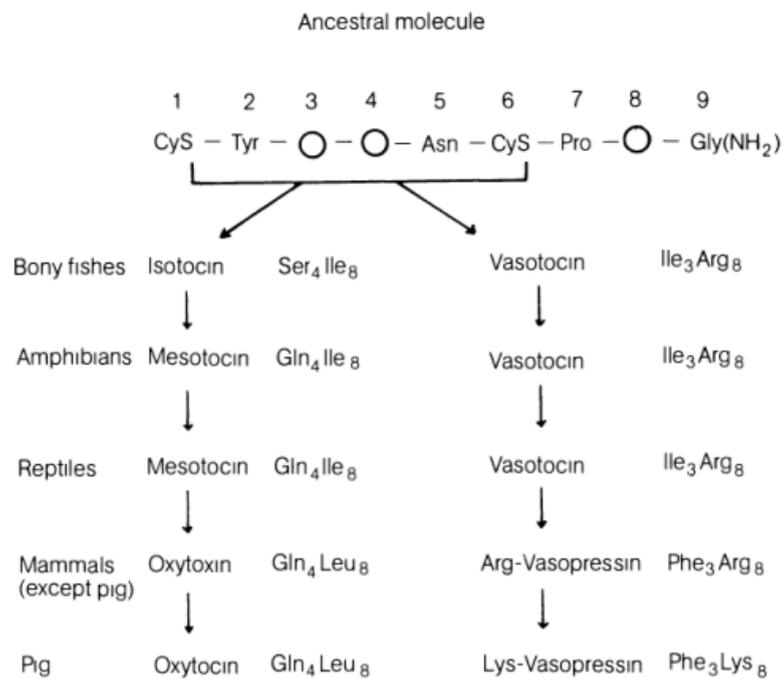


Figura 3. Extraído de Acher, 1974. Esquema de la evolución de los nonapeptidos hipotalámicos a partir de una única molécula ancestral. La duplicación de un gen y la subsiguiente sustitución aminoacídica produjo estas dos líneas moleculares. A la derecha de cada hormona se observa el aminoácido sustituido y su posición en la estructura de la hormona.

En humanos, es bien conocido el rol modulador de los nonapéptidos hipotalámicos en múltiples procesos cognitivos y respuestas comportamentales. Estos nonapéptidos son reguladores de procesos cognitivos básicos como la memoria, la atención y las respuestas asociativas. Tienen también un papel en la respuesta de adaptación al estrés social, el reconocimiento de las emociones; y en particular se destaca el rol modulador en la interacción social (Meyer-Lindenberg et al, 2011).

La AVP es una de las dos hormonas secretadas por la neurohipófisis en mamíferos, incluyendo humanos. Se encuentra vinculada a comportamientos sociales como la agresión o el cortejo. En humanos la mayor parte de los estudios relacionados al comportamiento social se han realizado sobre los efectos de la oxitocina, sin embargo existen estudios que sugieren que la AVP cumple un rol similar al observado en otras especies (Heinrichs & Domes, 2008). Sus receptores en el cerebro se encuentran en áreas que regulan el funcionamiento social (Parker et al., 2019), y poseen diversas similitudes con los receptores de oxitocina; los receptores de oxitocina pueden activar a los de AVP y viceversa (Young & Flanagan-Cato, 2012) . Su síntesis ocurre en los cuerpos celulares de los núcleos supraópticos y paraventricular. La secreción de AVP está influenciada por distintas variables fisiológicas como la presión osmótica del agua corporal (González Chon & García López, 2002).

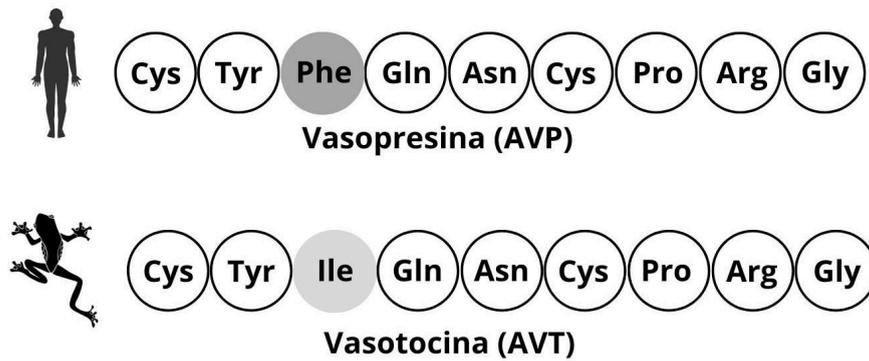


Figura 4. Estructura aminoacídica de la vasopresina (presente en mamíferos) y estructura aminoacídica de la vasotocina (presente en anfibios). Se observa una alta conservación en su estructura, con una diferencia de solo un aminoácido, fenilalanina es sustituida por isoleucina.

La vasotocina (AVT) es un nonapéptido hipotalámico homólogo a la AVP presente en otros vertebrados. En la familia de los péptidos hipotalámicos la AVT es considerada la más ancestral, y es posible encontrarla a ella, o a un homólogo como la AVP, en todos las clases de vertebrados. En anfibios, la AVT se encuentra involucrada en el comportamiento social (Wilczynski et al, 2017). Existen escasas descripciones sobre la presencia de AVT en el cerebro de anuros (Wilczynski et al., 2017, Gonzalez & Smeets, 1992, Pulido et al., 2019). En la figura 4 destacamos la similitud entre la AVP y AVT. Observar la sustitución de fenilalanina por isoleucina.

Bases neurales del comportamiento social en un anuro autóctono: *Boana pulchella*

Los anfibios anuros son reconocidos modelos para estudiar las bases neuroendócrinas del comportamiento social: primero, porque podemos explorar, a través de su comportamiento vocal, cambios en el sistema nervioso (Kelley & Brenowitz, 2002). Segundo, en anuros es conocida la modulación nonapeptidérgica sobre el comportamiento vocal (Sunny K. Boyd, 2013). Tercero, 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.

Nuestro modelo de estudio es el anuro *Boana pulchella* (Fig. 5), esta es una especie flexible en su comportamiento social, que se manifiesta en la emisión de vocalizaciones. *B. pulchella* es una especie de rana autóctona que forma parte de la clase Amphibia orden Anura. Está descrita como de tamaño mediano, entre 37 mm y 50 mm de largo. Con una cabeza tan ancha como larga y hocico corto (Ceí, 1980). Los ejemplares presentan una coloración variada que puede ir desde el amarillo, al marrón claro y verde brillante, con manchas marrones. Esta rana trepadora, perteneciente a la familia Hylidae, es abundante en todo el territorio uruguayo, siendo uno de los anuros más comunes del país (Maneyro & Carreira, 2012). La especie en estudio se distribuye en el bioma pampeano, por lo que también es posible encontrarla en el sur brasilero y en provincias argentinas (Langone, 1994); habita humedales pero también se la puede encontrar en ambientes antropogénicos. *B. pulchella* presenta actividad reproductiva a lo largo de todo el año (Maneyro & Carreira, 2012) y presenta dimorfismo sexual morfológico donde el macho es más pequeño que la hembra y presenta saco vocal, característica ausente en hembras. Los machos se congregan en

coros para atraer a las hembras. La actividad coral está correlacionada con la temperatura y el fotoperiodo (Pouso, 2023). Durante el período reproductivo, se agrupa en charcas temporales de aguas naturales y/o artificiales. Durante el cortejo nocturno se puede observar la comunicación entre los machos, quienes se comunican mediante cantos en unísono o de forma alternativa. Los meses de máxima actividad en el coro son de setiembre a abril (Pouso, 2023). Como en la mayoría de especies de anuros, la fecundación es externa. El apareamiento ocurre por amplexo, los espermatozoides alcanzan los óvulos que la hembra libera en el agua. Las larvas, conocidas como renacuajos, emergen de cada huevo fertilizado.



Fig 5. Macho vocalizador de *Boana pulchella*. Foto: Esteban Russi

El canto nupcial de *B. pulchella* fue descrito por primera vez como cuatro notas agrupadas de a dos siendo cada grupo de dos notas poseedor de sus propias características acústicas (Basso & Basso, 1987). Más recientemente han habido más investigaciones sobre las vocalizaciones de las mismas, con un énfasis en la flexibilidad de estos cantos (Ziegler et al, 2011). Actualmente se han descrito dos tipos de canto compuestos por tres notas distintas, un “doblete” compuesto por dos notas, y un “squeak” compuesto por una tercera nota (Rodríguez et al , 2023) (Figura 6).

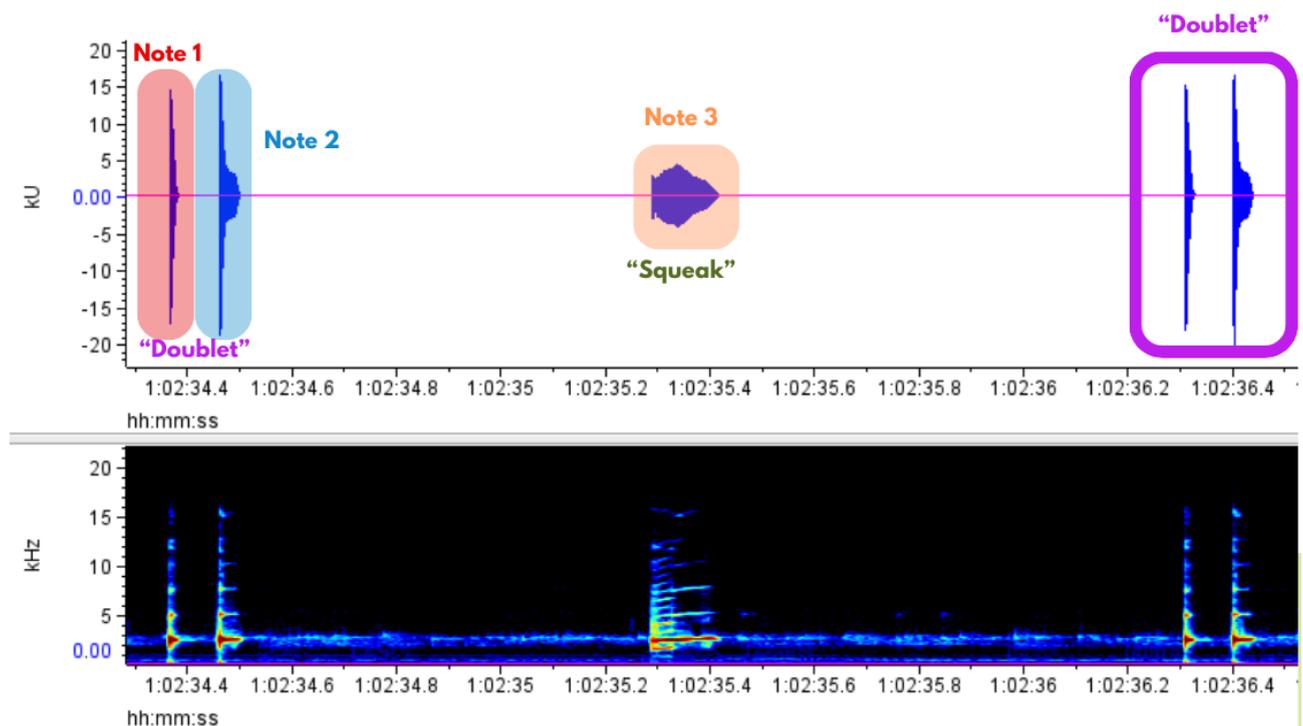


Figura 6. Se muestra un oscilograma y un espectrograma donde se observan las tres notas características descritas en el canto de *Boana pulchella*. Las notas 1 y 2 cuando emitidas juntas se reconocen como un “doblete”, la nota 3 se denomina “squeak”.

En anuros existen pocos reportes neuroanatómicos y de distribución de AVT en el sistema nervioso central. En *B. pulchella* se realizó una somera descripción de las características histológicas del APO y la presencia de neuronas AVTérgicas en esta área por inmunohistoquímica (Godoy et al, 2019). No obstante, no se han descrito la neuroanatomía de otras áreas cerebrales así como la distribución de AVT.

En este trabajo aportaremos al conocimiento sobre las bases neurales del comportamiento social y en particular al estudio de las bases neuroanatómicas del mismo. Con este fin exploraremos las características histológicas de áreas cerebrales, enfocándonos en el APO, NAcc y VMH, así como la presencia y distribución de neuronas nonapeptidérgicas (AVT) en áreas involucradas en el control del comportamiento social como son el NAcc y el APO en machos de *Boana pulchella*.

Objetivos

Objetivo general

Describir la microanatomía de áreas cerebrales involucradas en el control del comportamiento social (RCCS, RTD) e identificar la presencia de neuronas que contienen nonapéptidos hipotalámicos en el cerebro de machos vocalizadores de *Boana pulchella*.

Objetivos Específicos

- Identificar áreas involucradas en la RCCS. Específicamente APO, NAcc y VMH, en machos vocalizadores de *B. pulchella*
- Describir las características neuroanatómicas (extensión en el eje rostrocaudal, distribución celular) de NAcc, APO y VMH en machos vocalizadores de *B. pulchella*
- Realizar la puesta a punto de la técnica de inmunohistoquímica para vasotocina en el cerebro de machos vocalizadores de *B. pulchella*.
- Inmunoidentificar somas y prolongaciones neuronales que contengan vasotocina en APO y NAcc de machos vocalizadores de *B. pulchella*

Métodos

1. Animales

Se colectaron manualmente 11 machos vocalizadores de la especie *Boana pulchella* en la localidad de Zanja del Tigre, ubicada en la ruta 12, Maldonado, Uruguay en noviembre de 2023, la temperatura promedio fue de 19,716 °C, con una temperatura máxima de 23,773 °C y una mínima de 18,521 °C. Un macho vocalizador se refiere a los machos que emiten llamadas o vocalizaciones para atraer a las hembras con el objetivo de reproducirse.

La colecta y los procedimientos experimentales fueron realizados siguiendo las pautas de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal, Universidad de la República, “Uso de animales en experimentación, docencia e investigación Universitaria” (CDC Exp. 4332/99, Diario Oficial N°25467, Feb. 21/00). El protocolo de experimentación animal que se utilizó en este proyecto fue aprobado por el CEUA de Facultad de Medicina en fecha 15/11/2020 con protocolo número 1061 con número de expediente 070153-000937-20. Todos los procedimientos fueron supervisados por Paula Pouso.

Los individuos fueron alojados en bolsas plásticas de 24 x 18 cm. Las mismas fueron rociadas con agua procedente del tajamar de origen para preservar la humedad de los individuos. Los animales fueron pesados y medidos. Se tomaron medidas del largo desde la punta del hocico hasta la apertura cloacal (Snout-vent length/SVL) y del largo del fémur. En la tabla 1 se presenta la distribución por peso, SVL y longitud del fémur registrada durante esta toma de medidas.

Tabla 1: distribución por peso, SVL y largo del fémur en machos de *B. pulchella*.

Número individuo	Peso (gramos)	SVL (cm)	Largo del fémur (cm)
1	2.9	3.7	2.0
2	3.3	4.0	1.4
3	3.0	3.8	1.5
4	2.8	3.6	1.6
5	3.2	3.5	1.7
6	2.7	3.5	1.8
7	3.2	3.4	1.9
8	3.5	3.6	1.9
9	3.1	3.6	1.6
10	1.8	3.1	1.5
11	1.9	3.3	1.6
Estadística descriptiva (Media con desviación estándar)	\bar{x} : 2.85 σ : 0.55	\bar{x} : 3.55 σ : 0.24	\bar{x} : 1.68 σ : 0.19

2. Histología

Las ranas fueron anestesiadas mediante la aplicación tópica de benzocaína al 5%. A continuación, se realizó una perfusión intracardiaca con solución salina (ringer rana), seguida de una perfusión intracardiaca con paraformaldehído (PFA) en PBS al 4%. Los cerebros fueron disecados y encastrados en bloques formados por una solución de 1 ml de albúmina, 0,5 ml de gelatina y 50 μ l de glutaraldehído al 25%. Posteriormente, se realizaron cortes seriados en sentido rostro-caudal a 60 micras con vibratomo. Los cortes obtenidos se distribuyeron en dos series de manera alterna: la primera serie fue teñida con azul de toluidina y la otra se reservó para análisis de inmunohistoquímica. En la figura 7 se muestra una vista ventral y dorsal del cerebro de *Boana pulchella* previo al encastrado en bloque de albúmina-gelatina, se destacan regiones de interés. Debido a diversas dificultades en distintas etapas del procesamiento de los cerebros, solo se utilizaron 2 de los 11 individuos colectados inicialmente. Estas dificultades se detallan en una sección titulada "Dificultades".

Se optó por el azul de toluidina como colorante por su capacidad para generar contraste dentro del sistema nervioso, permitiendo identificar la distribución espacial de las células en el tejido. Al ser

un colorante acidófilo tiñe diversas estructuras encontradas dentro del soma neuronal como lo son el núcleo celular o los cuerpos de Nissl, gracias a esto es extremadamente útil para poder apreciar las características morfológicas del sistema nervioso. Los cortes son pasados por agua destilada, luego sumergidos en azul de toluidina al 5% durante 30 segundos, y luego se vuelven a pasar por agua destilada. Los pasos siguientes son un pasaje por etanol 96° con agitación y un pasaje por etanol 100° con agitación para la deshidratación. Finalmente son sumergidos en xilol y montados con medio de montaje (bálsamo de Canadá).

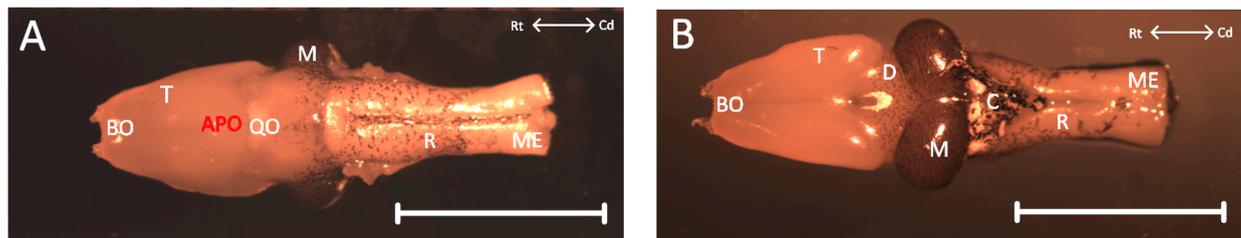


Figura 7. Vista ventral (A) y dorsal (B) del cerebro de Boana pulchella. Se señala: BO, bulbo olfatorio; T, telencéfalo; APO, área preóptica; QO, quiasma óptico; M, mesencéfalo; R, romboencéfalo; ME, médula espinal; D, diencéfalo; C, cerebelo. Barra de calibración: 0,5 cm. Rt: rostral, Cd: caudal.

3. Inmunohistoquímica

Los cortes obtenidos con el vibratomo, reservados para esta sección, se lavaron en una solución buffer salino (PBS) (Phosphate buffered saline) y luego se bloquearon con solución de suero de burro (PBS 0,1 M + 0,3% tritón) una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se realizó una preabsorción para minimizar la unión inespecífica. El anticuerpo primario (anti-AVP de conejo, Immunostar) fue diluido en la solución de incubación (PBS 0,1 M + 0,3% tritón + suero de burro) y mezclado con el antígeno correspondiente en exceso. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario (anti-AVP de conejo, Immunostar), el cual se encuentra en una solución con PBS 0,1 M + 0,3% tritón + suero de burro, durante 72 horas a 4 °C. Se probaron dos concentraciones: 1/500 y 1/1000 en PBS azida 0,1 M + 0,3% tritón + suero de burro. A continuación, los cortes fueron lavados tres veces por 10 minutos cada vez con PBS. Incubados con un anticuerpo secundario conjugado a un fluoróforo (Alexa Fluor 488 anti-conejo) en PBS azida + suero de burro + 0,3% tritón durante 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda y protegido de la luz. Tras el lavado final (3 x 10 minutos) con PBS 0,1 M, los cortes se montaron en un medio para fluorescencia (glicerina en PBS) con tinción nuclear (DAPI).

4. Adquisición de imágenes

Las imágenes correspondientes a la tinción con azul de toluidina a un aumento 4x se obtuvieron utilizando un microscopio de luz transmitida con cámara digital asociada (OLYMPUS). Las imágenes correspondientes a la tinción con azul de toluidina con aumentos de 10x y 60x fueron adquiridas mediante un microscopio de luz transmitida con cámara digital asociada (Nikon).

Las imágenes correspondientes a la técnica inmunohistoquímica fueron adquiridas mediante un

microscopio láser confocal de forma secuencial utilizando láseres Diode 405 nm y HeNE 488 nm (LEICA).

5. Atlas

Para la identificación de las distintas áreas, se tomó como referencia el capítulo 19 del libro “The Central Nervous System of Vertebrates” de H. J. Ten Donkelaar. Este atlas presenta cortes transversales a lo largo del eje rostrocaudal del cerebro de *Rana esculenta*, teñidos con la técnica de Nissl para resaltar los somas celulares y con Klüver-Barrera para evidenciar las fibras neuronales. Se utilizaron distintos repereos anatómicos para identificar las distintas áreas.

6. Dificultades

Se decidió destinar un espacio en este trabajo para mostrar las distintas dificultades que se presentaron a lo largo del proceso del mismo. De esta manera se espera mostrar la evolución en el manejo de las distintas técnicas y las estrategias que se encontraron para superar los distintos desafíos presentados.

En la figura 2A observamos un corte transversal del cerebro de *Boana pulchella* correspondiente a uno de los primeros intentos de tinción y montaje. Se observan vasos dilatados, especialmente en el hemisferio izquierdo, lo que podría haber resultado de un aumento repentino del flujo de la bomba peristáltica durante la perfusión. Otra posible explicación es que durante el transporte las muestras estuvieron en hielo, lo que provocó que en algunos casos se semicongelaran. Al estar los cerebros a muy bajas temperaturas y no crioprotectados es posible que el tejido se haya dañado. Además, en esta figura se evidencian roturas en varias áreas del tejido, que probablemente ocurrieron durante las manipulaciones, particularmente durante la disección y el encastrado en el bloque de albúmina-gelatina.

La tinción con azul de toluidina y posterior montaje también presentaron obstáculos. En primer lugar en la figura 2A observamos precipitaciones negras a lo largo del borde del tejido. Estas se deben a que el colorante precipitó, para evitar esto se podría haber realizado una agitación previa a la tinción o un filtrado del colorante. Al momento del montaje, el corte se desprendió en algunas áreas del bloque de albúmina-gelatina, lo que ocasionó que ciertas secciones quedaran desplazadas. Por otra parte, el medio de montaje no se distribuyó de manera uniforme, lo que generó las “líneas” negras que dificultan la observación del tejido.

En la figura 2B observamos un corte transversal del cerebro de *B. pulchella*. Se observan aspectos ya mencionados anteriormente como las roturas en distintos puntos del tejido y la abundante precipitación en el borde del tejido. En esta imagen se observa un notorio “tilt”. Esto se debe a que el cerebro no quedó nivelado al momento de encastrarlo en la solución de albúmina-gelatina. Esto provocó que los cortes no se realizaran al mismo nivel en ambos hemisferios.

En las figuras 2C y 2D se observa un fondo intensificado y vasos sanguíneos dilatados. Las posibles causas de la dilatación de los vasos ya fueron discutidas anteriormente. En cuanto al aumento del fondo, esto podría atribuirse a varias razones. En primer lugar, los cerebros estuvieron

almacenados durante un período prolongado, lo que afectó la calidad del tejido. Además, como se mencionó previamente, la perfusión no se llevó a cabo en condiciones óptimas, lo cual contribuyó al deterioro del tejido. Tanto los cortes 2C como 2D, a pesar de pertenecer a diferentes alturas del cerebro, muestran los mismos problemas, lo que sugiere que el daño es de carácter global y no limitado a áreas específicas del tejido cerebral.

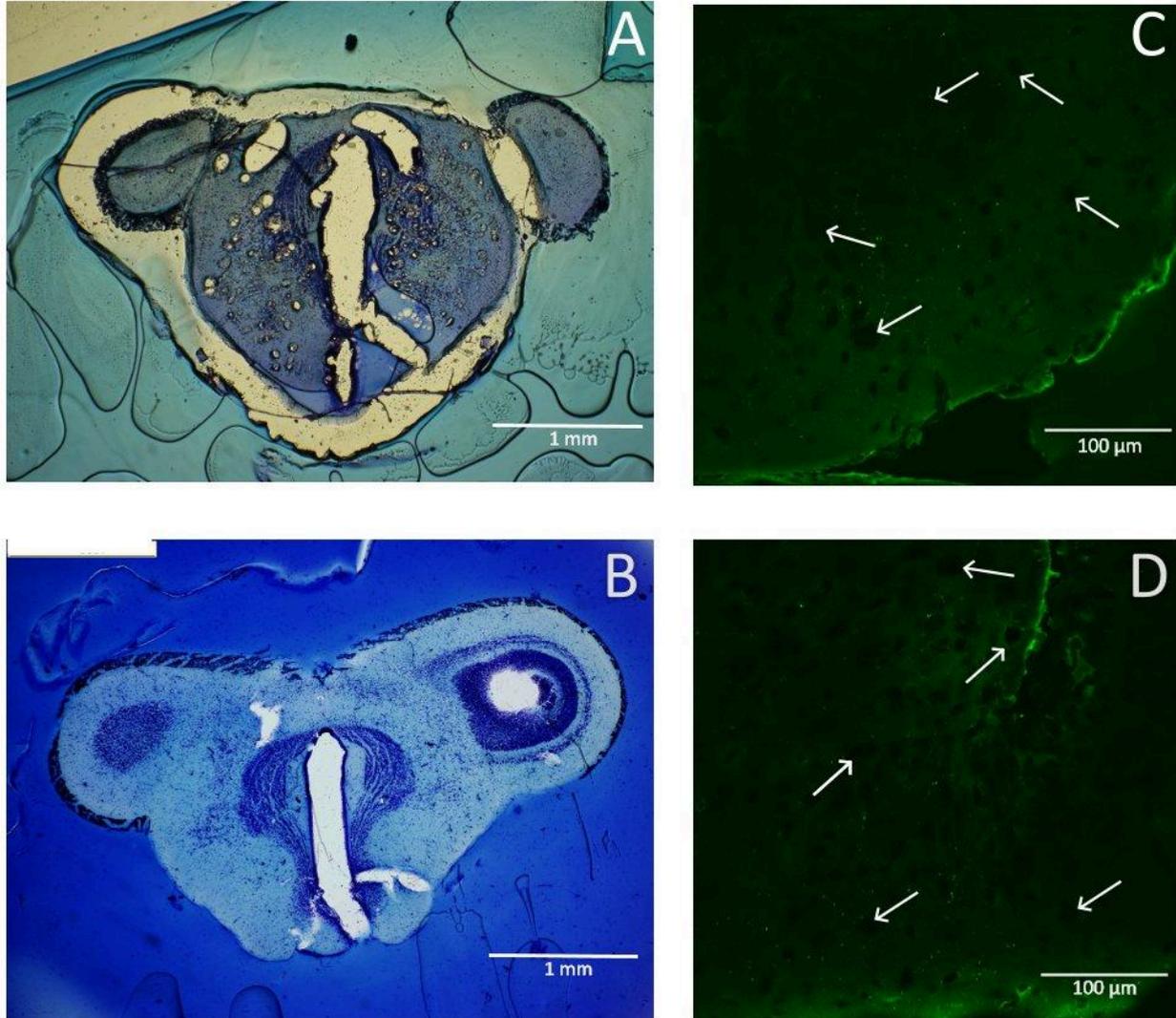


Figura 8: A-B: Cortes transversales del cerebro de *Boana pulchella* teñido con azul de toluidina. C - D: Cortes transversales del cerebro de *B. pulchella* inmunomarcado para AVP. Con flechas blancas se señalan vasos sanguíneos dilatados.

Resultados

Se presentan a continuación los resultados del procesamiento histológico e inmunohistoquímico de los cerebros de machos vocalizadores de *B. pulchella*.

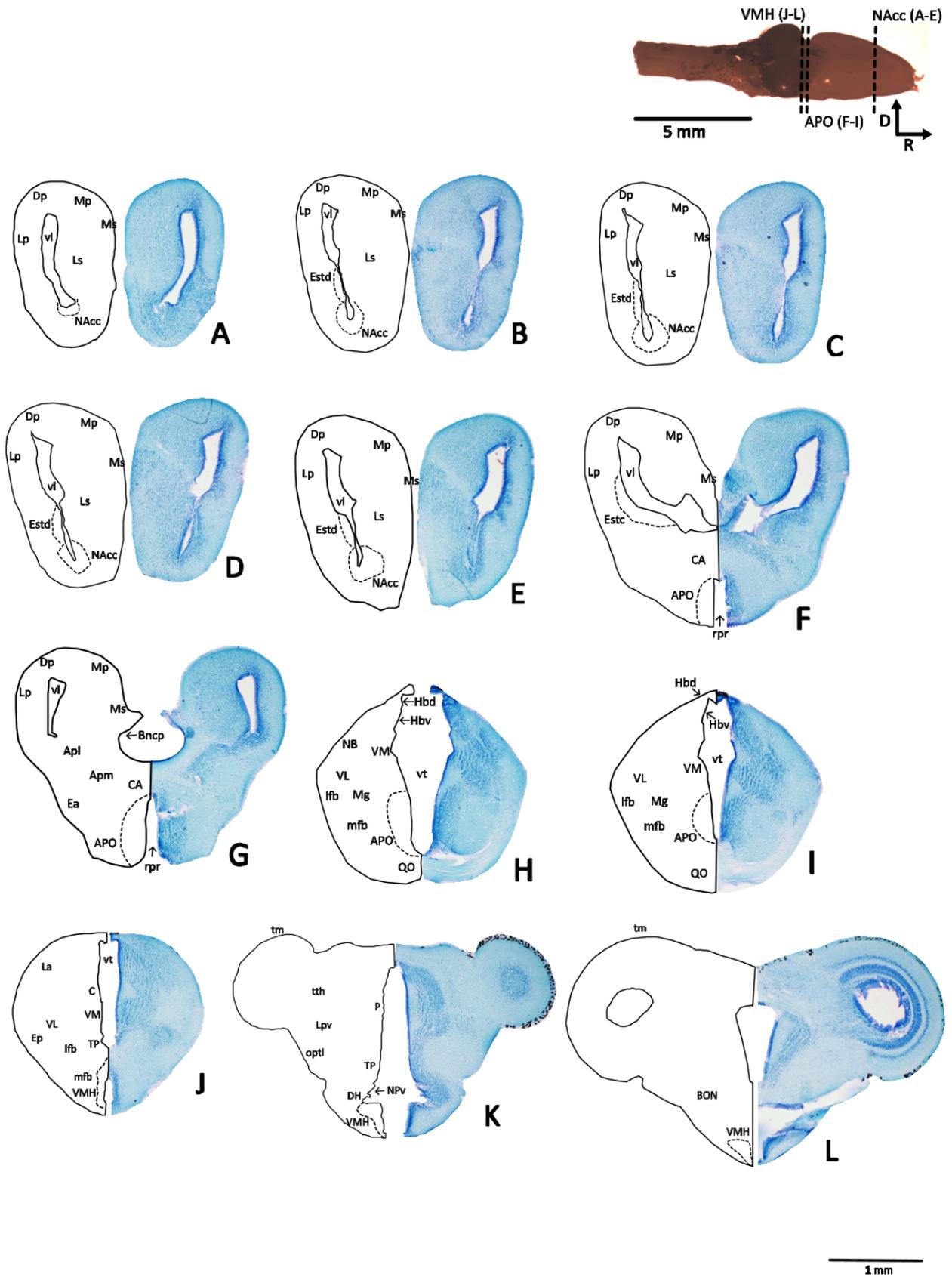


Figura 9. Cortes transversales en sentido rostro-caudal del cerebro de *Boana pulchella*. En cada panel se muestra un esquema de hemicorte a la izquierda y un hemicorte teñido con azul de toluidina a la derecha. Cortes A-E corresponden a nivel del núcleo accumbens; cortes F-I corresponden a nivel de área preóptica; cortes J-L corresponden a nivel de hipotálamo ventral. Tinción: Azul de toluidina. Barra de calibración: 1mm. Por abreviaturas mirar la lista.

Identificación y caracterización de áreas de la RCCS: APO, NAcc y VMH, en machos vocalizadores de *B. pulchella*

Se realizaron cortes transversales seriados en sentido rostro-caudal, estos fueron luego coloreados con azul de toluidina. Se seleccionaron los cortes correspondientes a tres áreas vinculadas a la RCCS. Estas, ordenadas en sentido rostrocaudal, son el NAcc, el APO y el VMH (Figura 9).

El NAcc (Fig. 9 cortes A-E) fue identificado en el tercio rostral de la pared ventromedial del telencéfalo (Fig 7), rodeando el vértice inferior del ventrículo lateral. La extensión en el eje rostro-caudal del NAcc en el cerebro es de aproximadamente 840 μm . La tinción con azul de toluidina permite reconocer la agrupación de cuerpos celulares neuronales, glía y células endoteliales cercanas al ventrículo. A medida que el perfil del ventrículo lateral se modifica también lo hace la distribución de las células a su alrededor. Se observa cómo estas células se agrupan inicialmente de manera compacta en las inmediaciones del sector ventral del ventrículo (Fig. 9 corte B), sin embargo a medida que nos desplazamos en dirección caudal las células comienzan a dispersarse y a desplazarse en dirección medial y ventral (Fig. 9 corte E).

El APO (Fig. 9 cortes F-I) se encuentra en dirección caudal con respecto al NAcc (Fig 7). Está localizado entre la comisura anterior (CA) y el quiasma óptico (QO). Se estima que abarca una extensión de 800 μm en sentido rostro-caudal. La tinción con azul de toluidina nos permite identificar cuerpos celulares rodeando al receso preóptico (rpr), debajo de la CA, en los cortes F y G, los cuales corresponden a un sector más caudal con respecto a los cortes H e I. En los cortes F y G se pueden apreciar sectores de un azul más intenso que corresponden a columnas formadas por los somas presentes en el APO. Alrededor de estas columnas se encuentran somas dispersos, especialmente hacia los laterales, alejándonos del rpr. En los cortes correspondientes a un APO más caudal la coloración permite identificar cuerpos celulares enmarcando al tercer ventrículo en su sector ventral, sobre el QO. Estos somas se organizan de manera compacta y ordenada en grupos similares a columnas que irradian en dirección dorsal e inclinándose hacia lateral. Nuevamente en el sector ventral observamos que en los laterales los somas no presentan esta disposición en columnas sino que se encuentran dispersos.

El VMH (Fig. 9 J-L) se localiza en un sector más caudal con respecto a las áreas ya mencionadas (Fig 7). Podemos estimar que abarca una extensión de 360 μm en el eje rostro-caudal. Su morfología cambia significativamente a medida que lo hace la forma del cerebro. En el caso del corte J podemos observar que los somas se agrupan en una banda vertical en el sector ventral. En el corte H estos somas aparecen ordenados en una banda vertical más compacta de un azul más intenso. Por último en el corte L esta banda se inclina hacia los laterales y los somas a su alrededor comienzan a dispersarse.

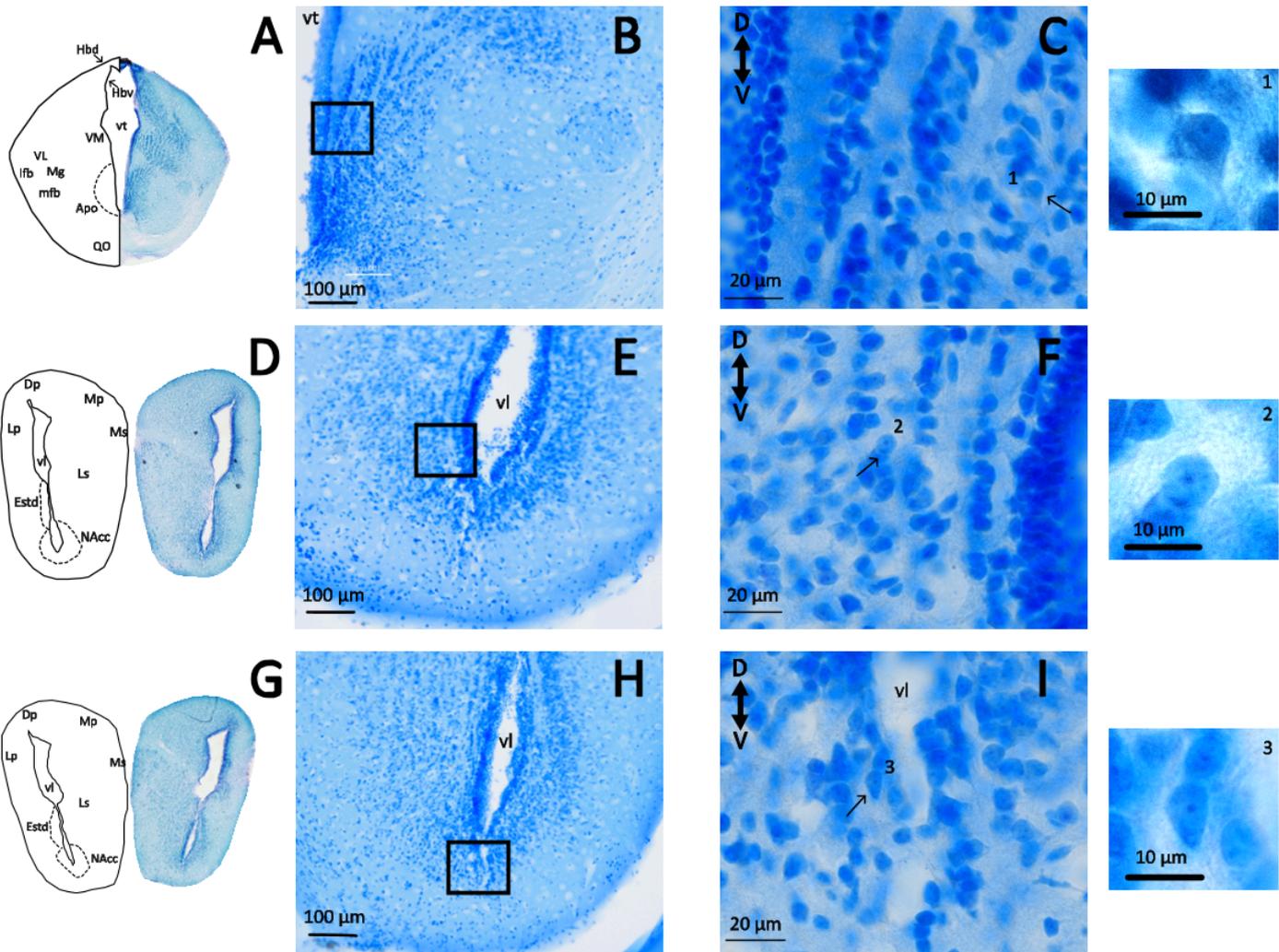
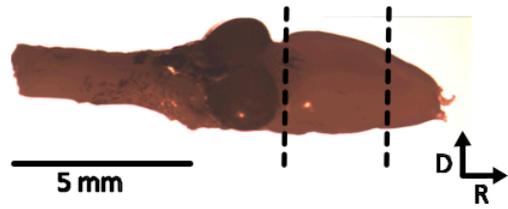


Figura 10

Imágenes de cortes transversales teñidos con azul de toluidina tomadas a distintos aumentos al nivel del APO y NAcc. **A**: a la izquierda esquema de hemicorte. **B**: corte a nivel del APO caudal, aumento a 10x de corte en A. **C**: aumento a 60x de zona enmarcada en rectángulo negro en A. **D**: a la izquierda esquema de hemicorte. **E**: corte a nivel del NAcc rostral, aumento a 10x de corte en D. **F**: aumento a 60x de zona enmarcada en rectángulo negro en E. **G**: a la izquierda esquema de hemicorte. **H**: corte a nivel del NAcc caudal, aumento a 10x de corte en G. **I**: aumento a 60x de zona enmarcada en rectángulo negro en H. Tinción: Azul de toluidina. Por abreviaturas mirar la lista.

En aumentos a 4x (Fig 10 A) topografiamos el APO caudal tal como se describió en la figura 9 cortes F-I. En la figura 10 B se encuentra una imagen tomada a 10x de esta región. Allí se observa la organización de los somas flanqueando el tercer ventrículo (vt). Una banda gruesa de cuerpos celulares enmarca la luz del vt en toda su extensión. En el sector ventral, rodeando la base del vt, los somas se encuentran densamente empaquetados. A medida que nos movemos hacia dorsal los mismos comienzan a presentar una organización en columnas que irradian en dirección dorsal, con una inclinación hacia lateral. A medida que los somas se desplazan hacia la periferia se vuelven más escasos y su distribución se vuelve aparentemente aleatoria.

En la figura 10 C se observa un mayor aumento (60x) de la zona marcada en Fig 10 B. Se destaca un cuerpo celular señalado con "1". Este soma presenta forma levemente redondeada, se observan los sectores desde donde se expanden aparentes prolongaciones celulares que llevan a una disrupción en la forma redonda, otorgándole una configuración más angular. Este soma presenta un diámetro de aproximadamente 10 μm . Se aprecia un núcleo extenso, con límites nítidos y nucleolo evidente. Se observa citoplasma con cuerpos de Nissl en su sector izquierdo.

La figura 10 D corresponde a un aumento 4x donde se topografía al NAcc rostral, previamente descrito en la figura 9. En la figura 2E se encuentra una imagen tomada a 10x de esta región. Se observan cuerpos celulares rodeando el ventrículo lateral (vl). Adyacente a la luz ventricular los cuerpos celulares se encuentran densamente empaquetados formando una banda que rodea al vl en toda su extensión. Hacia los laterales se observan grupos de somas que se encuentran en una disposición más laxa. Estos cuerpos celulares irradian hacia los laterales. En el sector más ventral, por debajo del vl, los cuerpos celulares se vuelven escasos.

En la figura 10 F se observa con mayor aumento (60x) la zona marcada en Fig 10 E. Se destaca un cuerpo celular marcado con "2". Este soma presenta una forma circular, los límites de su núcleo no se aprecian pero se puede observar el nucleolo en el centro del soma. No se observa el inicio de prolongaciones que deformen su soma y los cuerpos de Nissl en su citoplasma son poco evidentes.

La figura 10 G corresponde a un aumento 4x donde se topografía al NAcc caudal, previamente descrito en la figura 9. En la figura 10 H se encuentra una imagen tomada a 10x de esta región. Se observan cuerpos celulares rodeando el vl. Adyacente a la luz ventricular los cuerpos celulares se encuentran densamente empaquetados formando una banda que rodea al vl en toda su extensión. Hacia los laterales los cuerpos celulares se encuentran en menor densidad y comienzan a agruparse en líneas verticales que se extienden hacia el sector más dorsal. Por debajo de la base del vl, en el sector más ventral, se observan escasos cuerpos celulares.

En la figura 10 I se observa con mayor aumento (60x) la zona marcada en Fig 10 H. Se destaca un cuerpo celular señalado con "3". Este soma presenta forma triangular. Se observa un núcleo definido con nucleolo evidente en su centro. En el citoplasma presenta en un vértice inferior se observan cuerpos de Nissl.

Puesta a punto de la técnica de la técnica inmunohistoquímica para identificar AVT

Luego de haber identificado las áreas cerebrales se procede a la realización de la técnica inmunohistoquímica. La puesta a punto involucra la preparación y la obtención de los cortes para inmunohistoquímica, como fue detallado en la sección de métodos.

Para la puesta a punto de la técnica se realizaron controles técnicos y de especificidad del anticuerpo. También se probaron dos diluciones crecientes (1/500 y 1/1000). Ambas diluciones funcionaron, con una mejor relación ruido/señal para la concentración correspondiente a 1/1000.

Tal como se describió en la introducción de este informe fue necesario realizar la preabsorción del anticuerpo primario con péptidos (AVT y Mesotocina (MST)) para evaluar la especificidad del anticuerpo, dada la similitud en la estructura aminoacídica entre estos nonapéptidos.

Se realizaron tres controles técnicos en forma rutinaria:

Se realizaron tres controles técnicos de forma rutinaria para evaluar la especificidad del anticuerpo: se omitió el anticuerpo primario (Fig. 11D), se omitió el anticuerpo secundario y se omitieron ambos. En todos los casos no se observó señal en estos controles, mostrando la ausencia de autofluorescencia de este tejido, como se puede ver en la Fig. 11 D donde se omitió el anticuerpo primario. En el caso de la Fig. 11 A se observan somas AVT+, de esta manera confirmamos la detección de AVT en el APO. En la Fig. 11 B no se observa señal, en este caso se muestra la inhibición total de la señal debido al bloqueo del anticuerpo con AVT. Así verificamos que la reactividad del anticuerpo es específica para AVT. En la Fig. 11 C nuevamente se observa fluorescencia en el tejido, en este caso se realizó la pre absorción con MST para verificar la especificidad del anticuerpo. Al observar fluorescencia en el tejido luego de esta preabsorción verificamos que el anticuerpo es específico para AVT ya que no es bloqueado por la presencia de MST. De esta manera comprobamos que a pesar de que MST y AVT poseen estructuras similares, el anticuerpo no está reaccionando con MST en el tejido.

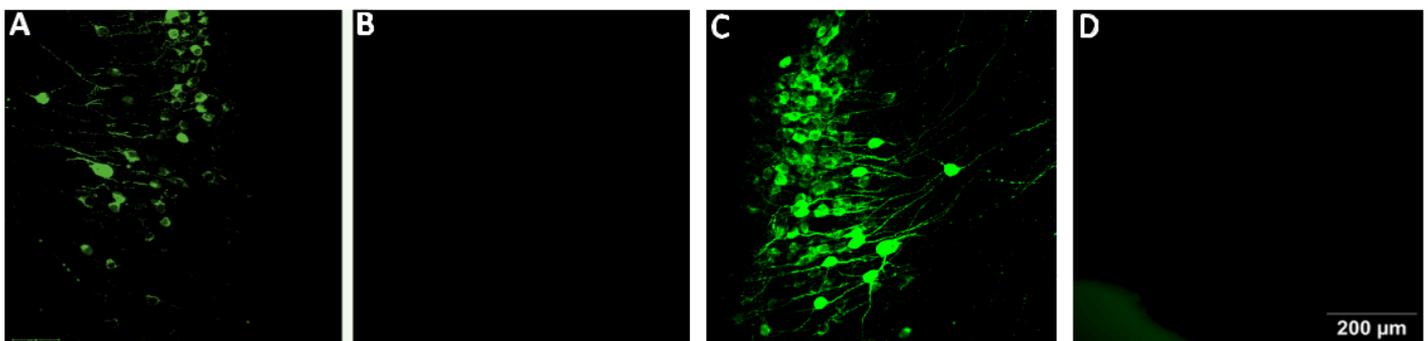


Figura 11: Controles inmunohistoquímica para anticuerpo anti-AVP en APO de *Boana pulchella*. A: Corte transversal del APO inmunomarcado para AVP en *B. pulchella*. B: Inhibición completa de la inmunorreactividad para AVP en corte del APO de *B. pulchella* luego de la preabsorción del anticuerpo anti-AVP con AVT (10μM). C: Inmunomarcado de anti AVP después de preabsorción del anticuerpo anti-AVP con MST(10μM). D: Omisión de anticuerpo primario anti-AVP.

Immunodetección de AVT en APO y NAcc en machos vocalizadores de *B. pulchella*

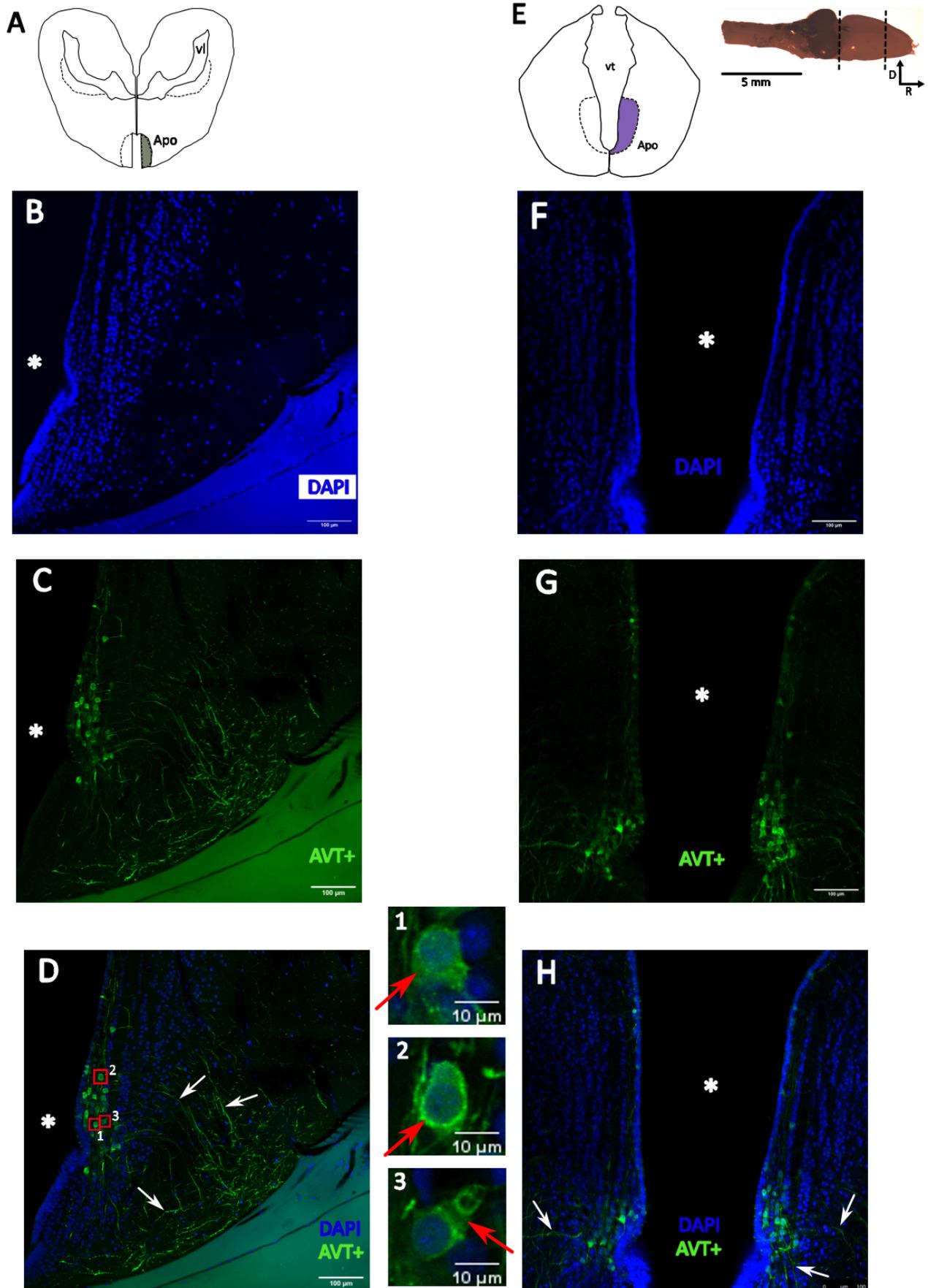


Figura 12. Inmunorreactividad para vasotocina (AVT) en el área preóptica (APO) de *Boana pulchella*. Diagramas de cortes transversales del APO a nivel rostral (A) y caudal (E). Cortes transversales con marcador nuclear (DAPI) a nivel rostral (B) y caudal (F). Cortes transversales inmunorreactivos para AVT a nivel rostral (C) y caudal (G). Superposición canales a nivel rostral (D) y caudal (H). 1,2 y 3 células AVT+, con flecha roja se señala soma AVT+. Con flecha blanca se señalan fibras AVT+. El ventrículo se señala con asterisco (*).

La inmunorreactividad para AVT fue evaluada en cortes transversales de APO a nivel rostral y caudal (figura 12). En el corte rostral del APO (Fig. 12 C-D), se observan somas adyacentes al receso preóptico (rpr), concentrados distalmente respecto al borde ventral del corte. Estos somas emiten prolongaciones en diversas direcciones dentro del APO. También se identifican prolongaciones AVT+ en las regiones laterales del corte, señaladas con flechas blancas.

A mayor aumento, se distinguen células con marcaje AVT+, la señal para este nonapéptido se observa de aspecto puntiforme a nivel del soma. Se reconocen neuronas de morfología variada, predominantemente con núcleos esféricos. En la Fig. 12.1, se muestra una neurona con un soma redondeado y núcleo esférico, que parece extender dos prolongaciones hacia la región ventral del corte. En la Fig. 12.2, se observa otra neurona AVT+ con un soma de aspecto ovalado y un núcleo esférico centrado. En Fig 12.3 observamos un soma de aspecto piriforme y núcleo esférico desviado hacia la periferia de la célula.

Las fibras AVT+ se originan en los somas periventriculares y descienden en haces hacia la superficie ventral del cerebro, mostrando el aspecto característico de “cuentas de rosario” propio de las fibras neuropeptidérgicas.

En el corte transversal correspondiente a un nivel más caudal del APO (Fig 12 G-H) se reconocen somas periventriculares. Estos somas se encuentran a un nivel más próximo a la superficie ventral del corte, en comparación con cortes más rostrales. Se observa también una menor densidad de somas y que estos comienzan a distribuirse hacia los laterales en lugar de dirigirse en dirección dorsal, como ocurre en el corte rostral. Las prolongaciones AVT+ también se extienden hacia las áreas laterales.

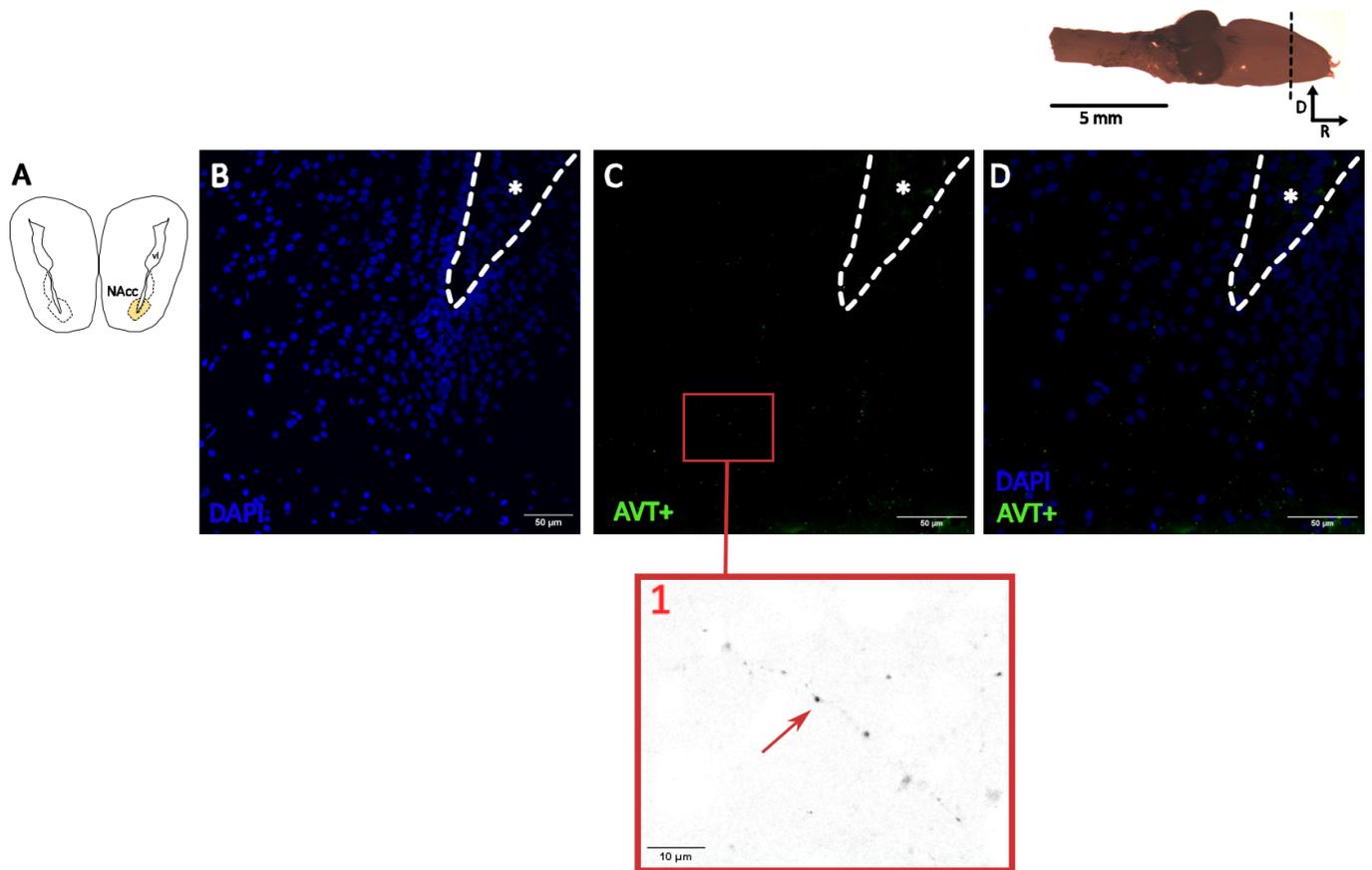


Figura 13. Inmunorreactividad para vasotocina (AVT) en el núcleo accumbens (NAcc) de *Boana pulchella*. Diagrama de cortes transversales del NAcc (A). Corte transversal con marcador nuclear (DAPI) (B). Corte transversales inmunorreactivo para AVT (C), la señal se encuentra invertida. Superposición canales (D). En recuadro rojo (1) fibra AVT+ con aspecto de “cuentas de rosario”.* → ventrículo lateral

La inmunorreactividad para AVT fue evaluada en cortes transversales de NAcc (figura 13). En Fig 13 B se observa el uso de DAPI como marcador nuclear. La distribución celular observada coincide con la descrita previamente en la Figura 13 H. Se identifican cuerpos celulares en los alrededores del ventrículo lateral, con somas densamente empaquetados en las regiones adyacentes al ventrículo. Este empaquetamiento disminuye progresivamente a medida que nos alejamos del ventrículo, donde las células comienzan a organizarse en líneas verticales que se extienden hacia la región ventral. Además, se observa una disminución en el número de somas conforme nos dirigimos hacia los sectores más laterales del corte

En los cortes analizados no se encontraron somas AVT+. Se observa la presencia de fibras AVT+ en una distribución aparentemente aleatoria. Estas fibras son menos abundantes que las localizadas en el APO, y se encuentran alejadas del ventrículo, sin seguir un patrón ordenado. Estas fibras presentan la marca para AVT distribuida en “cuentas de rosario” característica de las fibras neuropeptidérgicas (Fig 13.1).

Discusión

El estudio de la neuroanatomía de las áreas cerebrales implicadas en el comportamiento de los vertebrados es esencial para comprender la complejidad del comportamiento animal y sus bases evolutivas. En primer lugar, la neuroanatomía proporciona un marco para entender cómo las distintas regiones del cerebro interactúan para regular comportamientos complejos. Se ha identificado que la RCCS en vertebrados, que incluye regiones como la amígdala y el hipotálamo, es fundamental para la mediación de comportamientos sociales y emocionales (O'Connell & Hofmann, 2012; Ogawa & Parhar, 2022). Estas áreas no sólo son responsables de la regulación de la conducta social, sino que también están implicadas en la respuesta a estímulos ambientales y en la toma de decisiones, lo que resalta la complejidad de la interacción entre diferentes circuitos neuronales (O'Connell & Hofmann, 2011).

La investigación sobre la neuroanatomía en modelos animales como los anuros proporciona información valiosa que puede ser extrapolada a la comprensión de la neuroanatomía humana. El uso de este modelo se justifica por diversas razones. En primer lugar, nos permite estudiar mecanismos neurobiológicos en contextos más controlados y accesibles. Los anuros son también organismos relativamente más sencillos que los humanos pero comparten características fundamentales con ellos, incluyendo en el sistema nervioso. *Xenopus*, por ejemplo, ha sido un modelo indispensable en la investigación en distintos campos de la biología y ha sido un modelo esencial para lograr comprender el cerebro humano (Exner & Willsey, 2020).

Además, el estudio de la neuroanatomía permite la identificación de patrones evolutivos en el comportamiento. Existen reportes que muestran que muchas de las regiones cerebrales involucradas en el comportamiento social han permanecido conservadas a lo largo de la evolución, lo que sugiere que los mecanismos subyacentes a estos comportamientos son fundamentales para la supervivencia de las especies (Traniello & Robinson, 2021).

Un ejemplo de esto es el nonapéptido vasotocina, que como ya fue mencionado en la introducción, se ha mantenido estable evolutivamente a lo largo de millones de años. Tanto la vasotocina, como sus homólogos, es posible encontrarlos en todas las especies de vertebrados, lo que indica un papel evolutivo compartido en la regulación del comportamiento social y la reproducción (Marlin & Froemke, 2016).

Áreas de la RCCS y SRM: conservación neuroanatómica y funcional

Existen pocos informes sobre neuroanatomía en anuros (Butler, A., & Hodos, W, 2005; Manzano, A. S., Herrel, A., Fabre, A. C., & Abdala, V., 2017; Endepols, H., Helmbold, F. & Walkowiak, W., 2007), en estos, los detalles para identificar áreas son limitados. Sin embargo, el informe de Ten Donkelaar (1998), basado en la neuroanatomía de *Rana esculenta*, proporciona una descripción detallada de cómo identificar las áreas de nuestro interés.

Como se mencionó previamente, para identificar las distintas áreas fue utilizado como base el capítulo 19 del libro *The central nervous system of vertebrates* escrito por H. J. Ten Donkelaar. Este atlas muestra cortes transversales a lo largo del eje rostrocaudal del cerebro de *Rana esculenta*

teñidos con la técnica de Nissl, para evidenciar somas celulares, y con Klüver-Barrera, para evidenciar fibras neuronales. Utilizamos diversos repereos anatómicos para localizar las distintas áreas. En el caso del NAcc se utilizó la morfología del ventrículo lateral (vl), tanto para limitar su comienzo como su final, ya que este varía de forma notable a lo largo del eje rostrocaudal. En el caso del APO se utilizó la aparición del receso preóptico (rpr) para indicar el comienzo de esta área. A continuación el APO fue ubicado entre la comisura anterior y el quiasma óptico. Una vez finalizado el quiasma óptico ubicamos al VMH, el cual ubicamos desde este sector (desaparición quiasma óptico) hasta que observamos la extensión del recessus lateralis tecti (rlt). La dilatación del rlt nos indica el límite caudal del VMH. Una de las limitaciones más evidentes al momento de realizar la identificación anatómica de las áreas de esta manera es el hecho de que *R. esculenta*, miembro de la familia Ranidae, se encuentra alejada filogenéticamente de *B. pulchella*, miembro de la familia Hylidae (Portik et al, 2023). Sin embargo, a pesar de esto, los repereos anatómicos eran evidentes y fáciles de identificar al comparar cortes de los cerebros de ambas especies. De todas maneras es importante tener en cuenta el margen de error presente, especialmente al describir la extensión de las áreas.

Una de las primeras descripciones de NAcc encontrada en anuros fue realizada en *Rana catesbeiana*, y lo ubican en el sector ventral rostralateral del cerebro de la misma, junto al cuerpo estriado. El mismo describe al NAcc como una población de células cuya aparición comienza caudal al bulbo olfatorio accesorio y ocupa el piso del ventrículo lateral. Al igual que en nuestros cortes (Figura 8 y 9), reconoce como los cuerpos celulares se encuentran densamente empaquetados en las cercanías del ventrículo y cómo se dispersan hacia los sectores laterales. En reportes anteriores se define a la lámina terminal rostral como el límite del NAcc (Northcutt, 1974).

Una estrategia para topografiar con mayor exactitud el NAcc es identificar los tipos neuronales que son característicos de esta área y que le confieren sus propiedades funcionales. Por ejemplo la presencia de somas y fibras dopaminérgicas, o de neuronas neuropeptidérgicas (ejemplo nonapéptidos hipotalámicos) es característica del NAcc y está conservada tanto en mamíferos como en anuros (Gonzalez & Smeets, 1994; O'Connell et al., 2010; Gonzalez & Smeets, 1991; Marín, Gonzalez & Smeets, 1997; Milán & Puelles, 2000), lo que refleja un elemento evolutivo compartido relacionado con la regulación de la recompensa y la motivación y el comportamiento social.

Se han reportado homologías funcionales para la mayoría de las áreas que forman parte tanto del SRM como de la RCCS entre las principales líneas de vertebrados (mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces teleósteos) (O'Connell & Hofmann, 2011). Esto incluye al NAcc, que presenta características que son homólogas a las encontradas en mamíferos (Simmons et al., 2007). Además, se ha propuesto que el NAcc en anuros podría estar involucrado en un "circuito ejecutivo", similar al que se observa en mamíferos, lo que sugiere que este núcleo podría desempeñar un papel en la toma de decisiones y el control de la conducta (Freudenmacher et al., 2019). Por lo tanto, la evidencia sugiere que el núcleo accumbens en anfibios no sólo es estructuralmente similar al de los mamíferos, sino que también comparte funciones neurobiológicas fundamentales.

Topografiar el APO en vertebrados resulta más accesible que hacerlo con el NAcc. Esto se debe a que los repereos anatómicos con los que lo identificamos son fácilmente identificables y conservados en vertebrados (Butler & Hodos, 2005) (Figuras 8 y 9). La disposición de las células en la especie en estudio es similar a la encontrada en otros anuros (Gonzalez & Smeets, 1992; Conway & Gainer 1987; Vandesande & Dierickx, 1976).

Al igual que como se mencionó en el NAcc, una estrategia para topografiar de manera más exacta esta área podría ser identificar los distintos tipos neuronales. En varios vertebrados incluido los humanos, se describe en el APO la presencia de tipos neuronales característicos del área, como son las neuronas dopaminérgicas y neuropeptidérgicas (ejemplo nonapéptidos hipotalámicos) (Miller & Lonstein, 2005; Dominguez & Hull, 2005; Rigney et al, 2022; Bosch et al, 2010). En anuros, se han encontrado neuronas dopaminérgicas que se consideran homólogas a las encontradas en mamíferos, lo que sugiere una conservación evolutiva en los mecanismos de regulación del comportamiento (Chu & Wilczynski, 2007). En anuros, ha sido descrita la presencia de nonapéptidos hipotalámicos (AVT, MST) en el APO (Gonzalez y Smeets, 1992; Smeets y Gonzalez, 2002; Wilczynski et al., 2017). Algunos ejemplos de estas especies son en *Xenopus laevis* (Yao et al., 2004) donde se reportó que la AVT regula el estrés y la conducta reproductiva en esta especie; y en el anfibio *Triturus cristatus* donde también se identificó AVT en el APO, y este fue vinculado al cortejo (Hasunuma et al., 2005).

En mamíferos, el APO presenta conexiones extensas con el NAcc. El área preóptica medial, una subdivisión del APO, ha mostrado influencia sobre la señalización dopaminérgica del NAcc, especialmente vinculada al comportamiento reproductivo. Estos estudios demuestran que la actividad dopaminérgica del NAcc está modulada por entradas desde el APO, las cuales pueden aumentar la motivación reproductiva (Melis et al., 2003; Micevych & Meisel, 2017). El APO en anfibios se encuentra vinculado al comportamiento reproductivo, sus conexiones con otras áreas cerebrales, incluyendo el NAcc, sugieren que existe un rol conservado con el procesamiento motivacional en esta región cerebral (Freudenmacher et al., 2019).

El VMH lo ubicamos más caudalmente con una extensión rostrocaudal de 360 μm . Al igual que en el NAcc y el APO se observan cambios en la disposición celular en los distintos cortes. Topografiar el VMH resultó complejo debido a la escasa bibliografía existente y caracterización sobre esta área en anfibios (Chakraborty et al, 2010; Davis & Moore, 1996; Chakraborty & Burmeister, 2010; Laberge et al, 2008).

El APO y la amígdala envían conexiones al VMH lo cual refuerza el rol del VMH en modulación de la conducta reproductiva (Krajewski et al., 2010; Bian et al., 2008). Además, el VMH envía proyecciones aferentes al núcleo preóptico medial, otra región crítica en la manifestación del comportamiento reproductivo (Tran et al., 2006).

En cuanto a las conexiones que existen entre el VMH y el NAcc estas han sido raramente reportadas. Como se mencionó, el NAcc y el VMH son partes del SRM y el RCCS respectivamente.

Estos dos sistemas se encuentran vinculados mediante la RTD. El NAcc se encuentra involucrado en los circuitos de recompensa y recibe entradas dopaminérgicas, las cuales pueden ser moduladas por señales hipotalámicas, incluidas aquellas enviadas por el VMH (Miller & Lonstein, 2005).

En los resultados de este trabajo señalamos que se presentan características conservadas tanto neuroanatómica como funcionalmente. Esto se evidencia tanto en la localización como en las características estructurales de área como el APO, el NAcc y el VMH. Estas, como ya se mencionó, fueron identificadas y muestran similitudes significativas con las descripciones en otras especies de anuros y vertebrados, a pesar de las diferencias filogenéticas existentes entre *B. pulchella* y los otros modelos mencionados. Las áreas cerebrales investigadas (APO, NAcc y VMH) fueron localizadas siguiendo referencias anatómicas y mapas neuroanatómicos basados en especies filogenéticamente distantes, como *Rana esculenta*. A pesar de la distancia evolutiva entre *Boana pulchella* (familia Hylidae) y *Rana esculenta* (familia Ranidae), los reparos anatómicos, como el rpr para el APO y el ventrículo lateral vl para el NAcc, parecen ser consistentes. Esto sugiere una conservación de la organización cerebral básica.

Además, describimos patrones consistentes de disposición celular y estructura, como la organización en columnas de los somas en el APO y la disposición compacta de las células en el NAcc. Estas características coinciden con estudios previos en otras especies, lo que evidencia una preservación estructural. En cuanto a referencias cruzadas con otros modelos de vertebrados, basándonos en la bibliografía encontradas, las áreas estudiadas en *B. pulchella* no solo se corresponden con estructuras previamente identificadas en anuros, sino que también mostraron homología funcional con las áreas de la RCCS y el SRM de mamíferos, como la amígdala medial y el NAcc.

Puesta a punto de la técnica de Inmunohistoquímica de AVT en *Boana pulchella*

Las técnicas inmunohistoquímicas presentan diversas complejidades y desafíos. No hay que olvidarse que los anticuerpos son agentes biológicos que pueden unirse a una gran variedad de antígenos, esto puede llevar a que los resultados obtenidos de la técnica sean mal interpretados. Para evitar esto es necesario seguir una serie de controles adecuados para validar el resultado de la tinción inmunohistoquímica (Saper & Sawchenko, 2003). Nuestra mayor dificultad se encuentra en la similitud estructural entre los nonapéptidos. Por esto es que fue necesario realizar controles de preabsorción. El propósito de estos controles fue, por un lado, confirmar que el anticuerpo diseñado para AVP también permitía la detección de AVT y, por otro, evaluar la especificidad del anticuerpo, asegurando que no reconociera mesotocina (Pouso et al., 2017). Para poder confiar en los resultados es que realizamos la serie de controles mostrados en la figura 10. El control por preabsorción permite validar la especificidad de un anticuerpo, en nuestro caso la especificidad del anticuerpo contra AVT. Consiste en incubar el anticuerpo con un exceso del antígeno antes de aplicarlo a la muestra del tejido. De esta manera se elimina la disponibilidad de anticuerpos que podrían llegar a unirse a epítomos o antígenos que no son de interés. Esto reduce el ruido de fondo y mejora la especificidad de la tinción (Saper & Sawchenko, 2003).

El proceso de preabsorción implica, en primer lugar, la mezcla del anticuerpo con un exceso del

antígeno específico. Esto permite que, en caso de reconocerlo, el anticuerpo se una al antígeno, eliminando la disponibilidad de anticuerpos que reconozcan al epítipo específico. Finalmente, se aplica la mezcla del anticuerpo preabsorbido a la muestra de tejido. De esta manera nos aseguramos que la tinción observada en el tejido se deba a la unión del anticuerpo con el antígeno de interés, y no a interacciones no específicas o a reactividad con otros antígenos que no son de interés (Saper & Sawchenko, 2003).

Como se señaló previamente, en nuestro caso se realizaron dos controles de preabsorción. El primer control corresponde a la figura 10 B de la sección métodos donde se realizó inhibición completa de la inmunorreactividad para AVP luego de la preabsorción del anticuerpo anti-AVP con AVT. Esto resultó en la ausencia de señal inmunohistoquímica, lo que indica que la reactividad del anticuerpo fue bloqueada debido a la similitud estructural entre AVP y AVT. De esta manera confirmamos que el anticuerpo reconoce específicamente esta familia de nonapéptidos.

El segundo control de preabsorción realizado implicó la preabsorción del anticuerpo anti-AVP con mesotocina. La presencia de señal inmunohistoquímica, como se observa en la figura 10 C de la sección métodos, indica que el anticuerpo no reconoce a la mesotocina a pesar de su similitud estructural con AVP. Así reforzamos la especificidad y exclusividad que el anticuerpo utilizado posee para AVT.

Por las dificultades técnicas mencionadas, en este informe no pudimos realizar la inmunodetección de AVT en el VMH. De acuerdo a la bibliografía hay escasos reportes que hayan abordado el estudio de presencia de nonapéptidos hipotalámicos en esta área. Una posible estrategia para localizarla sería buscar la presencia de proyecciones dopaminérgicas, así como caracterizar tipos neuronales gaba o glutamatérgicos (Folgueira et al., 2019, Yamamoto et al., 2018; Rahy et al., 2022).

Distribución de AVT en áreas involucradas en la RCCS y SRM

Existen escasos reportes que muestren estudios descriptivos de distribución de neuronas inmunorreactivas para AVT en cerebros de anuros (Gonzalez & Smeets, 1992; Mathieson, 1996; Lowry et al, 1997; Gonzalez & Smeets, 2001).

En los cortes de NAcc que fueron empleados para la inmunohistoquímica no se identificaron somas AVT+, pero sí se observaron fibras AVT+ distribuidas aparentemente de manera aleatoria. Estas fibras, menos abundantes que en el APO, se localizaron alejadas del ventrículo lateral y sin seguir un patrón claro de organización.

A pesar de que nosotros no encontramos somas AVT+ en el NAcc de *B. pulchella*, la presencia de los mismos no se descarta. Debemos tener en cuenta que no se dispuso con el material biológico suficiente para procesar la cantidad de cortes que se hubieran deseado, además, el tejido del cual los cortes fueron extraídos no se encontraba en condiciones óptimas, como se mencionó en la sección de "Métodos". Otra posible explicación es que la ausencia de somas se deba a una reducción en los niveles de expresión de AVT, lo que lo vuelve indetectable mediante inmunohistoquímica. En otras especies, se ha reportado una variación en el número de neuronas

que contienen AVT en relación con los niveles de melatonina. Sin embargo, esto ha sido documentado principalmente en especies con reproducción estacional, como *Hyla cinerea* (Howard & Lutterschmidt, 2015).

Somas AVT+ en el NAcc fueron encontrados en diversas especies de anfibios como *Xenopus laevis*, *Rana ridibunda* y *Pleurodeles waltlii* (Gonzalez & Smeets, 1992; Gonzalez & Smeets, 1992). En *X. laevis* se describe un red densa de fibras AVT+ en el NAcc que se vuelve más dispersa en las regiones paliales. En *R. ridibunda* se describen somas AVT+ en el NAcc, los cuales son descritos como células multipolares y pequeñas. Se las compara con las encontradas en el APO y se las describe como de una tinción menos intensa (Gonzalez & Smeets, 1992).

En los cortes de regiones correspondientes a APO que fueron tratados con inmunohistoquímica evidenciamos somas AVT+ tanto en regiones rostrales como caudales. Los somas son de morfología variada y presentan prolongaciones AVT+ que se extienden hacia las áreas laterales del corte. Las fibras AVT+ presentan un patrón característicos de “cuentas de rosario” típico de nonapeptidos hipotalámicos (Pouso et al, 2017; Gonzalez & Smeets, 1992). En *Xenopus laevis* las células AVT+ más rostrales fueron encontradas en el APO, estas fueron descritas como células pequeñas ubicadas dorsolateralmente al receso óptico (Gonzalez & Smeets, 1992). Vandesande & Dierickx en 1976 reportaron una predominancia de células AVT+ en el área ventral del APO en tres especies de anuros: *Rana temporaria*, *Rana esculenta* y *Bufo bufo*.

Ya mencionamos las distintas conexiones relevantes que presenta el NAcc, así como su vinculación con el comportamiento reproductivo en anuros. Es importante ahora señalar la importancia que puede tener la existencia de fibras AVT+ en esta área. Se han reportado diferencias en el comportamiento de llamada en machos de *Acris crepitans* vinculadas a los distintos niveles de inmunorreactividad para AVT en NAcc que estos presentaban (Marler, Boyd, and Wilczynski, 1999). Los machos vocalizadores presentan niveles más bajos de neuronas inmunorreactivas a VT en el NAcc en comparación con los machos satélites, los cuales no emiten vocalizaciones. Esto podría sugerir que el AVT en el NAcc está directamente involucrado en la regulación para la motivación para cantar, y los distintos niveles de AVT en el mismo resultan en diferentes estrategias de apareamiento (Marler, Boyd, and Wilczynski, 1999). Esto indica al AVT como un factor neurobiológico que influye en el comportamiento reproductivo en estos anuros.

Como se señaló previamente, las dificultades en los cortes tratados con la técnica inmunohistoquímica fueron diversas. Es probable que debido a estas, no se pudieron encontrar somas AVT+, y que las fibras AVT+ fueron escasas, a pesar de la previa descripción de abundantes fibras AVT+ en otros anuros.

Nos interesa analizar si la distribución de AVT en el cerebro de los vertebrados muestra un patrón de conservación evolutiva en los diferentes grupos de vertebrados. En los peces, la AVT se localiza principalmente en el APO y en el hipotálamo anterior, donde desempeña funciones relacionadas con la regulación del comportamiento social y la agresión, como la modulación de comportamientos territoriales y reproductivos (Perrone et al, 2010 ;Pouso et al 2021, 2024, Oldfield et al, 2015; Filby et al, 2010).

En anfibios, la distribución de AVT es amplia. En diversas especies de anuros se reportó la presencia de células AVT+ en el APO, el hipotálamo, la amígdala medial, el núcleo supraquiasmático, el cuerpo estriado y el NAcc (Wilczynski et al., 2017). En urodelos se encontraron células AVT+ en el núcleo de la estría terminal (BNST) y el APO. Además en algunas especies de salamandras se encontraron también en el hipotálamo ventral y en la amígdala medial (Wilczynski et al., 2017).

En reptiles la distribución de AVT fue estudiada en tortugas, serpientes y lagartijas. En todas las especies de reptiles investigadas se han encontrado células AVT+ en el núcleo supraóptico y el paraventricular. Estas células son consideradas homólogas a las células AVT+ encontrados en el APO de anfibios (Wilczynski et al., 2017).

En aves y mamíferos la distribución de AVT también es más amplia y variada. En aves, se ha documentado que la AVT está involucrada en la regulación de los comportamientos reproductivos, similar a lo observado en otros grupos de vertebrados (Jurkevich et al., 2001; O'Connell & Hofmann, 2011).

En mamíferos, la AVT se encuentra en varias áreas del cerebro, incluyendo el hipotálamo, la amígdala y el sistema límbico, lo que sugiere su implicación en una variedad de comportamientos sociales y emocionales, como el vínculo social y la agresión (Goodson, 2005). Esta conservación en la distribución de la AVT en vertebrados más complejos indica que, aunque la localización puede variar, las funciones fundamentales de la AVT han sido preservadas a lo largo de la evolución (Wilczynski et al., 2017).

En este trabajo la inmunohistoquímica reveló la presencia de somas y fibras AVTérgicas en el APO y fibras AVTérgicas en el NAcc. La distribución de estas neuronas y sus prolongaciones coincide con el rol ampliamente conservado de los nonapéptidos en la regulación de comportamientos sociales en vertebrados. Esto apoya la evidencia de que los nonapéptidos son moléculas ancestralmente conservadas que han mantenido funciones similares en todas las clases de vertebrados.

Teniendo esto en cuenta podemos decir que la distribución de la AVT en el cerebro es conservada entre los grupos de vertebrados previamente mencionados, a pesar de las variaciones que presenta, las cuales reflejan la diferencia de complejidad y diversidad de funciones a las cuales se deben enfrentar los distintos grupos de vertebrados. No se hizo referencia a los peces, dado que en este grupo los somas se encuentran limitados al APO y al hipotálamo anterior; no obstante, sus proyecciones se dirigen hacia áreas relacionadas con la RCCS y el sistema límbico (Nieuwenhuys et al., 1998).

Conclusiones

Se identificaron áreas cerebrales involucradas en el control del comportamiento social de los machos vocalizadores de *Boana pulchella*. Las regiones identificadas, que pertenecen a la RCCS y al SRM, incluyen el NAcc, el APO y el VMH. Estas áreas fueron caracterizadas utilizando técnicas citoarquitecturales y localizadas con base en referencias bibliográficas de estudios similares realizados en otras especies de anuros.

Además, se describieron de manera detallada las características neuroanatómicas del NAcc y del APO, destacando similitudes y diferencias en su organización celular y estructural, tanto entre estas áreas como en comparación con otros anfibios reportados en la bibliografía. La identificación y caracterización del APO, NAcc y el VMH revela una organización celular y estructural coherente con lo descrito en otros vertebrados, particularmente anuros. La disposición de somas en el APO y la presencia de fibras AVTérgicas en esta región subrayan su papel central en la regulación de conductas sociales, como la vocalización, un comportamiento esencial en el contexto reproductivo de esta especie.

La distribución de somas y fibras AVT+ en el APO de *B. pulchella* refleja un patrón evolutivamente conservado, destacando la importancia de los nonapéptidos en la modulación del comportamiento social. La disposición columnar de los somas en el APO, irradiándose desde el receso preóptico hacia las regiones dorsales y laterales, es consistente con descripciones en otros anuros, pero también muestra características específicas de la especie. Estas diferencias podrían estar relacionadas con adaptaciones funcionales que facilitan la flexibilidad vocal observada en los machos de *B. pulchella*.

Por último, se realizó la puesta a punto y se implementó exitosamente la técnica inmunohistoquímica para la detección de AVT en el NAcc y el APO de machos vocalizadores de *B. pulchella*. En el NAcc, se identificaron fibras AVT+, mientras que en el APO se detectaron tanto fibras como somas AVT+.

Perspectivas

Existen múltiples aspectos que podrían ser investigados con mayor profundidad para ampliar el conocimiento sobre la neuroanatomía de *Boana pulchella*, así como sobre la distribución y el papel de los nonapéptidos hipotalámicos en su comportamiento. Para lograr esto se sugiere explorar diferentes enfoques metodológicos complementarios. A continuación, se proponen distintos abordajes que podrían consolidar y profundizar los resultados obtenidos.

Para una mejor localización de las áreas estudiadas se podrían realizar técnicas inmunohistoquímicas para la detección de los distintos tipos de neurotransmisores ya reportados en estas áreas en otros vertebrados. La inmunodetección de dopamina sería una buena estrategia para intentar mapear las tres áreas en específico en las cuales se realizó énfasis en este trabajo ya que en todas se han reportado somas y/o prolongaciones dopaminérgicas en otras especies de vertebrados, incluyendo anuros. Para la detección de dopamina se podría realizar tanto una inmunohistoquímica directa como indirecta a través de la detección de tirosina hidroxilasa. Esta última técnica ya ha sido utilizada para reconocer neuronas dopaminérgicas en el NAcc de diversos anuros (Milán & Puelles, 2000). En el caso del VMH también se podría buscar la detección de glutamato o GABA, ya que existe una mayor bibliografía respaldando la presencia de estos neurotransmisores en el VMH.

Uno de los objetivos en este trabajo fue inmunoidentificar AVT en el APO y NAcc de machos vocalizadores de *B. pulchella*. Esto se logró, especialmente en el APO donde se detectaron tanto somas como fibras AVT+. En el NAcc solo encontramos fibras AVT+, sin embargo existe evidencia de la presencia de somas AVT+ en esta área en anuros. En un futuro se podría repetir la técnica inmunohistoquímica en el NAcc, especialmente teniendo en cuenta la calidad de los cortes obtenidos. También se podría describir los tipos celulares de las neuronas AVT+ y sus características morfométricas en el APO. Como se mencionó en la sección de métodos, nos enfrentamos a diversas dificultades en la obtención de los cortes. Dificultades que luego se vieron reflejadas en la calidad de los resultados obtenidos. Teniendo en cuenta los errores cometidos y la experiencia adquirida, creemos que se pueden obtener mejores muestras, especialmente para los procedimientos inmunohistoquímicos. Con una mejor calidad de muestras, y más cortes, sería valioso repetir el procedimiento en el NAcc y estudiar la presencia de somas AVT+ en el mismo.

En el VMH no se llevó a cabo ningún procedimiento inmunohistoquímico. Esto se debe a la falta de cortes viables que se obtuvieron. Como ya se mencionó, teniendo en cuenta las dificultades a las que ya sabemos nos podemos enfrentar en la obtención de las muestras, esperamos en un futuro obtener cortes viables del sector donde se encuentra comprendido el VMH y así poder estudiar su contenido de nonapéptidos hipotalámicos.

En la introducción se mencionó las conexiones que el NAcc presenta con distintos actores involucrados tanto en el SRM como en la RCCS. Uno de estos siendo la amígdala, la cual se encuentra involucrada en respuestas emocionales y comportamientos motivacionales (Freudenmacher et al., 2019). Existen informes sobre el rol de la amígdala en los circuitos vocales de anuros, específicamente en *Xenopus laevis* (Kelley et al, 2020).

Los circuitos vocales son redes de neuronas que generan, coordinan y modulan los patrones de actividad necesarios para producir vocalizaciones. En el contexto de los vertebrados estos circuitos se encuentran en varias regiones del sistema nervioso central y están organizados para integrar señales motoras, sensoriales y hormonales relacionadas con la vocalización. Estos circuitos están constituidos por diversos componentes, se destaca el CPG (Central Pattern Generator) el cual es descrito como el núcleo del circuito vocal. La función de la amígdala es conjunta con el núcleo de la estría terminal (BNST), esta función es modular la actividad del CPG según el contexto social y las señales auditivas (Kelley et al, 2020).

En *Xenopus laevis*, la amígdala actúa como un nodo esencial en el procesamiento de la información sensorial. Se ha reportado que en los machos, la amígdala está involucrada en la respuesta a las llamadas de las hembras (rapping), promoviendo vocalizaciones de respuesta, mientras que, por el contrario, suprime las vocalizaciones en presencia de un macho dominante (Kelley et al, 2020). Además, la amígdala está conectada con varios elementos clave dentro del CPG, como el núcleo parabraquial, que regula los patrones rítmicos de vocalización, el núcleo del rafe y el BNST (Kelley et al, 2020). Recordamos que tanto la amígdala como el BNST tienen conexiones directas con el NAcc, lo que sugiere que el NAcc podría desempeñar una función importante en estos circuitos.

En el futuro, podríamos cuestionarnos si el AVT desempeña un papel en la modulación de los núcleos del canto dentro del circuito vocal, y cuál sería la función específica del NAcc en este proceso en *B. pulchella*.

Los resultados obtenidos en este trabajo abren oportunidades para profundizar en la distribución de los nonapéptidos hipotalámicos en el cerebro de anuros y en el estudio de la neuroanatomía de *B. pulchella*. Estos resultados dejan lugar para la profundización e indagación en los mismos, así como un antecedente para futuras investigaciones en áreas que puedan aplicar los resultados obtenidos, como por ejemplo el estudio de AVT en la modulación del canto en *B. pulchella*. A medida que se ahonde en los mejores métodos para topografiar las distintas áreas cerebrales, así como de sus contenidos nonapeptidérgicos, se podrá obtener una comprensión más detallada del rol de los distintos nonapeptidérgicos hipotalámicos en el comportamiento social de *B. pulchella*. Investigaciones futuras fortalecerán los hallazgos aquí presentados y se espera lograr abordar cuestiones que no se pudieron explorar en profundidad en este trabajo.

Financiamiento

Este informe fue financiado por ANII, (proyecto FCE_3_2022_1_172447), y Universidad de la República.

Contribuciones

El desarrollo de este trabajo de investigación me permitió entrenarme en la realización de tareas experimentales en el laboratorio y a desenvolverme en un entorno de investigación científica. También me entrené en el procesamiento de muestras, desde la perfusión hasta la obtención de cortes, culminando en la adquisición de imágenes mediante microscopía de fluorescencia.

Por otra parte, participé en actividades de divulgación científica, como la elaboración de pósters y la asistencia a jornadas académicas y congresos tanto nacionales como regionales. Entre las actividades de divulgación se encuentran actividades realizadas en la escuela N° 73 “Zanja del Tigre”, participación en la “Semana del Cerebro 2024” y en “Medicina Investiga” 2024.

A lo largo del desarrollo de este trabajo, los resultados fueron comunicados en diversos eventos científicos. Estos fueron:

- **IV Reunión de Biología del Comportamiento del Cono Sur**, [2023]“Exploración de las bases nonapeptidérgicas del comportamiento reproductivo en un anuro sudamericano”. Presentación en formato póster.
- **Jornadas anuales de la Unidad Académica de Histología y Embriología** [2023]. “Bases nonapeptidérgicas del comportamiento reproductivo: estudio neuroanatómico”. Presentación oral.
- **XX Jornadas de la Sociedad de Neurociencias del Uruguay**, [2024]. “Caracterización neuroanatómica de áreas cerebrales vinculadas con el comportamiento reproductivo en un anuro autóctono”. Presentación en formato póster.

Bibliografía

- Acher, R. (1978). Molecular Evolution of Neurohypophyseal Hormones and Neurophysins. In: Bargmann, W., Oksche, A., Polenov, A.L., Scharrer, B. (eds) Neurosecretion and Neuroendocrine Activity. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-66885-2_5
- Albert, D.J., Walsha, M.L., Gorzalka, B.B., Mendelson, S., Zalya, C., 1986. Intermale social aggression: Suppression by medial preoptic area lesions. *Physiol Behav* 38(2): 169-173.
- Al-Muhtasib, N., Forcelli, P., & Vicini, S. (2018). Differential electrophysiological properties of d1 and d2 spiny projection neurons in the mouse nucleus accumbens core. *Physiological Reports*, 6(13), e13784. <https://doi.org/10.14814/phy2.13784>
- Balon, E.K. 1975. Reproductive guilds of fishes: a proposal and definition. *J Fish Res Board Can* 32:821-864.
- Basso, N., Basso, G. (1987). Análisis acústico del canto nupcial de *Hyla pulchella pulchella*
- Beaudry, G., Zekki, H., Rouillard, C., & Lévesque, D. (2003). Clozapine and dopamine d3 receptor antisense reduce cocaine- and amphetamine-regulated transcript expression in the rat nucleus accumbens shell. *Synapse*, 51(4), 233-240. <https://doi.org/10.1002/syn.10302>
- Bian, X., Yanagawa, Y., Chen, W. R., & Luo, M. (2008). Cortical-Like Functional Organization of the Pheromone-Processing Circuits in the Medial Amygdala. *Journal of Neurophysiology*, 99(1), 77–86. doi:10.1152/jn.00902.2007
- Blumstein, D.T., Ebensperger, L.A., Hayes, L.D., Vásquez, R.A., Ahern, T.H., Burger, J.R., Dolezal, A.G., Dosmann, A., González-Mariscal, G., Harris, B.N., Herrera, E.A., Lacey, E.A., Mateo, J., McGraw, L.A., Olazábal, D., Ramenofsky, M., Rubenstein, D.R., Sakhai, S.A., Saltzman, W., Sainz-Borgo, C., Soto-Gamboa, M., Stewart, M.L., Wey, T.W. (2010). Toward an integrative understanding of social behavior: new models and new opportunities. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00034>
- Bosch OJ, Pförttsch J, Beiderbeck DI, Landgraf R, Neumann ID. Maternal behaviour is associated with vasopressin release in the medial preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis in the rat. *J Neuroendocrinol*. 2010 May;22(5):420-9. doi: 10.1111/j.1365-2826.2010.01984.x. Epub 2010 Feb 12. PMID: 20163514.
- Boyd, S. (2013). Vasotocin modulation of social behaviors in amphibians. En *Oxytocin, Vasopressin and Related Peptides in the Regulation of Behavior*.
- Brown, R. and Mckenna, J. (2015). Turning a negative into a positive: ascending gabaergic control of cortical activation and arousal. *Frontiers in Neurology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00135>

- Butler, A.B., Hodos, W., 2005. Comparative Vertebrate Neuroanatomy: Evolution and Adaptation. Second Edition. Cap 21: The Visceral Brain: The Hypothalamus and the Autonomic Nervous System. John Wiley & Sons, Inc. Pp.: 475-480.
- Calipari, E., Juarez, B., Morel, C., Walker, D., Cahill, M., Ribeiro, E., ... & Nestler, E. (2017). Dopaminergic dynamics underlying sex-specific cocaine reward. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms13877>
- Carlezon, W. A., & Thomas, M. J. (2009). Biological substrates of reward and aversion: A nucleus accumbens activity hypothesis. *Neuropharmacology*, 56, 122–132. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.06
- Cei, J.M. 1980. Amphibians of Argentina. *Monit. Zool. Ital. Monogr.* Nº 2 , Torino. 597pp.
- Chakraborty, M., Mangiamele, L. A., & Burmeister, S. S. (2010). Neural activity patterns in response to interspecific and intraspecific variation in mating calls in the túngara frog. *PloS one*, 5(9), e12898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012898>
- Chakraborty, M., & Burmeister, S. S. (2010). Sexually dimorphic androgen and estrogen receptor mRNA expression in the brain of túngara frogs. *Hormones and Behavior*, 58(4), 619–627. doi:10.1016/j.yhbeh.2010.06.013
- Chu, J., & Wilczynski, W. (2007). Apomorphine effects on frog locomotor behavior. *Physiology & Behavior*, 91(1), 71–76. doi:10.1016/j.physbeh.2007.01.
- Cohen, M. X., Bour, L., Mantione, M., Figeo, M., Vink, M., Tijssen, M. A. J., ... Denys, D. (2011). Top-down-directed synchrony from medial frontal cortex to nucleus accumbens during reward anticipation. *Human Brain Mapping*, 33(1), 246–252. doi:10.1002/hbm.21195
- Cohen, R. E., & Wade, J. (2012). Aromatase and 5 α -reductase type 2 mRNA in the green anole forebrain: An investigation of the effects of sex, season and testosterone manipulation. *General and Comparative Endocrinology*, 176(3), 377–384. doi:10.1016/j.ygcen.2012.01.018
- Corre, J., Zessen, R., Loureiro, M., Patriarchi, T., Tian, L., Pascoli, V., ... & Lüscher, C. (2018). Dopamine neurons projecting to medial shell of the nucleus accumbens drive heroin reinforcement. *Elife*, 7. <https://doi.org/10.7554/elife.39945>
- Davis, G. A., & Moore, F. L. (1996). Neuroanatomical distribution of androgen and estrogen receptor-immunoreactive cells in the brain of the male roughskin newt. *The Journal of Comparative Neurology*, 372(2), 294–308. doi:10.1002/(sici)1096-9861(19960819)372:2<294::aid-cne10>3.0.co;2-k
- Dominguez JM, Hull EM. Dopamine, the medial preoptic area, and male sexual behavior. *Physiol Behav.* 2005 Oct 15;86(3):356-68. doi: 10.1016/j.physbeh.2005.08.006. Epub 2005 Aug 30. PMID: 16135375.

Endepols H, Helmbold F, Walkowiak W. GABAergic projection neurons in the basal ganglia of the green tree frog (*Hyla cinerea*). *Brain Res.* 2007 Mar 23;1138:76-85. doi: 10.1016/j.brainres.2006.12.088. Epub 2007 Jan 9. PMID: 17275797.

Exner, C. R. T., & Willsey, H. R. (2020). *Xenopus* leads the way: Frogs as a pioneering model to understand the human brain. *Genesis*, 59(1-2). doi:10.1002/dvg.23405

Fauchey, V., Jaber, M., Caron, M., Bloch, B., & Moine, C. (2000). Differential regulation of the dopamine d1, d2 and d3 receptor gene expression and changes in the phenotype of the striatal neurons in mice lacking the dopamine transporter. *European Journal of Neuroscience*, 12(1), 19-26. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00876>

Filby, A. L., Paull, G. C., Hickmore, T. F., & Tyler, C. R. (2010). Unravelling the neurophysiological basis of aggression in a fish model. *BMC Genomics*, 11(1), 498. doi:10.1186/1471-2164-11-498

Flanagan-Cato, L. M. (2011). Sex differences in the neural circuit that mediates female sexual receptivity. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 32(2), 124–136. doi:10.1016/j.yfrne.2011.02.008

Folgueira, C., Beiroa, D., Porteiro, B., Duquenne, M., Puighermanal, E., Fondevila, M., ... & Nogueiras, R. (2019). Hypothalamic dopamine signalling regulates brown fat thermogenesis. *Nature Metabolism*, 1(8), 811-829. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0099-7>

Freudenmacher, L., Twickel, A., & Walkowiak, W. (2019). The Habenula as an Evolutionary Conserved Link between Basal Ganglia, Limbic, and Sensory Systems – A Phylogenetic Comparison based on Anuran Amphibians. *Journal of Comparative Neurology*. doi:10.1002/cne.24777

Galizia, C. G., & Lledo, P. (2013). *Neurosciences - From Molecule to Behavior: a university textbook*. In Springer eBooks. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-10769-6>

Gangarossa, G., Espallergues, J., d'Exaerde, A., Mestikawy, S., Gerfen, C., Hervé, D., ... & Valjent, E. (2013). Distribution and compartmental organization of gabaergic medium-sized spiny neurons in the mouse nucleus accumbens. *Frontiers in Neural Circuits*, 7. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00022>

Godoy, M., Pouso, P. 2019. Bases neuroanatómicas para el estudio del comportamiento reproductivo en un anuro autóctono. II Congreso Nacional de Biociencias

Gonzalez, A., & Smeets, W. J. A. J. (1991). Comparative analysis of dopamine and tyrosine hydroxylase immunoreactivities in the brain of two amphibians, the anuran *Rana ridibunda* and the urodele *Pleurodeles waltlii*. *The Journal of Comparative Neurology*, 303(3), 457–477. doi:10.1002/cne.903030311

González, A., & Smeets, W. J. A. J. (1992). Comparative analysis of the vasotocinergic and mesotocinergic cells and fibers in the brain of two amphibians, the anuran *Rana ridibunda* and the urodele *Pleurodeles waltlii*. *Journal of Comparative Neurology*, 315(1), 53–73. doi:10.1002/cne.903150105

González, A., & Smeets, W. J. A. J. (1992). Distribution of vasotocin- and mesotocin-like immunoreactivities in the brain of the South African clawed frog *Xenopus laevis*. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 5(6), 465–479. doi:10.1016/0891-0618(92)90003-9

González, A. and W.J.A.J. Smeets (1994) Catecholamine systems in the CNS of amphibians. In W.J.A.J. Smeets and A. Reiner (eds): *Phylogeny and Development of Catecholamine Systems in the CNS of Vertebrates*. Cambridge: University Press, pp. 77–102

González Chon, O., & García López, S. (2002). Vasopresina: usos en la práctica cardiovascular. *Archivos de Cardiología de México*, 72(3), 249-260. <https://www.scielo.org.mx/pdf/acm/v72n3/v72n3a9.pdf>

Goodson, J.L., Bass, A.H., 2001. Social behavior functions and related anatomical characteristics of vasotocin / vasopressin systems in vertebrates. *Brain Res Rev* 35: 246– 265.

Goodson, J.L., 2005. The vertebrate social behavior network: Evolutionary themes and variations. *Horm Behav* 48(1): 11-22.

Goodson, J.L., 2008. Nonapeptides and the evolutionary patterning of sociality. *Prog. Brain Res.* 170, 3–15.

Gore, C., 2008. Neuroendocrine systems. En: Squire, Bloom, Spitzer. *Fundamental neuroscience*, Third edition. Elsevier.

Gourine, A. V., Abramova, A. Y., Pertsov, S. S., & Sudakov, K. V. (2012). ATP Concentration in the Cingulum Bundle of Rats during Stimulation of the Ventromedial Hypothalamus. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 152(4), 389–391. doi:10.1007/s10517-012-1535-9

Heller, A. S., Johnstone, T., Light, S. N., Peterson, M. J., Kolden, G. G., Kalin, N. H., & Davidson, R. J. (2013). Relationships Between Changes in Sustained Fronto-Striatal Connectivity and Positive Affect in Major Depression Resulting From Antidepressant Treatment. *American Journal of Psychiatry*, 170(2), 197–206. doi:10.1176/appi.ajp.2012.1201001

Heinrichs, M., & Domes, G. (2008). Neuropeptides and social behaviour: effects of oxytocin and vasopressin in humans. *Progress in Brain Research*, 337–350. doi:10.1016/s0079-6123(08)00428-7

Howard, C. M., & Lutterschmidt, D. I. (2015). The Effects of Melatonin on Brain Arginine Vasotocin: Relationship with Sex and Seasonal Differences in Melatonin Receptor Type 1 in Green Treefrogs (*Hyla cinerea*). *Journal of Neuroendocrinology*, 27(8), 670–679. doi:10.1111/jne.12292

Hoyle, C.H.V., 1999. Neuropeptide families and their receptors: evolutionary perspectives. *Brain Res* 848: 1-25

Jurkevich, A., Grossmann, R., Balthazart, J., & Viglietti-Panzica, C. (2001). Gender-related changes in the avian vasotocin system during ontogeny. *Microscopy Research and Technique*, 55(1), 27–36. doi:10.1002/jemt.1153

Kalivas, P. W., & Volkow, N. D. (2007). The Neural Basis of Addiction: A Pathology of Motivation and Choice. *FOCUS*, 5(2), 208–219

Kelley, D.B., Brenowitz, E., 2002. Hormonal influences on courtship behaviors. En: Becker, J.B., Breedlove, S.M., Crews, D., McCarthy, M.M. (Eds.), *Behavioral endocrinology*. The MIT Press, Cambridge, Massachusetts.

Kelley, D. B., Ballagh, I. H., Barkan, C. L., Bendesky, A., Elliott, T. M., Evans, B. J., ... Zornik, E. (2020). Generation, Coordination, and Evolution of Neural Circuits for Vocal Communication. *The Journal of Neuroscience*, 40(1), 22–36. doi:10.1523/jneurosci.0736-19.2019

Kiba T. The role of the autonomic nervous system in liver regeneration and apoptosis--recent developments (2002). *Digestion*. 2002;66(2):79-88. doi: 10.1159/000065594. PMID: 12428066.

Kim, K., Yoon, Y., Lee, H., Yoon, S., Kim, S., Shin, S., ... & Baik, J. (2010). Enhanced hypothalamic leptin signaling in mice lacking dopamine d2 receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 285(12), 8905-8917. <https://doi.org/10.1074/jbc.m109.079590>

Krajewski, S. J., Burke, M. C., Anderson, M. J., McMullen, N. T., & Rance, N. E. (2010). Forebrain projections of arcuate neurokinin B neurons demonstrated by anterograde tract-tracing and monosodium glutamate lesions in the rat. *Neuroscience*, 166(2), 680–697. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.1

Laberge, F., Feldhoff, R. C., Feldhoff, P. W., & Houck, L. D. (2008). Courtship pheromone-induced c-Fos-like immunolabeling in the female salamander brain. *Neuroscience*, 151(2), 329–339. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.1

Langone, J. (1994). *Ranas y sapos del Uruguay : reconocimiento y aspectos biológicos*.

Lee, H., Kim, D.-W., Remedios, R., Anthony, T. E., Chang, A., Madisen, L., ... Anderson, D. J. (2014). Scalable control of mounting and attack by Esr1+ neurons in the ventromedial hypothalamus. *Nature*, 509(7502), 627–632. doi:10.1038/nature13169

Lee, P.C.E., 1994. Social Structure and Evolution. En: Slater, P.J.B., Halliday, T.R., (eds), *Behaviour and Evolution*. Cambridge. New York.

Lin, D., Boyle, M. P., Dollar, P., Lee, H., Lein, E. S., Perona, P., & Anderson, D. J. (2011). Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. *Nature*, 470(7333), 221–226. doi:10.1038/nature09736

Loonen, A. J. M., & Ivanova, S. A. (2015). Circuits regulating pleasure and happiness: the evolution of reward-seeking and misery-fleeing behavioral mechanisms in vertebrates. *Frontiers in Neuroscience*, 9. doi:10.3389/fnins.2015.00394

Lowry CA, Richardson CF, Zoeller TR, Miller LJ, Muske LE, Moore FL. Neuroanatomical distribution of vasotocin in a urodele amphibian (*Taricha granulosa*) revealed by immunohistochemical and in situ hybridization techniques. *J Comp Neurol*. 1997 Aug 18;385(1):43-70. doi: 10.1002/(sici)1096-9861(19970818)385:1<43::aid-cne3>3.0.co;2-c. PMID: 9268116.

Malsbury C. W. (1971). Facilitation of male rat copulatory behavior by electrical stimulation of the medial preoptic area. *Physiology & behavior*, 7(6), 797–805. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(71\)90042-4](https://doi.org/10.1016/0031-9384(71)90042-4)

Maneyro, R., & Carreira, S. (2012). *Guía de anfibios del Uruguay*.

Mangiamele, L. A., Burmeister, S. S. (2008). Acoustically Evoked Immediate Early Gene Expression in the Pallium of Female Túngara Frogs. *Brain, Behavior and Evolution*,72:239–250

Manzano AS, Herrel A, Fabre AC, Abdala V. Variation in brain anatomy in frogs and its possible bearing on their locomotor ecology. *J Anat*. 2017 Jul;231(1):38-58. doi: 10.1111/joa.12613. Epub 2017 Apr 20. PMID: 28429369; PMCID: PMC5472530.

Marín O, González A, Smeets WJ. Basal ganglia organization in amphibians: efferent connections of the striatum and the nucleus accumbens. *J Comp Neurol*. 1997 Mar 31;380(1):23-50. PMID: 9073081.

Marín O, González A, Smeets WJ. Basal ganglia organization in amphibians: afferent connections to the striatum and the nucleus accumbens. *J Comp Neurol*. 1997 Feb 3;378(1):16-49. doi: 10.1002/(sici)1096-9861(19970203)378:1<16::aid-cne2>3.0.co;2-n. PMID: 9120053.

Marín, O., Smeets, W. J. A. ., & González, A. (1998). Basal ganglia organization in amphibians: evidence for a common pattern in tetrapods. *Progress in Neurobiology*, 55(4), 363–397.

Marler, C. A., Boyd, S. K., & Wilczynski, W. (1999). Forebrain Arginine Vasotocin Correlates of Alternative Mating Strategies in Cricket Frogs. *Hormones and Behavior*, 36(1), 53–61. doi:10.1006/hbeh.1999.1524

Marlin, B. J., & Froemke, R. C. (2016). Oxytocin modulation of neural circuits for social behavior. *Developmental Neurobiology*, 77(2), 169–189. doi:10.1002/dneu.22452

Mathieson WB. Development of arginine vasotocin innervation in two species of anuran amphibian: *Rana catesbeiana* and *Rana sylvatica*. *Histochem Cell Biol*. 1996 Apr;105(4):305-18. doi: 10.1007/BF01463933. PMID: 9072187.

Melis MR, Succu S, Mascia MS, Cortis L, Argiolas A. Extra-cellular dopamine increases in the paraventricular nucleus of male rats during sexual activity. *Eur J Neurosci*. 2003 Mar;17(6):1266-72. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02558.x. PMID: 12670314.

Meshi, D., Morawetz, C., & Heekeren, H. R. (2013). Nucleus accumbens response to gains in reputation for the self relative to gains for others predicts social media use. *Frontiers in Human Neuroscience*, 7. doi:10.3389/fnhum.2013.00439

Micevych, P. E., & Meisel, R. L. (2017). Integrating Neural Circuits Controlling Female Sexual Behavior. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 11. doi:10.3389/fnsys.2017.00042

Miller, S. M., & Lonstein, J. S. (2005). Dopamine D1 and D2 Receptor Antagonism in the Preoptic Area Produces Different Effects on Maternal Behavior in Lactating Rats. *Behavioral Neuroscience*, 119(4), 1072–1083. doi:10.1037/0735-7044.119.4.1072

Milán FJ, Puelles L. Patterns of calretinin, calbindin, and tyrosine-hydroxylase expression are consistent with the prosomeric map of the frog diencephalon. *J Comp Neurol*. 2000 Mar 27;419(1):96-121. PMID: 10717642.

Nelson, RJ. 2006. *Biology of Aggression*. Oxford University Press

Newman, S.W., 1999. The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Ann NY Acad Sc*. 877: 242-257.

Nieuwenhuys, R., Ten Donkelaar, H. J., & Nicholson, C. (Eds.). (1998). *The central nervous system of vertebrates (Vol. 1)*. Springer Science & Business Media.

Northcutt RG. Some histochemical observations on the telencephalon of the bullfrog, *Rana catesbeiana* Shaw. *J Comp Neurol*. 1974 Oct 15;157(4):379-89. doi: 10.1002/cne.901570403. PMID: 4547354.

Ogawa S, Parhar IS. Role of Habenula in Social and Reproductive Behaviors in Fish: Comparison With Mammals. *Front Behav Neurosci*. 2022 Feb 10;15:818782. doi: 10.3389/fnbeh.2021.818782. PMID: 35221943; PMCID: PMC8867168.

- Oldfield, R. G., Harris, R. M., & Hofmann, H. A. (2015). Integrating resource defence theory with a neural nonapeptide pathway to explain territory-based mating systems. *Frontiers in Zoology*, 12(Suppl 1), S16. doi:10.1186/1742-9994-12-s1-s16
- O'Connell, L. A., & Hofmann, H. A. (2011). The Vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: A comparative synthesis. *The Journal of Comparative Neurology*, 519(18), 3599–3639.
- O'Connell, L. A., & Hofmann, H. A. (2012). Evolution of a Vertebrate Social Decision-Making Network. *Science*, 336(6085), 1154–1157. doi:10.1126/science.1218889
- O'Connell, L. A., Matthews, B. J., Ryan, M. J., & Hofmann, H. A. (2010). Characterization of the Dopamine System in the Brain of the Túngara Frog, *Physalaemus pustulosus*. *Brain, Behavior and Evolution*, 76(3-4), 211–225. doi:10.1159/000321715
- Pandit, R., Omrani, A., Luijendijk, M., Vrind, V., Rozen, A., Ophuis, R., ... & Adan, R. (2016). Melanocortin 3 receptor signaling in midbrain dopamine neurons increases the motivation for food reward. *Neuropsychopharmacology*, 41(9), 2241-2251. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.19>
- Parker, K., Oztan, O., Libove, R., Mohsin, N., Karhson, Sumiyoshi, R., Summers, Hinman, K., Motonaga, Phillips, J., Carson, Fung, L., Garner, & Hardan. (2019). A randomized placebo-controlled pilot trial shows that intranasal vasopressin improves social deficits in children with autism. *Science Translational Medicine*, 11(491). <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/scitranslmed.aau7356>
- Perrone. (2010). Vasotocin actions on electric behavior: interspecific, seasonal, and social context-dependent differences. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. doi:10.3389/fnbeh.2010.00052
- Pinelli, C., Jadhao, A. G., Biswas, S. P., Tsutsui, K., & D'Aniello, B. (2014). Neuroanatomical Organization of the Brain Gonadotropin-Inhibitory Hormone and Gonadotropin-Releasing Hormone Systems in the Frog *Pelophylax esculentus*. *Brain, Behavior and Evolution*, 85(1), 15–28. doi:10.1159/000368594
- Portik DM, Streicher JW, Wiens JJ. Frog phylogeny: A time-calibrated, species-level tree based on hundreds of loci and 5,242 species. *Mol Phylogenet Evol*. 2023 Nov;188:107907. doi: 10.1016/j.ympev.2023.107907. Epub 2023 Aug 25. PMID: 37633542.
- Pouso, P., Radmilovich, M., & Silva, A. (2017). An immunohistochemical study on the distribution of vasotocin neurons in the brain of two weakly electric fish, *Gymnotus omarorum* and *Brachyhypopomus gauderio*. *Tissue and Cell*, 49(2), 257–269. doi:10.1016/j.tice.2017.02.003

Pouso, P. (2023). Influencia de factores físicos en la actividad vocal anual de una rana arbórea sudamericana. IV Reunión de Biología del Comportamiento del Cono Sur.

Powers, J. B., Newman, S. W., & Bergondy, M. L. (1987). MPOA and BNST lesions in male Syrian hamsters: differential effects on copulatory and chemoinvestigatory behaviors. *Behavioural brain research*, 23(3), 181–195. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(87\)90019-2](https://doi.org/10.1016/0166-4328(87)90019-2)

Pulido, M., Akle, V., & Amézquita, A. (2019). Vasotocin immunoreactivity in the brain of frog species of the dendrobatoidea superfamily. *The FASEB Journal*, 33(S1). https://doi.org/10.1096/fasebj.2019.33.1_supplement.448.6

Rahy, R., Asari, H., & Gross, C. (2022). Sensory-thresholded switch of neural firing states in a computational model of the ventromedial hypothalamus. *Frontiers in Computational Neuroscience*, 16. <https://doi.org/10.3389/fncom.2022.964634>

Rhen, T., & Crews, D. (2001). Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA in the brain and reproductive tissues of the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *The Journal of Comparative Neurology*, 437(4), 385–397. doi:10.1002/cne.1290

Rigney N, de Vries GJ, Petrulis A, Young LJ. Oxytocin, Vasopressin, and Social Behavior: From Neural Circuits to Clinical Opportunities. *Endocrinology*. 2022 Sep 1;163(9):bqac111. doi: 10.1210/endo/bqac111. PMID: 35863332; PMCID: PMC9337272.

Rodriguez-Santiago, M., Russi, E., Sanchez, M., Pouso, P., Hoke, K. 2023. Variability in the vocal repertoire of a South American tree frog. Society for integrative and comparative biology meeting. Austin, Texas

Sabatier, N., & Leng, G. (2008). Spontaneous discharge characteristic of neurons in the ventromedial nucleus of the rat hypothalamus in vivo. *European Journal of Neuroscience*, 28(4), 693–706. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06389.

Saper, C. B., & Sawchenko, P. E. (2003). Magic peptides, magic antibodies: Guidelines for appropriate controls for immunohistochemistry. *The Journal of Comparative Neurology*, 465(2), 161–163. doi:10.1002/cne.10858

Sazdanovic, M., Mitrovic, S., Todorovic, M., Vulovic, M., Jeremic, D., Milosavljevic, Z., ... & Ognjanović, N. (2016). Morphology of human nucleus accumbens neurons based on the immunohistochemical expression of gad67. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*, 17(4), 297-302. <https://doi.org/10.1515/sjecr-2016-0041>

Segi-Nishida, E., Sukeno, M., Imoto, Y., Kira, T., Sakaida, M., Tsuchiya, S., ... Okuno, Y. (2013). Electroconvulsive seizures activate anorexigenic signals in the ventromedial nuclei of the hypothalamus. *Neuropharmacology*, 71, 164–173. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.03.

- Simmons, A. M., Horowitz, S. S., & Brown, R. A. (2007). Cell Proliferation in the Forebrain and Midbrain of the Adult Bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Brain, Behavior and Evolution*, 71(1), 41–53. doi:10.1159/000108610
- Slimp, J. C., Hart, B. L., & Goy, R. W. (1978). Heterosexual, autosexual and social behavior of adult male rhesus monkeys with medial preoptic-anterior hypothalamic lesions. *Brain research*, 142(1), 105–122. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(78\)90180-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90180-4)
- Smeets, W. J. A. J., & González, A. (2001). Vasotocin and mesotocin in the brains of amphibians: State of the art. *Microscopy Research and Technique*, 54(3), 125–136.
- Ten donkelaar HJ. Chapter 19. Anurans. In: Nieuwenhuys R, Ten Donkelaar HJ, Nicholson C, editors. *The central nervous system of vertebrates*. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer Verlag, 1998; p. 1151–1314
- Tinbergen, N.1964. *Conducta social en los animales: con referencia especial a los vertebrados*. UTEHA. México
- Tong J, Hornykiewicz O, Furukawa Y, Kish SJ. Marked dissociation between high noradrenaline versus low noradrenaline transporter levels in human nucleus accumbens. *J Neurochem*. 2007 Sep;102(5):1691-1702. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04636.x. Epub 2007 May 4. PMID: 17484728.
- Tran, P. V., Akana, S. F., Malkovska, I., Dallman, M. F., Parada, L. F., & Ingraham, H. A. (2006). Diminished hypothalamic bdnf expression and impaired VMH function are associated with reduced SF-1 gene dosage. *The Journal of Comparative Neurology*, 498(5), 637–648. doi:10.1002/cne.21070
- Traniello IM, Robinson GE. Neural and Molecular Mechanisms of Biological Embedding of Social Interactions. *Annu Rev Neurosci*. 2021 Jul 8;44:109-128. doi: 10.1146/annurev-neuro-092820-012959. PMID: 34236891.
- Trecki, J., Brailoiu, G., & Unterwald, E. (2010). Localization of cxcr4 in the forebrain of the adult rat. *Brain Research*, 1315, 53-62. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.12.015>
- Tsuneoka, Y., Maruyama, T., Yoshida, S., Nishimori, K., Kato, T., Numan, M., & Kuroda, K. O. (2013). Functional, anatomical, and neurochemical differentiation of medial preoptic area subregions in relation to maternal behavior in the mouse. *Journal of Comparative Neurology*, 521(7), 1633–1663. doi:10.1002/cne.23251
- van Dis, H., & Larsson, K. (1971). Induction of sexual arousal in the castrated male rat by intracranial stimulation. *Physiology & behavior*, 6(1), 85–86. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(71\)90021-7](https://doi.org/10.1016/0031-9384(71)90021-7)

- Viskaitis, P., Irvine, E. E., Smith, M. A., Choudhury, A. I., Alvarez-Curto, E., Glegola, J. A., ... Withers, D. J. (2017). Modulation of SF1 Neuron Activity Coordinately Regulates Both Feeding Behavior and Associated Emotional States. *Cell Reports*, 21(12), 3559–3572. doi:10.1016/j.celrep.2017.11.089
- Volkow, N., Wang, G., & Baler, R. (2011). Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. *Trends in Cognitive Sciences*, 15(1), 37-46. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2010.11.001>
- Wada, M., & Gorbman, A. (1977). Relation of mode of administration of testosterone to evocation of male sex behavior in frogs. *Hormones and behavior*, 8(3), 310–319. [https://doi.org/10.1016/0018-506x\(77\)90005-8](https://doi.org/10.1016/0018-506x(77)90005-8)
- Wang, Z., Liu, Y., Young, L., & Insel, T. (2000). Hypothalamic vasopressin gene expression increases in both males and females postpartum in a biparental rodent. *Journal of Neuroendocrinology*, 12(2), 111-120. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2000.00435>.
- Wersinger, S.R., Martin, L.B. 2009. Optimization of laboratory conditions for the study of social behavior. *ILAR Journal*, 50(1), 64-80
- Wilczynski, W., Quispe, M., Muñoz, M. I., & Penna, M. (2017). Arginine Vasotocin, the Social Neuropeptide of Amphibians and Reptiles. *Frontiers in Endocrinology*, 8.
- Yamamoto, R., Ahmed, N., Ito, T., Gungor, N., & Paré, D. (2018). Optogenetic study of anterior bnst and basomedial amygdala projections to the ventromedial hypothalamus. *Eneuro*, 5(3), ENEURO.0204-18.2018. <https://doi.org/10.1523/eneuro.0204-18.2018>
- Young, L. J., & Flanagan-Cato, L. M. (2012). Editorial comment: Oxytocin, vasopressin and social behavior. *Hormones and Behavior*, 61(3), 227–229. doi:10.1016/j.yhbeh.2012.02.019
- Young, L., Wang, Z., Cooper, T., & Albers, H. (2000). Vasopressin (v1a) receptor binding, mrna expression and transcriptional regulation by androgen in the syrian hamster brain. *Journal of Neuroendocrinology*, 12(12), 1179-1185. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2000.00573>.
- Ziegler, L., Arim, M., & Narins, P. M. (2011). Linking amphibian call structure to the environment: the interplay between phenotypic flexibility and individual attributes. *Behavioral Ecology*, 22(3), 520–526. <https://doi.org/10.1093/beheco/arr011>