

## **Neuroplasticidad durante la estimulación sonora del ave cantora (*Serinus canaria*)**

Alba Lucía Botero Bedoya<sup>1,2</sup>, Gloria Patricia Cardona-Gómez<sup>1</sup>, Rafael Andrés Posada-Duque<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Área de neurobiología celular y molecular, Grupo de Neurociencias de Antioquia, Universidad de Antioquia. <sup>2</sup>Grupo de Ecología y Evolución de vertebrados, Universidad de Antioquia.

<sup>3</sup>Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Carmen de Viboral, Colombia.

Autor correspondencia: Rafael Andrés Posada-Duque (rafael.posada@udea.edu.co). Calle 62 # 52-59, Torre 1, laboratorio 412, Grupo de Neurociencias, SIU, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

**Abreviaciones:** AFP, Anterior Forebrain Pathway CNS; BLAST, Basic Local Alignment Search Tool; Central Nervous System; HVC, High Vocal Center; NT, Neurotransmitter; PSD-95, postsynaptic Density Protein 95; RA, Robust nucleus of the Arcopallium; MAP2, Microtubule-Associated Protein 2.

**Declaración de significancia:** Este trabajo muestra los patrones de expresión diferencial en marcadores de plasticidad en el área del Hipocampo y HVC en relación con la edad y el estímulo. Encontramos un comportamiento similar en individuos de 4 y 10 Meses respecto a la cantidad de protrusiones de F-actina, sinapsis y promedio de spots de Sinapsina y PSD95, y observamos como estos variaban de acuerdo con la fase de aprendizaje y el tratamiento de manera diferencial en ambas áreas, lo que vincula las modificaciones que subyacen el aprendizaje respecto a la función del Hipocampo Y HVC propiamente. Estos hallazgos aportan al entendimiento de los cambios funcionales y estructurales que se dan durante el aprendizaje y memoria. Se propone una nueva visión donde el hipocampo participa integralmente en el aprendizaje del canto. Adicionalmente sugerimos la receptividad y respuesta de canarios de 8 Meses ante el estímulo posee una canción cristalizada representada por la neuro estabilidad a la canción aprendida.

## Resumen

El desarrollo del aprendizaje de la canción requiere funciones sensoriales y motoras coordinadas en un contexto de maduración neural. A medida que el ave juvenil aprende la canción se da una serie de cambios en el comportamiento de la canción que se reflejan en cambios subyacentes en la plasticidad cerebral. Entre los mecanismos de plasticidad se encuentran las modificaciones estructurales en las espinas dendríticas y los cambios en la potenciación de las sinapsis. Utilizando marcadores para ambos tipos de plasticidad, se procedió a evaluar los cambios en la expresión de proteínas como Sinapsina y PSD95 para sinapsis y MAP-2 y Factina para reconocer espinas dendríticas. Por lo tanto, se realizó estimulación sonora o no (controles) a individuos de *Serinus canaria* (*S. canaria*) de 4 meses de edad (juveniles en proceso de construcción de su canción) y de 8 y 10 meses de edad (adultos que posiblemente poseen una canción plástica o cristalizada). Se realizó cortes sagitales seriados de cerebro e inmunofluorescencias de las proteínas Sinapsina/PSD95 y MAP-2/Factina para etiquetar y posteriormente cuantificar las proteínas. Encontramos un patrón similar en individuos de 4 y 10 Meses asociados a una fase plástica y una expresión reducida en individuos de 8 meses que posiblemente hayan cristalizado su canción. Adicionalmente observamos una expresión diferencial en las áreas del hipocampo y HVC del cerebro aviar asociado a la función de las áreas, donde el estímulo en el hipocampo parece tener un efecto en el remodelamiento o eliminación de espinas y posible potenciación de sinapsis. Por el contrario, HVC responde al estímulo en un aumento de las protrusiones, pero casi sin variar las conexiones sinápticas. En conclusión, la expresión de los marcadores depende de la fase de aprendizaje, el área y la exposición al estímulo auditivo y adicionalmente hay un vínculo en el área del hipocampo en el proceso de aprendizaje y estabilidad de la canción en canarios, incluso en aquellos que han cristalizado su canción.

**Palabras claves:** Hipocampo, HVC, Espinas dendríticas, sinapsis, plasticidad sináptica.

## Introducción

El proceso mediante el cual los pájaros cantores machos jóvenes aprenden las características de las canciones de un macho adulto de su propia especie tiene fuertes similitudes con la adquisición del habla en bebés humanos (1). Tanto los humanos como las aves cantoras poseen fases de aprendizaje similares. Primero, hay una memorización auditiva del discurso o las canciones a las que están expuestos, también denominada fase sensorial. Luego, durante la fase sensoriomotora, hay una fase de transición cuando los individuos jóvenes comienzan a vocalizar, lo que se denomina balbuceo en los bebés y subsongo en las aves (2)(3). Estas vocalizaciones primitivas se convierten gradualmente en un discurso o canción para adultos (4), conocido como "cristalización" de la canción, un proceso en el que la canción se vuelve altamente estereotipada y, por lo general, mucho menos dependiente de la retroalimentación auditiva (5). En aves cantoras se ha observado que la fase sensorial se da ~25-60 días después del nacimiento y es a partir de ~35 días después del nacimiento que realizan una retroalimentación auditiva para hacer coincidir la canción producida respecto a la aprendida (6).

Existen ciertos patrones o líneas temporales dependiente de la variación estacional en el proceso de aprendizaje y memoria del canto que se ha asociado a cambios fisiológicos en regiones del cerebro aviar; por ejemplo, en los gorriones de corona blanca, la fase sensorial y sensoriomotora del aprendizaje se puede separar en el tiempo (7); en contraste, en los pinzones Cebra, ambas fases se superponen ampliamente y en canarios o "aprendices abiertos", tienen la capacidad de continuar o recapitular el proceso inicial de aprendizaje incluso siendo adultos (8).

Estos procesos de aprendizaje y memoria de la canción están mediados por sustratos neurales en un conjunto de regiones cerebrales interconectadas también denominado el sistema de la canción. Este sistema de canciones se puede dividir en dos vías funcionales: la vía motora directa, necesaria para la producción de canciones, y la vía anterior del cerebro (AFP), una vía de los ganglios corticales-basales necesaria para el aprendizaje de la canción y algunas formas de plasticidad de la canción adulta pero no para la producción de canciones aprendidas. Ambas vías comparten un núcleo común llamado High Vocal Center (HVC)(9).

HVC es un área del cerebro del nidopallio caudal de aves cantoras con un volumen de aproximadamente  $0,4 \text{ mm}^3$ . Se demostró que la estimulación eléctrica de HVC provoca vocalizaciones complejas que forman parte de la canción del ave (10). En HVC convergen aferencias sensoriomotoras: recibe proyecciones principalmente de regiones auditivas, pero se

proyecta en el área motora primaria RA y Área X de la AFP. En síntesis esta vía ejerce control sobre la vocalización y sus conexiones son esenciales para cantar canciones aprendidas (5).

Por otro lado, las aves también adquieren y muestran recuerdos robustos de tipo episódico, como los recuerdos espaciales, que dependen del Hipocampo (11). A pesar de que el Hipocampo es posiblemente el sistema funcional del cerebro mejor estudiado, no se ha alcanzado un consenso detallado. El hipocampo se caracteriza clásicamente como "la puerta de entrada a la memoria", pero está claro que el hipocampo no es el "disco duro" del cerebro. Aunque tiene cierta capacidad de almacenamiento de memoria, este almacenamiento es transitorio y, por lo tanto, la función del hipocampo parece ser preparar el contenido para el almacenamiento a largo plazo en las áreas corticales (12).

Los eventos moleculares desencadenados por la canción pueden conducir a cambios duraderos en las propiedades de las neuronas (por ejemplo, excitabilidad, capacidad de respuesta a la estimulación, conectividad) que podrían ser la base de la formación de la memoria del canto de los pájaros (4) y dan paso a una serie de modificaciones necesarias durante el proceso de aprendizaje y memoria. El conjunto de fenómenos que da origen a dichas modificaciones se conoce como plasticidad, la cual comprende la morfogénesis de las espinas dendríticas, la sinaptogénesis, la arborización dendrítica y neurogénesis (13). El mantenimiento de esta plasticidad neuronal requiere de eventos de expresión génica dependientes de la estimulación, de hecho, muchos genes están restringidos en su expresión espacial y temporal en el sistema de canciones. Se ha observado que la base de esta regulación extremadamente compleja radica en las sinapsis, los sitios de contacto entre las neuronas. En el nivel presináptico, los estímulos eléctricos se traducen en señales químicas, es decir, la liberación de neurotransmisores (NT), que luego se reconocen y traducen en una respuesta biológica apropiada (eléctrica o metabólica, o ambas) en el nivel post-sináptico (14).

Uno de los cambios derivados en la sinapsis en consecuencia de la plasticidad se da en las espinas. Las espinas dendríticas son pequeñas protrusiones presentes en las dendritas capaces de cambiar su morfología en minutos, ajustándose rápidamente a los cambios en el balance iónico post-sináptico (15). Al igual que los marcadores anteriores, MAP2, es una proteína asociadas a microtúbulos que es esencial en la neurogénesis, dendritogénesis, y estabilización del citoesqueleto dentrítico. MAP2 puede sintetizarse localmente dentro de las dendritas, lo que sugiere un papel para MAP2 en las alteraciones dendríticas inducidas por el aprendizaje (16). En las espinas de las dendritas, se encuentra la región encargada de recibir los contactos axonales presinápticos (ricos en sinapsina), la densidad de la post-sinapsis (PSD). Específicamente, la

proteína PSD95 se encuentra mayoritariamente en las terminales post-sinápticas de las sinapsis glutamatérgicas. PSD95, es una proteína tipo plataforma que recluta los receptores postsinápticos, al citoesqueleto y canales de potasio, los cuales son determinantes en la actividad sináptica (17). Por otro lado, las sinapsinas han sido ampliamente descritas en la formación de sinapsis y la plasticidad; al parecer son determinantes para el ajuste fino de la transmisión sináptica y para la remodelación sináptica (14).

De acuerdo con la información anterior un análisis que comprende los cambios de la expresión de proteínas involucradas en la plasticidad en función de la edad es novedoso. A pesar de la gran cantidad de conocimiento sobre los roles de núcleos específicos en la producción y el aprendizaje de canciones, sorprendentemente se sabe muy poco acerca de cómo la estimulación sonora genera cambios de marcadores de las espinas dendríticas y sinapsis en aves que no obedecen a la estacionalidad. Por lo anterior nos enfocamos en determinar los cambios de las espinas dendríticas y las sinapsis (F-actin, MAP-2, PSD95, sinapsina) en el núcleo High Vocal Center (HVC) e Hipocampo en canarios de diferentes edades estimulados con una canción de un conoespecífico.

## **Materiales y Métodos**

**Manipulación animal:** Dentro de la Seccional Oriente de la Universidad de Antioquia (Carmen de Viboral, Colombia), se mantuvieron las aves con un ciclo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, una humedad relativa entre 50-60% y una temperatura entre 15°-24°C. Las aves fueron manipuladas de acuerdo con el protocolo de experimentación animal aprobado por el Comité de Ética para la Experimentación con Animales de la Universidad de Antioquia, en el acta 119 del 14 de agosto de 2018. Las aves utilizadas fueron machos *Serinus canaria* de 4, 8 y 10 meses de edad; para cada edad se utilizaron 6 individuos: 3 sin estimulación y 3 con estimulación bioacústica.

**Tratamiento:** Las aves controles de este estudio fueron canarios aislados por 45 minutos en absoluto silencio. Las aves estimuladas correspondieron a los canarios aislados por quince minutos en absoluto silencio, los cuales posteriormente fueron estimulados de manera auditiva con la canción del tutor durante 45 minutos. Posterior a este tiempo, las aves fueron anestesiadas con isoflurano y decapitadas inmediatamente. Luego se realizó una rápida extracción del cerebro y fijación en PFA 4% preparado en Buffer de citoesqueleto, y se crioprotegieron en sacarosa al 30%. Los cerebros fueron cortados en secciones de 30  $\mu\text{m}$  de espesor en el plano parasagital en un criostato para las pruebas histológicas (Fig. 1A)Y

**BLAST y Dot Blot:** Previo a este procedimiento se realizó un BLAST de la secuencia de reconocimiento de los Anticuerpos disponibles para PSD95, Sinapsina y MAP2 respecto a la secuencia en canarios para determinar el porcentaje de homología entre ambos a través de GenBank, encontramos un porcentaje homología aproximada del 70% para PSD95, 75% para sinapsina y 82% para MAP2. Posteriormente se realizó el Dot Blot para confirmar la afinidad de los Anticuerpos, se tomó un hemisferio del cerebro aviar y se realizaron cuatro cortes de aproximadamente 2 mm cada uno, posteriormente cada corte se homogenizó en buffer de lisis y se centrifugó para la extracción de las proteínas. Posteriormente en una fracción de membrana de nitrocelulosa utilizando una micropipeta se colocó 10 µl de cada una de las proteínas que corresponde a cada corte, y 10 µl de cada anticuerpo PSD95 (1:500, Anti-PSD-95 (Ab-2) Mouse mAb (7E3-1B8) SIGMA CP35), sinapsina (1:250, Anti-Synapsin I Rabbit pAb SIGMA MILLIPORE 574778) y MAP2 (1:1000, Anti-MAP2 antibody, Mouse Monoclonal SIGMA M9942) como control del anticuerpo, una vez seco, se bloqueó la membrana con leche en polvo al 5% en TTBS (Tris 50 mM, NaCl 0,5 M, Tween-20 al 0,05%, pH 7,4) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubó la membrana con anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente en TTBS. Posteriormente se incubó la membrana con anticuerpo secundario acoplados a fluoróforos IDR-700 e IDR-800 LICOR anti-mouse (MAP2 y PSD95) y anti-Rabbit (Sinapsina) durante 1 hora a temperatura ambiente en TTBS. La presencia del inmunocomplejo fue determinada utilizando LICOR - Odyssey.

**Inmunohistoquímica:** Para realizar los marcajes inmunohistoquímicos de marcadores: anti-PSD95 (1:500, mouse, (Ab-2) Mouse mAb (7E3-1B8) SIGMA CP35), anti-sinapsina (1:250, rabbit, pAb SIGMA MILLIPORE 574778) y MAP2 (1:1000, mouse Monoclonal SIGMA M9942). Se realizaron lavados con PB 0.1 M (pH 7.4) por 5 minutos y permeabilización con PB 0.1 M y tritón al 30% por 30 minutos. La inhibición de la peroxidasa endógena se llevó a cabo con una solución 1:1 de PB 0.1 con metanol y una concentración del 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 20 minutos. El bloqueo de antígenos inespecíficos se efectuó con una solución de pre-incubación de PB 0.1M con BSA al 5% por una hora. La incubación de los anticuerpos primarios se realizó en una solución de PB 0.1M, BSA 0,3% y tritón 0,3% por 3 días a 4°C. Pasado el tiempo de incubación se realizó la incubación con el anticuerpo secundario (biotin-conjugated anti-mouse para PSD95 y MAP2, anti-rabbit para Sinapsina) a una concentración de 1:250 diluidos en solución de incubación por 1h a temperatura ambiente. Luego se realizó la amplificación de la señal con el kit avidina-biotina (1: 250 reactivos A y B, kit de tinción de peroxidasa estándar ABC, 32020; Pierce) por 1h a temperatura ambiente. Finalmente se reveló la señal con diaminobencedina con 0.08% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 4 minutos; y se montaron las placas utilizando consulmount (Fig. 1B).

**Inmunofluorescencia:** Se realizaron lavados con PB 0.1M durante 5 minutos, posteriormente se realizó la permeabilización del tejido utilizando PB 0.1M y Triton al 30% durante 30 minutos. La autofluorescencia se eliminó usando 50mM de Cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl) durante 10 minutos. Posteriormente se bloquearon con solución de bloqueo. Los tejidos se incubaron durante 3 días a 4°C con anticuerpos primarios de ratón contra MAP2 (1:1000, mouse Monoclonal SIGMA M9942), PSD95 (1:500, mouse (Ab-2) Mouse mAb (7E3-1B8) SIGMA CP35) y Sinapsina (1:250, rabbit, pAb SIGMA MILLIPORE 574778). Posteriormente, se incubaron con anticuerpos secundarios Alexa 594 y 488 (1:750 Molecular Probes), Hoechst 33258 (1:5000, Invitrogen) y falloidina conjugada con Alexa 594 (1:400, molecular Probes). Los tejidos se fijaron a las placas portaobjetos con Fluorosave (Calbiochem). Las observaciones y capturas de los tejidos se realizaron utilizando un microscopio confocal laser de barrido Olympus FV1000 utilizando el objetivo de inmersión en aceite 60x (NA 1.42).

**Análisis de imágenes:** Los análisis de imágenes se realizaron utilizando ImageJ Pro y Fiji para la colocalización. Para cuantificar el número de protrusiones de F actina, se procedió en ImageJ Pro inicialmente calibrando la imagen de acuerdo a los parámetros del microscopio, posteriormente se aplicó un filtro para mejorar la imagen y hacer visible estructuras pequeñas (Large Spectral filters) y posteriormente se modificaron los parámetros para filtrar las protrusiones utilizando un Diámetro entre 0,2 a 0,1 um y una longitud entre 0.50- 3 um; para finalizar se cuantifico y se generó una tabla en Excel con el número de objetos y los parámetros medidos para los análisis estadísticos.

Para la colocalización en Fiji una vez teníamos la imagen se procedió a separar cada canal específicamente rojo (PSD95) y verde (Sinapsina), posteriormente se ajustó utilizando Threshold (150 rojo, 120 verde) y una vez segmentados ambos canales mediante Image calculator se generó la intersección entre ambos canales o la colocalización de ambas señales y posteriormente se cuantifico para los estadísticos.

**Análisis estadístico:** Para realizar comparaciones entre las muestras se usaron pruebas ANOVA de dos factores para los datos (normales); no fue necesario hacer pruebas no-paramétricas. Se realizó una comparación entre cada uno de los tratamientos utilizando la prueba de Tuckey. Las comparaciones entre grupos tratados en una edad específica se realizaron a través de la prueba t-test. Los resultados se consideraron significativos con un valor-*P* inferior al nivel de significancia ( $\alpha=0,05^{**}$ ,  $0,010^{***}$  o  $0,001^{****}$ ).

## **Resultados**

### **Los cortes de cerebro de canario donde se encuentran los núcleos de la canción expresan los marcadores de plasticidad**

Nosotros verificamos en cortes sagitales que las regiones del Hipocampo, HVC, RA y Área X estaban localizadas efectivamente entre 1,05 mm y 1,65mm aproximadamente, a partir de la línea media (Fig. 2A). Además, comprobamos mediante un BLAST y Dot Blot la afinidad de las secuencias de reconocimiento de los anticuerpos (producidos para ratones, humanos) sobre los marcadores de plasticidad en cerebros de canarios. Nosotros verificamos una robusta expresión de estos marcadores de sinapsis específicamente en los núcleos de la canción (Fig. 2B-C).

### **La estimulación sonora afecta diferencialmente las protrusiones de F-actina en el área del Hipocampo y HVC en individuos de 4 y 10 Meses**

Se ha observado que, durante el proceso de aprendizaje, las espinas se forman y eliminan constantemente, y se cree que esta dinámica de las espinas se correlaciona directamente con el aprendizaje en aves cantoras (18); por esta razón, se cuantificaron las protrusiones de F-actina cercanas a procesos dendríticos, positivas para MAP2, tanto en el Hipocampo y el núcleo HVC en las diferentes edades con estimulación sonora. Entonces, se observó en el Hipocampo, la presencia de una mayor cantidad de protrusiones de F-actina en edades correspondientes a 4 y 10 Meses en comparación a la edad de 8 Meses en controles (tendencia,  $p= 0.0650$ ). Específicamente, en el hipocampo de las aves de 4 y 10 meses se observó una ligera disminución de las protrusiones F actina posterior al estímulo (Fig. 3B y 4); posiblemente a que las espinas recién formadas son más propensas de ser eliminadas (19). Por otro lado, en el núcleo HVC se observó un patrón opuesto, en el cual las aves 4 y 10 meses mostraron un incremento el número de protrusiones posterior al estímulo sonoro; efecto que no fue replicado en las aves de 8 Meses (Fig. 3B y 5); posiblemente a que esta área está relacionada con el relevo sensoriomotor y por ende promoción más dinámica de las espinas (Fig.3B, 4 y 5). Estos resultados sugieren cambios de las espinas dendríticas inducidos por la estimulación son dependientes del área y la edad; en el cual el Hipocampo y el núcleo HVC poseen un efecto diferencial asociados a sus funciones.

### **La longitud y diámetro de las protrusiones de F-actina son consistentes en las edades y grupos experimentales**

Adicional a la cuantificación de protrusiones de F-actina, medimos el diámetro y longitud de estas protrusiones, ya que estas medidas pueden dar razón de la morfología de las espinas. Se observó que en las tres edades (4, 8 y 10 Meses) el tamaño y longitud fueron consistentes tanto

en el hipocampo como en el área HVC (Fig. 5B, C). El Diámetro en ambas áreas tanto en controles como estimulados se encuentra en un rango entre 0,62 y 0,72  $\mu\text{m}$  y el promedio de longitud esta entre 0,83 y 0,86  $\mu\text{m}$  en los tres grupos. De manera interesante, los individuos de 10 meses en el área HVC mostraron una diferencia entre estimulados respecto al control en el diámetro y longitud de las protrusiones, que a pesar de no ser significativa ( $p= 0.6596$ ) sugieren una posible forma de plasticidad que probablemente estén una nueva fase sensoriomotora relacionada a la plasticidad estructural de las espinas.

### **Patrones de expresión de PSD95 y sinapsina diferenciales en el Hipocampo**

Las sinapsinas son proteínas asociadas con vesículas presinápticas (20), se ha observado que su función está involucrada en el mantenimiento sináptico (21). Al igual que la sinapsina, PSD95 juega un papel importante en la estabilización de la sinapsis y en la plasticidad sináptica (22), por tanto se realizó una cuantificación individual de proteínas pre y postsinápticas (Sinapsina y PSD95) para observar la variación en la expresión diferencial en las edades. En el hipocampo, se encontró una disminución de sinapsina a medida que las aves eran mayores en edad; sin embargo, no se modificó su expresión por la estimulación sonora; sugiriendo un refinamiento presináptico dependiente de la edad (Fig. 6 A-B). Por otro lado, nosotros no observamos cambios de PSD95 en el área del hipocampo respecto a las tres edades (Fig. 6A), sin embargo, en aves de 8 meses observamos una disminución de la expresión posterior al estímulo sonoro (Fig. 6-C); sugiriendo que una vez la canción ha sido cristalizada (8 meses), el estímulo sonoro no se despotencia la postsináptico (Fig. 6C). Estos hallazgos sugieren una posible relación opuesta en la estabilidad de la pre y postsinapsis.

Respecto a la expresión de ambas proteínas en el área HVC (Fig. 7A) se observó un incremento de ambas proteínas: Sinapsina (Fig. 7A-B) y PSD95 (Fig. 7A-C) en aves de 8 meses respecto a las edades de 4 y 10 meses; efecto que no fue dependiente de la estimulación sonora. Estos resultados nos sugieren que el área HVC parece ser más estable respecto a la expresión de estos marcadores de plasticidad sináptica posterior a la estimulación sonora; y que posiblemente los individuos de 8 meses poseen marcadores de pre y postsinapsis preestablecidos para una canción ya aprendida o cristalizada.

## **Efecto diferencial del estímulo en las sinapsis en el área del Hipocampo y HVC, muestra tendencias similares en aves de 4, 8 y 10 Meses**

La estabilización de las espinas requiere el ensamblaje de elementos pre y postsinápticos. Estos complejos proteicos pre y postsinápticos modulan la coordinación estructural y funcional en las sinapsis en el cerebro (23); por esta razón cuantificamos la colocalización de dos proteínas sinápticas sinapsina y PSD-95 en el Hipocampo (Fig. 8A) y el núcleo HVC (Fig. 9A), respectivamente. Al realizar un comparativo por edades en aves control, en el hipocampo de 8 meses se presentaron mayor número de colocalizaciones de sinapsina-PSD95 respecto a las aves de 4 y 10 meses (Fig. 8 A-B) ( $p= 0.0239$ ). Ahora bien, cuando analizamos el efecto de la estimulación sonora; nosotros observamos en el Hipocampo de aves de 4 y 10 meses un incremento de puntos colocalizantes posterior al estímulo (Fig. 8 A-B); efecto que no fue observado en los hipocampos de las aves de 8 meses.

En contraste, en el área HVC no observamos cambios en las sinapsis dependientes de la edad o posterior a la estimulación sonora (Fig. 9 A-B), lo que nos sugiere que durante la retroalimentación auditiva se da una estabilización de estos puntos sinápticos en el HVC.

### **Discusión**

En este estudio mostramos un posible vínculo entre el período de aprendizaje de la canción (edades) y la respuesta diferencial de las espinas y sinapsis del área (hipocampo, HVC), posterior a la experiencia o estímulo sonoro. Nosotros sugerimos que la estimulación sonora genera plasticidad de espinas dendríticas en el hipocampo (disminución) y en el HVC (aumento); efecto que solo estuvo relacionado con el incremento de las sinapsis en el hipocampo. Finalmente, resaltamos que la expresión de la sinapsina es dependiente de la edad y que la estimulación sonora principalmente afecta la postsinapsis en la canción cristalizada (8 meses).

Nos centramos en dos áreas cruciales en el proceso de aprendizaje y memoria de la canción, el Hipocampo y el núcleo HVC. A pesar de tener una comprensión aun incompleta de la función del hipocampo, se sabe que, aunque tiene cierta capacidad de almacenamiento de memoria, este almacenamiento es transitorio, esto implica que es una estructura, a través de la cual debe pasar toda la información, antes de que pueda memorizarse (12); los estudios en neurobiología aviar han determinado que el hipocampo es esencial para la orientación espacial en aves (24), existe una correlación entre el tamaño del hipocampo y la capacidad de acumulación de alimento en diferentes locaciones, adicionalmente el hipocampo se distingue como un sitio de expresión génica temprana inmediata en respuesta a la canción y como un sitio de síntesis de estrógenos, esteroide involucrado en el aprendizaje de la canción (25); sin embargo la asociación

respecto del aprendizaje y memoria de la canción no ha sido claramente establecida en hipocampos de machos (25)(26). Complementaria a la función de hipocampo, tanto la producción como el aprendizaje del canto de los la aves cantoras requieren el núcleo premotor aviar HVC (27), importante jerárquicamente en el sistema de la canción ya que posee proyecciones tanto en la vía motora como la vía AFP. En función de su rol en el proceso de aprendizaje y memoria del canto, los cambios de plasticidad funcional y estructural en ambas áreas permiten dilucidar algunos de los mecanismos que intervienen en este proceso.

Los canarios en neurobiología han sido ampliamente utilizados, para definir los cambios neuroanatómicos causados por la plasticidad estacional (28), la dependencia de señales hormonales en el aprendizaje y producción de la canción (29)(30), adicionalmente estudios donde determinan el cambio de la canción en función de la edad (31) y estudios con genes implicados en la plasticidad cerebral como ZENK (32). Teniendo en cuenta las investigaciones previamente mencionadas, quisimos realizar un estudio descriptivo de los cambios sinápticos dependiente de la edad, el área y la estimulación sonora de tres grupos de canarios, donde no se presenta una estacionalidad marcada como es en trópico.

Para esto, inicialmente mostramos como la experiencia sensorial o la exposición a la canción durante un periodo de 45 minutos impacta en la dinámica de las espinas dendríticas. Estas estructuras altamente dinámicas, que se creen subyacen el proceso de aprendizaje y memoria.

A través de la microscopia confocal capturamos y procesamos la cantidad promedio de protrusiones de F actina que potencialmente podían ser espinas dendríticas, para darnos una idea de los cambios de la densidad de las espinas en las diferentes edades y tratamientos. Encontramos un patrón similar en la cantidad de protrusiones en edades de 4 y 10 Meses lo que nos da cuenta de una posible asociación de la fase de aprendizaje aun plástica en individuos de 4 meses que posiblemente se esté dando nuevamente en canarios de 10 Meses; respecto a la edad de 8 Meses su comportamiento obedece a una fase diferente del proceso de aprendizaje y memoria de la canción, en esta edad, los canarios ya han cristalizado su canción, por lo tanto la cantidad de espinas difiere (aunque no significativamente, debido a que teníamos un número relativamente pequeño de muestras para cada grupo) respecto a individuos de 4 y 10 meses, ya que a pesar del estímulo auditivo estos individuos (8 Meses) parecen no responder y por lo tanto observamos una reducción de F-actina que puede estar asociado a una eliminación de sinapsis redundantes (33), esta transición a niveles más bajos de espinas puede reflejar un compromiso con un comportamiento vocal aprendido (34). Adicionalmente encontramos un patrón diferencial en ambas áreas, en el hipocampo se observó una expresión reducida de F-actina

asociado a una posible retracción o eliminación de espinas pequeñas susceptibles a ser eliminadas mientras en el núcleo HVC se observó el patrón opuesto donde posterior al estímulo la cantidad de protrusiones aumentaron en individuos de 4 y 10 Meses, asociado a su capacidad plástica de generar nuevas conexiones que les permiten explorar el campo sonoro. En conclusión, el aprendizaje motor y la experiencia sensorial novedosa implican no solo la formación de espinas dendríticas en individuos que se encuentran en una fase plástica del aprendizaje (4 y 10 Meses), sino también la eliminación de las conexiones establecidas en los individuos de 4, 8 y 10 Meses tanto en HVC como en el hipocampo.

Posteriormente analizamos dos parámetros de las protrusiones de Factina ya que, las espinas se agrandan, encogen y retraen a lo largo de la vida útil (35) y los estudios *in vitro* muestran que las formas de fortalecimiento sináptico que se cree que subyacen en el aprendizaje van acompañadas de un aumento en la estabilidad, el número y el tamaño de las espinas dendríticas (34), y en función de esta premisa medimos el diámetro y la longitud para observar posibles cambios dependientes de la fase y área de estudio. No encontramos una tendencia en estos parámetros, de hecho, resultaron tener un patrón casi similar en todas las edades y tratamientos, a excepción de un aumento no significativo en individuos de 10 Meses posterior a la estimulación, tanto en el hipocampo como en HVC, asociada a la fase plástica donde nuevamente recapitulan el aprendizaje de la canción.

Las espinas dendríticas también pueden servir como indicadores estructurales de las sinapsis funcionales (35). Ya que la experiencia sensorial impulsa la plasticidad sináptica fisiológica detectable (36), que incluyen múltiples proteínas que intervienen en esta como la sinapsina (presináptica) y PSD95 (Postsinapsis), en función de este resultado también cuantificamos individualmente la cantidad de Spots de sinapsina y PSD95 en cada área para observar la tendencia de estas proteína. Encontramos una expresión diferencial en ambas áreas, en hipocampo, se observa una disminución de spots de sinapsina en función de la mayoría de edad y cuya expresión parece no estar relacionado con el estímulo sonoro sino a un refinamiento intrínseco de la edad. Respecto al comportamiento de PSD95 este aumento posterior al estímulo en individuos de 4 y 10 Meses y disminuyo en individuos de 8 Meses.

En el núcleo HVC se observó un patrón similar de Sinapsina y PSD95, con un ligero aumento posterior al estímulo, pero siendo los individuos de 8 Meses con un mayor promedio de Spots de sinapsina y PSD95 en el control, lo que sugiere una potenciación más fuerte en HVC, producto de mantener una canción estable en el tiempo, ya que ambas proteínas son determinantes importantes de la formación y / o mantenimiento de sinapsis.

Posteriormente cuantificamos los spots colocalizantes de ambas proteínas para observar posibles tendencias. Encontramos nuevamente un patrón dependiente al área y la edad, en el hipocampo aumento el promedio de colocalización inducido por el estímulo, siendo similar las proporciones en individuos de 4 y 10 Meses, que podría explicarse mediante la potenciación de canciones o segmentos de esta ya aprendidos para ser almacenados en una memoria a largo plazo. En el área HVC la cantidad de puntos colocalizantes parece no variar en individuos de 4 y 10 Meses, pero al contrario disminuyo en individuos de 8 Meses, asociado a los procesos de remodelamiento sináptico, ya que la plasticidad es más robusta en animales jóvenes y particularmente en este caso, en aquellos que se encuentran en proceso de aprendizaje (36) . En conclusión, observamos como tanto la sinapsina como PSD95 son moduladores importantes en procesos de plasticidad cerebral, y responden diferencialmente en hipocampo y HVC.

En resumen, el proceso de aprendizaje está regulado por todo un sistema complejo en el que se destacan el hipocampo y HVC, observamos una serie de modificaciones estructurales y funcionales dependientes de la experiencia, la edad y el área que, permiten la consolidación y posterior apertura del aprendizaje en el caso de canarios de 10 meses. La mayoría de las investigaciones que se han realizado en aves cantoras que comprenden el hipocampo han encontrado que es esencial para el rendimiento de la memoria espacial en pájaros cantores(37), por lo tanto el papel en el aprendizaje y memoria del canto per se en aves aún no se ha estudiado a profundidad, por eso sugerimos que le permite al ave facilitar el reconocimiento de la canción, ya que hay un cambio de expresión de los marcadores ante el estímulo. En este estudio vinculamos al hipocampo en el proceso de aprendizaje y memoria del canto en aprendices abiertos, adicionalmente observamos como individuos que una vez ya han cristalizado su canción, siguen respondiendo ante el estímulo ya sea mediante la reducción o aumento de los marcadores utilizados y una posible reorganización sináptica que puede continuar inducida por la experiencia para conciliarse con la estabilidad de la canción en individuos de 8 Meses.

### **Bibliografía**

1. Bolhuis JJ, Gahr M. Neural mechanisms of birdsong memory. Vol. 7, Nature Reviews Neuroscience. Nature Publishing Group; 2006. p. 347–57.
2. Bolhuis JJ, Eda-Fujiwara H. Birdsong and the brain: The syntax of memory [Internet]. Vol. 21, NeuroReport. 2010 [cited 2020 Apr 1]. p. 395–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20220539>
3. Doupe AJ, Kuhl PK. BIRDSONG AND HUMAN SPEECH: Common Themes and Mechanisms. Annu Rev Neurosci. 1999 Mar;22(1):567–631.

4. Moorman S, Mello C V., Bolhuis JJ. From songs to synapses: Molecular mechanisms of birdsong memory. *BioEssays* [Internet]. 2011 May [cited 2018 Nov 12];33(5):377–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21381060>
5. Mooney R. Neural mechanisms for learned birdsong. *Learn Mem* [Internet]. 2009 Nov 1 [cited 2018 Nov 12];16(11):655–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19850665>
6. Goldman SA. Neuronal development and migration in explant cultures of the adult canary forebrain. *J Neurosci* [Internet]. 1990 Sep [cited 2018 Nov 12];10(9):2931–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2204684>
7. Brainard MS, Doupe AJ. What songbirds teach us about learning. *Nature* [Internet]. 2002 May 16 [cited 2018 Nov 12];417(6886):351–8. Available from: <http://www.nature.com/articles/417351a>
8. BEECHER M, BRENOWITZ E. Functional aspects of song learning in songbirds. *Trends Ecol Evol* [Internet]. 2005 Mar [cited 2018 Nov 12];20(3):143–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16701358>
9. Sizemore M, Perkel DJ. Premotor synaptic plasticity limited to the critical period for song learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2011 Oct 18 [cited 2018 Nov 12];108(42):17492–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21969574>
10. Vicario DS, Simpson HB. Electrical stimulation in forebrain nuclei elicits learned vocal patterns in songbirds. *J Neurophysiol* [Internet]. 1995 Jun [cited 2018 Nov 12];73(6):2602–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7666168>
11. Schlinger BA, Arnold AP. Brain is the major site of estrogen synthesis in a male songbird. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(10):4191–4.
12. Kempermann G. Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. Vol. 22, *Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience; 2002. p. 635–8.
13. Citri A, Malenka RC. Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology* [Internet]. 2008 Jan 29 [cited 2018 Nov 12];33(1):18–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17728696>
14. Cesca F, Baldelli P, Valtorta F, Benfenati F. The synapsins: Key actors of synapse function and plasticity. Vol. 91, *Progress in Neurobiology*. Pergamon; 2010. p. 313–48.

15. Haber M, Zhou L, Murai KK. Cooperative Astrocyte and Dendritic Spine Dynamics at Hippocampal Excitatory Synapses. *J Neurosci* [Internet]. 2006 Aug 30 [cited 2018 Nov 13];26(35):8881–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16943543>
16. Derksen MJ, Ward NL, Hartle KD, Ivanco TL. MAP2 and synaptophysin protein expression following motor learning suggests dynamic regulation and distinct alterations coinciding with synaptogenesis. *Neurobiol Learn Mem*. 2007 Mar 1;87(3):404–15.
17. Morabito MA, Sheng M, Tsai L-H. Cyclin-Dependent Kinase 5 Phosphorylates the N-Terminal Domain of the Postsynaptic Density Protein PSD-95 in Neurons. *J Neurosci* [Internet]. 2004 Jan 28 [cited 2018 Nov 13];24(4):865–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14749431>
18. Boettiger CA, Doupe AJ. Developmentally Restricted Synaptic Plasticity in a Songbird Nucleus Required for Song Learning. *Neuron* [Internet]. 2001 Sep 13 [cited 2018 Nov 12];31(5):809–18. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627301004032>
19. Xu T, Yu X, Perlik AJ, Tobin WF, Zweig JA, Tennant K, et al. Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories. *Nature*. 2009 Dec 17;462(7275):915–9.
20. Hilfiker S, Pieribone VA, Czernik AJ, Kao HT, Augustine GJ, Greengard P. Synapsins as regulators of neurotransmitter release. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society; 1999. p. 269–79.
21. Chi P, Greengard P, Ryan TA. Synaptic Vesicle Mobilization Is Regulated by Distinct Synapsin I Phosphorylation Pathways at Different Frequencies. *Neuron* [Internet]. 2003 Apr 10 [cited 2020 Apr 21];38(1):69–78. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089662730300151X>
22. Neonatal sevoflurane anesthesia induces long-term memory impairment and decreases hippocampal PSD-95 expression without neuronal loss [Internet]. [cited 2020 Apr 21]. Available from: <https://www.europeanreview.org/article/3694>
23. Nakano M, Takagi N, Takagi K, Funakoshi H, Matsumoto K, Nakamura T, et al. Hepatocyte growth factor promotes the number of PSD-95 clusters in young hippocampal neurons. *Exp Neurol*. 2007 Oct 1;207(2):195–202.

24. Bischof HJ, Lieshoff C, Watanabe S. Spatial Memory and Hippocampal Function in a Non-Foodstoring Songbird, the Zebra Finch (*Taeniopygia guttata*). *Rev Neurosci*. 2006 Jan 1;17(1–2):43–52.
25. Bailey DJ, Wade J, Saldanha CJ. Hippocampal lesions impair spatial memory performance, but not song-A developmental study of independent memory systems in the zebra finch. *Dev Neurobiol* [Internet]. 2009 Jul 1 [cited 2020 May 28];69(8):491–504. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/dneu.20713>
26. Terpstra NJ, Bolhuis JJ, Den Boer-Visser AM. An analysis of the neural representation of birdsong memory. *J Neurosci*. 2004 May 26;24(21):4971–7.
27. Aronov D, Andalman AS, Fee MS. A specialized forebrain circuit for vocal babbling in the juvenile songbird. *Science* (80- ). 2008 May 2;320(5876):630–4.
28. Tramontin AD, Brenowitz EA. Seasonal plasticity in the adult brain. Vol. 23, *Trends in Neurosciences*. Elsevier Current Trends; 2000. p. 251–8.
29. Sartor JJ, Balthazart J, Ball GF. Coordinated and dissociated effects of testosterone on singing behavior and song control nuclei in canaries (*Serinus canaria*). *Horm Behav*. 2005 Apr 1;47(4):467–76.
30. Appeltants D, Ball GF, Balthazart J. The distribution of tyrosine hydroxylase in the canary brain: Demonstration of a specific and sexually dimorphic catecholaminergic innervation of the telencephalic song control nuclei. *Cell Tissue Res*. 2001;304(2):237–59.
31. Leitner S, Catchpole CK. Syllable repertoire and the size of the song control system in captive canaries (*Serinus canaria*). *J Neurobiol* [Internet]. 2004 Jul 1 [cited 2020 May 28];60(1):21–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/neu.10331>
32. Ribeiro S, Mello C V. Gene expression and synaptic plasticity in the auditory forebrain of songbirds. Vol. 7, *Learning and Memory*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2000. p. 235–43.
33. Yang G, Pan F, Gan WB. Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature*. 2009 Dec 17;462(7275):920–4.
34. Roberts TF, Tschida KA, Klein ME, Mooney R. Rapid spine stabilization and synaptic enhancement at the onset of behavioural learning. *Nature* [Internet]. 2010 Feb 18 [cited 2018 Nov 12];463(7283):948–52. Available from:

<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature08759>

35. Chen C-C, Lu J, Zuo Y. Spatiotemporal dynamics of dendritic spines in the living brain. *Front Neuroanat* [Internet]. 2014 May 9 [cited 2020 Apr 20];8(MAY):28. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnana.2014.00028/abstract>
36. Feldman DE. Synaptic Mechanisms for Plasticity in Neocortex. *Annu Rev Neurosci*. 2009 Jun 25;32(1):33–55.
37. Hodgson ZG, Meddle SL, Christians JK, Sperry TS, Healy SD. Influence of sex steroid hormones on spatial memory in a songbird. *J Comp Physiol A Neuroethol Sensory, Neural, Behav Physiol*. 2008 Nov 17;194(11):963–9.

### **Leyendas de las figuras**

**Figura 1. Diseño experimental. A.** Grupo experimental canarios (4, 8 y 10 Meses) expuestos a estímulo y silencio (Controles), posterior sacrificio, extracción y fijación del cerebro (PFA 4%). **B** Modelo para inmunoensayos. inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia en cortes de 30  $\mu$ m utilizando anticuerpos: Anti-MAP2, Sinapsina y PSD-95 y posterior Análisis de imágenes.

**Figura 2. Ensayo de Anticuerpos en cerebro aviar y definición de Bregma. A.** Tinción de Nissl para definir los cortes de interés donde se observan los núcleos del Sistema de la canción. **B.** Ensayo de dot blot para detectar las proteínas: Sinapsina, PSD95 Y MAP-2 en el cerebro aviar. **C.** inmunohistoquímica de Sinapsina y MAP-2 para observar la expresión de las proteínas en los núcleos del sistema de la canción.

**Figura 3. Expresión de F-actina en Hipocampo y en el área HVC en canarios. A.** Inmunofluorescencias tomadas en el microscopio confocal. Hoechst: marca núcleos en azul. Faloidina: protusiones o espinas dendríticas en rojo -Alexa 488: marca Dendritas en verde. **B.** Número de espinas o spots de F actina en aves de 4, 8 y 10 Meses. **C.** Cuantificación Promedio Spots de F-actina en el área HVC en canarios en los tres grupos experimentales. n=3; Comparaciones de Two-Way ANOVA. Código Significancia P-valor: '\*\*\*' 0.001; '\*\*' 0.01; '\*'

**Figura 4. Diámetro y Longitud de spots de F-actina en Hipocampo consistente en todos los grupos experimentales. A.** Imágenes de inmunofluorescencias tomadas en el microscopio confocal en el área del Hipocampo para los tres grupos experimentales, con detalle de imagen binarizada del canal rojo. Hoechst: marca núcleos en azul. Faloidina: protusiones o espinas dendríticas, en rojo, Alexa 488: marca Dendritas en verde. **B.** Promedio del Diámetro de Spots

de F-actina en el Hipocampo **C.** Cuantificación longitud de spots de F-actina en el Hipocampo. n=3; Comparaciones en Two-Way ANOVA. Código Significancia P-valor: '\*\*\*\*' 0.001; '\*\*' 0.01; '\*'

**Figura 5. Diámetro y Longitud de spots de F-actina en el área HVC consistente en todos los grupos experimentales con tendencia aumentar en canarios de 10 meses posterior al estímulo.** **A.** Imágenes de inmunofluorescencias tomadas en el microscopio confocal en el área del HVC para los tres grupos experimentales, con detalle de imagen binarizada del canal rojo. Hoechst: marca núcleos en azul. Faloidina: protusiones o espinas dendríticas en rojo, Alexa 488: marca Dendritas en verde. **B.** Promedio del Diámetro de Spots de F-actina en el área HVC. **C.** Cuantificación longitud de spots de F-actina en el área HVC. n=3; Comparaciones en Two-Way ANOVA. Código Significancia P-valor: '\*\*\*\*' 0.001; '\*\*' 0.01; '\*'

**Figura 6. Incremento de los puntos de colocación de Sinapsina y PSD95 posterior al estímulo.** **A.** Imágenes de inmunofluorescencias tomadas en el microscopio confocal en el área del Hipocampo para los tres grupos experimentales, con detalle de Threshold resultado de la intersección canal rojo (PSD95) y verde (Sinapsina). Hoechst: marca núcleos en azul. PSD95: Densidad postsináptica en rojo, Alexa 488: marca Sinapsina. **B.** Cuantificación spots de colocación en los tres grupos experimentales en el área del Hipocampo. n=3; Comparaciones en Two-Way ANOVA. Código Significancia P-valor: '\*\*\*\*' 0.001; '\*\*' 0.01; '\*'

**Figura 7. Aumento de los puntos de colocación en individuos de 10 meses, respecto a los grupos experimentales** **A.** Imágenes de inmunofluorescencias tomadas en el microscopio confocal en el área del HVC para los tres grupos experimentales, con detalle de Threshold resultado de la intersección canal rojo (PSD95) y verde (Sinapsina). Hoechst: marca núcleos en azul. PSD95: densidad postsináptica en rojo, Alexa 488: marca Sinapsina. **B.** Promedio colocación en cada grupo experimental en el área HVC. n=3; Comparaciones en Two-Way ANOVA. Código Significancia P-valor: '\*\*\*\*' 0.001; '\*\*' 0.01; '\*'.

**Figura 8. Promedio de Spots de Sinapsina y PSD95 en el área del Hipocampo en los tres grupos experimentales.** **A.** Imágenes de inmunofluorescencias tomadas en el microscopio confocal en el área del Hipocampo para los tres grupos experimentales, con detalle de Threshold del canal verde (Sinapsina) y el canal rojo (PSD95). Hoechst: marca núcleos en azul. PSD95: densidad postsináptica en rojo, Alexa 488: marca Sinapsina. **B.** Cuantificación número de Spots de sinapsina en los grupos experimentales en el área del Hipocampo. **C.** Promedio de Spots de PSD-95 en el área del Hipocampo para las tres edades. n=3; Comparaciones en Two-Way ANOVA. Código Significancia P-valor: '\*\*\*\*' 0.001; '\*\*' 0.01; '\*'.

**Figura 9. Incremento de Spots de Sinapsina y PSD-95 en área HVC en aves de 8 meses es mucho mayor en el control y posterior estimulación, respecto a las edades de 4 y 10 Meses. A.** Imágenes de inmunofluorescencias tomadas en el microscopio confocal en el área del HVC para los tres grupos experimentales, con detalle de Threshold del canal verde (Sinapsina) y el canal rojo (PSD95). Hoechst: marca núcleos en azul. PSD95: densidad postsináptica en rojo, Alexa 488: marca Sinapsina. **B.** Cuantificación número de Spots de sinapsina en los grupos experimentales en el área del HVC. **C.** Promedio de Spots de PSD-95 en el área del HVC para las tres edades. n=3; Comparaciones en Two-Way ANOVA. Código Significancia P-valor: '\*\*\*\*' 0.001; '\*\*' 0.01; '\*' .