



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS



**“Variación en la respuesta adrenocortical al estrés de
captura y manipulación en dos poblaciones de rayadito
(*Aphrastura spinicauda*)”**

CRISTOBAL I. VENEGAS MARCHANT

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

PROFESOR GUIA: RODRIGO A. VÁSQUEZ SALFATE

**SANTIAGO – CHILE
2012**

Financiamiento:
FONDECYT 1090794,
IEB P05-002, PFB-23-CONICYT

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que participaron y compartieron conmigo durante el desarrollo de esta memoria directa o indirectamente.

A toda mi familia, padres y hermanos, por la eterna paciencia y apoyo pese a todo, y sobre todo por la libertad que me han otorgado siempre.

A mi profesor guía, Dr. Rodrigo Vásquez, por el constante apoyo y vía libre para llevar a cabo este trabajo, y por darme la confianza y libertad para participar de otros estudios donde he tenido la oportunidad de aprender sobre distintos temas y conocer distintos lugares de Chile.

Agradezco especialmente a Silvina Ippi, Wouter van Dongen, Liz Addis y Aaron Clark, pues de ellos aprendí el manejo de las aves y los protocolos mediante los cuales llevé a cabo este trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de ecología terrestre, pasados y presentes, con quienes compartimos discusiones científicas y no tanto.

A mis amigos de la vida, los que siempre están ahí.

Por último, expresar mi agradecimiento a los rayaditos, quienes involuntariamente por su instinto de reproducción y supervivencia, participaron con sus donaciones de sangre para mi trabajo, y siguieron firmes criando a sus pichones.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
RESUMEN	iii
SUMMARY	iv
INTRODUCCIÓN	1
REVISION BIBLIOGRÁFICA	3
El concepto de estrés.....	3
Aproximación a la fisiología del estrés.....	5
Métodos para el estudio del estrés.....	7
Valor adaptativo del estrés.....	8
HIPÓTESIS	12
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
MATERIAL Y MÉTODOS	13
Especie de estudio.....	13
Poblaciones de estudio.....	14
Protocolo de captura, toma y análisis de muestras.....	15
Sexado molecular.....	17
Análisis estadístico.....	19
RESULTADOS	20

DISCUSIÓN	24
Análisis inter-poblacional.....	24
Análisis intra-poblacional.....	25
Otros factores inter poblacionales.....	26
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFÍA	31
ANEXO 1	
Certificado de ética.....	37

RESUMEN

Las poblaciones de animales han evolucionado adaptándose a una infinidad de climas y ambientes distintos donde enfrentan diferentes situaciones a lo largo de su vida. Como la mayoría de los vertebrados, las aves responden a cambios súbitos en el ambiente mediante la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, gatillando una serie de conductas orientadas a aumentar sus probabilidades de supervivencia. Sin embargo, en algunas etapas del ciclo de vida, como la reproducción, puede ser beneficioso suprimir esta respuesta evitando el abandono de la descendencia. Esta respuesta puede ser medida mediante la cuantificación de las concentraciones plasmáticas de corticosterona.

En este estudio comparamos la respuesta adrenocortical del rayadito (*Aphrastura spinicauda*) frente a un evento de estrés agudo, en dos poblaciones ubicadas en latitudes altamente contrastantes, durante la época reproductiva. El rayadito es un ave perteneciente a los furnáridos, familia endémica de Sudamérica y que ha sido poco estudiada. Realizamos series de estrés a un total de 25 parejas de rayadito. Se muestrearon 11 parejas de adultos en la población de Manquehue, ubicada en la Región Metropolitana (33°21'S) y 14 en Isla Navarino, Región de Magallanes y la Antártica Chilena (54°56'S), donde las aves se enfrentan a un clima más severo durante todo el año, incluyendo la temporada reproductiva. Por el pequeño tamaño corporal y bajo volumen de sangre del rayadito, se tomaron tres muestras de sangre a los 0-3, 10 y 30 min. Las muestras fueron analizadas mediante radioinmunoanálisis (RIA). En las concentraciones basales de corticosterona plasmática, encontramos diferencias entre las dos poblaciones, siendo mayores en Manquehue que en Navarino para ambos sexos. Esta diferencia se mantuvo durante los tres tiempos de medición, manifestándose también en las concentraciones máximas alcanzadas durante el experimento. No hubo diferencias entre sexos, lo que estaría relacionado con la estrategia reproductiva del rayadito, donde ambos padres participan equitativamente en el aprovisionamiento del nido durante el periodo de pichones. Nuestros resultados sugieren que las poblaciones que se reproducen a altas latitudes y con climas más severos, han disminuido la actividad adrenocortical, aumentando teóricamente las opciones de éxito reproductivo.

SUMMARY

Animal populations have adapted themselves to many different environments and climates where they have to cope with stressful situations during their lifetimes. Like most of vertebrates, birds respond to unpredictable changes in their environment by activating the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, triggering a set of behaviors oriented to raise their survival chances. However, in some life history stages, as reproduction, it could be beneficial to suppress this response thus avoiding the abandon of their offspring. This response can be measured quantifying the plasmatic corticosterone concentrations.

We conducted a study to compare the adrenocortical response of the thorn tailed rayadito (*Aphrastura spinicauda*) to an acute stress event during reproduction in two populations located in highly contrasting latitudes. The thorn tailed rayadito is a furnariid, an endemic bird family from South America that has been scarcely studied.

We obtained blood samples from 25 couples of adult rayadito. In the Manquehue population, located in Metropolitan Region (33°21'S) we assessed 11 pairs, and 14 in Navarino, Magellan's and Chilean Antarctic Region (54°56'S), where the birds has to confront a more severe climate during all year round, including the reproductive stage. Because of the small body size and blood volume of the rayadito, we took just three blood samples, at 0-3, 10 and 30 min. Corticosterone concentrations were assessed by radioimmunoassay (RIA). We found differences between populations in the corticosterone baseline, being higher in Manquehue than Navarino for both sexes. This differences were maintained through all the corticosterone elevation curve, including the maximum concentrations. We did not find differences due to sex, and this can be related to the rayadito's reproductive strategy, where both parents participate equally in the food provisioning during the nestlings period. Our results suggest that birds from high latitude populations with more severe weather have lower adrenocortical activity in order to theoretically increase their chances of reproductive success.

INTRODUCCIÓN

Todos los organismos vivientes enfrentan carencias u otras modificaciones en su entorno que definen sus condiciones como “sub-óptimas” durante su vida o sus distintas etapas del desarrollo como crecimiento y reproducción, entre otras (Moller y Milinski, 1998). Charles Darwin fue de los primeros investigadores en darse cuenta de que las poblaciones animales consisten de muchos individuos que difieren en sus características y definió la competencia entre individuos conespecíficos como una de las principales bases de su teoría de la selección natural (Darwin, 1859).

Es importante entender que la selección natural postulada por Darwin se basa en beneficios obtenidos mediante la maximización del éxito reproductivo de los organismos más “adaptados” incluso a expensas del bienestar, salud y longevidad individual (Korte *et al.*, 2005).

Así, la vida ha evolucionado bajo condiciones estresantes. Sin embargo, el hecho de que los organismos viven y se reproducen en condiciones adversas, no ha sido tomado en cuenta con demasiada importancia por la biología (Moller y Milinski, 1998).

Muchos de los experimentos llevados a cabo por la biología evolutiva empírica han utilizado animales “modelos”, como moscas y roedores de laboratorio, criados bajo condiciones óptimas de ambiente y alimentación, donde el estrés se reduce a un mínimo en comparación con las condiciones naturales. Es interesante el hecho de que los parámetros poblacionales, tanto fenotípicos como genotípicos, son muy diferentes en poblaciones criadas con condiciones más o menos óptimas (Bijlsma y Loeschcke, 1997).

Para evaluar el estado de estrés de las poblaciones animales se han llevado a cabo estudios de laboratorio y en condiciones naturales, tanto en mamíferos como aves, apuntando a distintos niveles de los procesos fisiológicos y a diferentes métodos para estudiar el estrés. Con el fin de evaluar la sensibilidad y respuesta del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenales (HPA) frente a un cuadro de estrés agudo en animales silvestres, el investigador inglés John Wingfield desarrolló el protocolo de captura y manipulación, basándose en la premisa de que la captura de un ave o mamífero silvestre es considerado por el animal como un intento de depredación (Wingfield *et al.*, 1992; Wingfield, 1994). A partir de dicha propuesta, se han realizado numerosos estudios en distintas especies

silvestres, evaluando principalmente las variaciones que presenta una especie en su respuesta a un evento estresante a lo largo de su ciclo reproductivo en distintas estaciones del año, o comparando las respuestas de diferentes especies con distintas estrategias reproductivas. Casi todos los estudios se han llevado a cabo en distintos puntos del hemisferio norte, por lo que hacen falta estudios comparativos en el hemisferio sur. Además, la mayoría de los estudios han sido realizados entre distintas estaciones del año en una misma población. Sin embargo, son escasos los estudios intra-específicos acerca de la respuesta adrenocortical al estrés en distintos ambientes (Wingfield *et al.*, 2007), por lo que es necesario evaluar otros factores que puedan estar afectando las historias de vida de las especies animales, como la ubicación latitudinal, ya que ésta puede afectar considerablemente las condiciones ambientales en las que se desarrollan los animales de una misma especie.

Con el presente estudio se pretende aportar al entendimiento del fenómeno de estrés, para esclarecer si, además de las diferencias entre las distintas etapas de la historia de vida de los individuos, existen diferencias entre poblaciones con distinta distribución latitudinal durante una misma etapa reproductiva y entre sexos, para una especie que durante la etapa de crianza comparte los cuidados parentales.

REVISION BIBLIOGRÁFICA

Los animales durante su vida deben enfrentar perturbaciones en su medio ambiente. A veces durante el ciclo de vida, un individuo debe enfrentarse a eventos repentinos como el ataque de un depredador o de un animal conespecífico dominante, o cambios repentinos en el clima. Por lo tanto, las diferencias individuales en la respuesta a cualquiera de estos eventos pueden ser determinantes en su sobrevivencia y reproducción.

En consecuencia, los vertebrados han evolucionado desarrollando estrategias fisiológicas y conductuales que les permiten sobrellevar los cambios en las condiciones de su ambiente, ya que virtualmente no existe en la Tierra hábitat alguno que no presente cambios. Es más, casi todos los organismos viven en ambientes cíclicos, de cambios altamente predecibles. Así, tanto la conducta, la fisiología e incluso a veces la morfología de un individuo pueden ajustarse ya sea entre día y noche, estación húmeda o seca, u otoño, invierno, primavera o verano (Wingfield, 1994).

El concepto de estrés

El concepto de estrés ha sido históricamente uno de los términos más usados entre las ciencias biomédicas, teniendo tantas definiciones distintas como técnicas para su estudio, según diferentes investigadores de distintas áreas (medicina, psicología, biología, entre otras) que han realizado estudios en el campo del estrés (Lazarus y Folkman, 1984; Levine y Ursin, 1991; Weiner, 1991).

Los primeros trabajos que indagaron sobre el estrés fueron los del estadounidense Walter B. Cannon y el canadiense Hans Selye. Cannon, en su trabajo “Cambios Corporales en Dolor, Miedo e Ira” (1929), en que estudió las respuestas frente a distintos estados emocionales de un individuo, concluye que los cambios que se producen en el organismo por acción del sistema nervioso simpático, corresponden a las respuestas inmediatas mediadas por los neurotransmisores adrenalina y noradrenalina, que llevan a la capacidad

de reaccionar de forma activa frente a las situaciones críticas y estar preparado para “pelear o escapar.

Mientras los trabajos de Cannon se centraron en la respuesta aguda frente a los estímulos del ambiente, Selye se enfocó en el aspecto adaptativo de la respuesta a estímulos adversos. Fue éste quien acuñó el término estrés, para la respuesta general producida frente a agentes nocivos, a los que llamó estresores (Moller y Milinsky, 1998). Selye definió que, si bien para la mayoría de los agentes nocivos existen respuestas específicas, como las inmunes o las reacciones del sistema simpático, junto a éstas se desata una reacción inespecífica, sin importar la naturaleza del agente estresante, que representa un esfuerzo general del organismo para responder a la nueva situación. Esta respuesta, según Selye, se divide en tres etapas y fue denominada como “Síndrome de Adaptación General” o “Síndrome de Estrés” (Selye, 1936).

Para evaluar la importancia de la impredecibilidad de una situación estresante en la respuesta adrenocortical, Weiss (1968), realizó experimentos en ratas donde la variable respuesta era la capacidad de controlar una situación adversa. Para esto aplicaba electroshocks a dos ratas simultáneamente, teniendo una de ellas acceso a un interruptor que detenía el electroshock para las dos. Luego se evaluó la respuesta mediante la determinación de concentraciones plasmáticas de glucocorticoides (GCs) para las dos, y se observó que aunque las dos recibieron la misma cantidad de descarga eléctrica, la rata que tenía acceso a la palanca presentaba concentraciones mucho más bajas de GCs que la otra, de ahí se desprende que el “control” sobre el factor estresante (contexto) tiene importantes repercusiones en la respuesta endocrina (Weiss, 1968).

Si bien el fenómeno del estrés ha sido ampliamente estudiado, desde su aparición, el término ha sido mal entendido o mal utilizado para situaciones que no corresponden realmente a fenómenos de estrés. Así, el término estrés se ha relacionado comúnmente con estados fisiológicos naturales en la historia de vida de los individuos. Términos como “estrés reproductivo”, “estrés migratorio” o “ambientes estresantes” (como desiertos o altas latitudes), son frecuentemente usados, aún cuando se refieren muchas veces a procesos cíclicos para los cuales los animales se encuentran adaptados y en donde, probablemente, fuera de los cambios fisiológicos normales y esperables para aquella etapa o ambiente, los individuos no se encuentren “estresados”. Entonces, sólo cuando son expuestos a factores

impredecibles, estaríamos en presencia de un potencial agente o ambiente “estresante” (Wingfield, 1994).

Wingfield (1994), denomina al estrés a corto plazo como “estado de emergencia”, el cual corresponde a un conjunto de respuestas fisiológicas y conductuales que se gatillan frente a un evento o factor de perturbación impredecible (Tabla 1), orientados a aumentar las opciones de supervivencia frente a éste y luego del cual, el organismo puede retornar a su estado fisiológico previo.

Tabla 1: Factores de perturbación impredecibles.

Indirectos	Directos
Depredación de huevos o descendencia	Clima severo por períodos prolongados
Pérdida de huevos o descendencia por tormentas cortas y severas	Competencia interespecífica
Perturbaciones leves (humanos)	Pérdida de la pareja
	Contaminación
	Cambio o pérdida de hábitat
	Perturbaciones prolongadas (humanos)

(Wingfield *et al.*, 1998)

Aproximación a la fisiología del estrés

La respuesta que un animal presenta frente a un estímulo adverso lleva al estrés, que incluye la liberación de hormonas desde las glándulas adrenales y sus subsecuentes efectos. Estas respuestas son controladas principalmente a través del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) mediante la secreción de la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) en el hipotálamo y la corticotrofina (ACTH) en la hipófisis o pituitaria. Esta cadena actúa estimulando la corteza adrenal produciendo la liberación de GCs al torrente sanguíneo. Los principales GCs sintetizados por los mamíferos son cortisol y corticosterona (Norris, 2007). Entre las distintas especies de vertebrados se secretan en distintas proporciones el cortisol y la corticosterona. Las aves, ratones y ratas secretan casi exclusivamente corticosterona, los perros cantidades aproximadamente iguales, mientras que los gatos, ungulados y humanos secretan predominantemente el cortisol (Ganong, 1991). También se estimula la liberación de los mineralocorticoides aldosterona y deoxycorticosterona (Ganong, 1991).

Por su parte, la médula adrenal está bajo control directo del sistema nervioso simpático y secreta noradrenalina y/o adrenalina a la sangre. Estas neuro-hormonas son las responsables de la respuesta inmediata, que corresponde a la descrita por Cannon y que, incluye el aumento de la frecuencia cardíaca, vasodilatación de arteriolas en el músculo esquelético, vasoconstricción general, relajación de músculos bronquiales, dilatación pupilar, piloerección y movilización de glicógeno hepático y ácidos grasos libres. Todas estas respuestas contribuyen a aumentar la eficiencia de operación de manera que el organismo pueda responder inmediatamente a cualquier emergencia que se presente (Norris, 2007).

Los GCs, por su parte, están relacionados con el síndrome de adaptación general enunciado por Selye e inhiben la utilización de glucosa en tejidos periféricos como el sistema músculo-esquelético, estimulan el consumo de aminoácidos para realizar gluconeogénesis a nivel hepático y estimulan la movilización de reservas grasas. Mediante el bloqueo de su utilización periférica, los GCs aumentan la glucosa sanguínea para su uso preferencial a nivel cerebral. Estas respuestas son las que participan principalmente en las dos primeras etapas del síndrome de adaptación general, conocidas como fase de alarma y de resistencia, respectivamente, donde ocurre una hiperplasia de las glándulas adrenales. Luego de un período más prolongado, si se mantiene el estímulo estresante, sobreviene la fase de agotamiento, donde se manifiestan los efectos negativos del aumento crónico de GCs, que finalmente pueden llevar a la muerte del individuo, por un agotamiento general del organismo luego de una hiperglicemia prolongada, efectos inmunosupresores y degeneración neuronal (Norris, 2007).

Cabe destacar que estas respuestas no se presentan siempre de la misma forma, pudiendo variar en intensidad y duración de acuerdo al origen o naturaleza del agente estresante, además de la condición o estado fisiológico del individuo. Si bien esta es una de las principales críticas que se le hacen al mecanismo propuesto por Selye, las líneas generales de su trabajo siguen siendo ampliamente aceptadas (von Holst, 1998; Norris, 2007).

Métodos para el estudio del estrés

Los estudios para evaluar el estrés, se han enfocado principalmente en la respuesta adrenocortical, ya que esta es consistente para todos los vertebrados y es reconocido que luego de un evento imprevisto el organismo responde, en el lapso de minutos, con aumentos de las concentraciones plasmáticas de GCs, los que traen consigo distintas modificaciones con el propósito de aumentar la energía disponible, para intentar responder a estos eventos y así sobrevivir (Wingfield *et al.*, 1992; Wingfield, 1994)

En sus inicios, el estudio de la actividad adrenocortical comprendía medidas como comparaciones en el peso e histología de la glándula adrenal, la cual permitía evaluar el estatus de individuos y poblaciones mediante observaciones, como por ejemplo, la hiperplasia adrenal en poblaciones más estresadas, pero no permitía estudiar concentraciones hormonales en un momento en particular, ni observar cambios a corto plazo en la actividad de la glándula. Lo anterior, sin mencionar el hecho de que los animales debían ser sacrificados para realizar los estudios. Estos métodos perdieron relevancia con el desarrollo de nuevas tecnologías, como la ecografía y de métodos para la determinación de la concentración de hormonas en muestras biológicas (von Holst, 1998).

La medición de la concentración de GCs en muestras biológicas mediante radioinmunoanálisis (RIA) u otros métodos, es relativamente simple. Se han realizado estudios hormonales en plasma sanguíneo, muestras fecales, orina e incluso de saliva, cada método con elementos a favor y con ciertas restricciones en su aplicación (Fenske, 1989; Miller *et al.*, 1991). En condiciones de campo, el procedimiento de capturar animales y la obtención de muestras de sangre, ha sido exitosamente usado como un desafío estandarizado para determinar la capacidad de respuesta adrenocortical de los individuos (von Holst, 1998). Para esto, a los animales se les toman muestras de sangre seriadas en tiempos de hasta 60 minutos. Las diferencias en las concentraciones máximas alcanzadas por los desafíos de estrés, han demostrado deberse a diferencias individuales en la capacidad de producción y liberación de corticosterona, por parte de las glándulas adrenales.

Si bien, mientras una capacidad adrenal incrementada, no necesariamente tiene que estar relacionada con concentraciones basales mayores de GCs en la sangre, es una medida efectiva de estrés, que puede ser usada en estudios de campo (von Holst, 1998).

Se han realizado estudios en el campo de la biología evolutiva, mediante experimentos donde se ha estandarizado un estresor, como por ejemplo, calor o deshidratación (Hoffmann y Parsons, 1991) y en estudios de endocrinología usando la captura e inmovilización (Wingfield *et al.*, 1992; Wingfield 1994). Involucra primero la captura y luego manipulación e inmovilización de un individuo, para luego medir una respuesta hormonal como concentraciones plasmáticas de GCs, mediante la toma de muestras de sangre a intervalos regulares durante un tiempo establecido de hasta una hora. Este experimento ha sido denominado como serie de estrés, y ha sido muy usado, extendiéndose animales de distintas especies. Como procedimiento adicional, algunos estudios han realizado una inyección inicial de ACTH para así evaluar la capacidad máxima de liberación de GCs (Sapolsky, 1982).

Valor adaptativo del estrés

Desde el momento en que Selye formuló en 1936 el síndrome de adaptación general, se ha supuesto que las primeras etapas de la respuesta adrenocortical un evento estresante, tendrían un valor adaptativo para los animales silvestres, incluso cuando las etapas posteriores generalmente pueden llevar a estados detrimentales o a la muerte. Los beneficios de la respuesta adrenocortical en estrés, la respuesta aguda, tenderían a facilitar el escape en situaciones de riesgo vital, como el ataque de depredadores, eventos climáticos o competencias sociales (Wingfield *et al.*, 1998). La idea del valor adaptativo de la respuesta aguda frente a un evento estresante ha penetrado profundamente en la literatura, aunque existe poca evidencia directa con respecto a sus potenciales efectos positivos (Breuner *et al.*, 2008).

Se supone que en algunos aspectos la respuesta aguda de GCs es beneficiosa, dado que está presente de manera consistente en la naturaleza en todos los vertebrados. En la

mayoría de los vertebrados estudiados, ocurre un aumento rápido de de entre 4 y 10 veces de las concentraciones plasmáticas de GCs en un lapso de minutos (Breuner *et al.*, 2008). Este concepto considera que muchos vertebrados que se enfrentan a agentes estresantes, aumentan o al menos evitan una disminución en sus oportunidades de sobrevivencia, mediante la activación del eje HPA, aumentando sus concentraciones plasmáticas de corticosterona (Pravosudov *et al.*, 2004; Wada *et al.*, 2006).

El estrés persistente (crónico) puede inhibir la reproducción, suprimir el sistema inmune y promover la pérdida de proteínas, llevando así a una menor adecuación para el individuo (Sapolsky *et al.*, 2000). En base a esto, es que Wingfield y Kitaysky (2002), definieron el aumento rápido a corto plazo de corticosterona, como una respuesta “anti-estrés crónico”, diferenciándola de los efectos crónicos detrimentales de los GCs, ya que estas respuestas de corto plazo cesarían para volver a su actividad normal una vez retirado el agente estresante (Tabla 2).

Tabla 2: Efectos de Corticosterona en un Estado de Emergencia

Agudos (i.e., corto plazo, minutos a horas)	Crónicos (i.e., largo plazo, días a semanas)
Supresión de conducta reproductiva	Inhibición del aparato reproductivo
Regulación del sistema inmune	Supresión del sistema inmune
Aumento de gluconeogenesis	Promover severa pérdida de proteínas
Aumento de conducta de forrajeo	Disrupción de sistemas de segundo mensajero
Promover conducta de escape durante el día	Muerte de células neuronales
Promover descanso nocturno disminuyendo las tasas metabólicas	Supresión de crecimiento y metamorfosis
Promover recuperación al volver al estado fisiológico normal	

(Wingfield *et al.*, 1998)

En muchas especies de aves, se ha demostrado que concentraciones elevadas de corticosterona resultan en el abandono de las actividades normales y la aparición de otras conductas conducentes a la supervivencia inmediata (Wingfield *et al.*, 1998). Esta respuesta, puede no ser siempre beneficiosa para el individuo y en algunas circunstancias sería más adaptativo no abandonar del todo las actividades. Por ejemplo, aves que se reproducen a altas latitudes, tienen un tiempo limitado para completar el ciclo reproductivo.

En estos casos, cuando los recursos son limitados puede ser ventajoso continuar las actividades reproductivas a pesar de un ambiental evento impredecible y se ha propuesto que la respuesta adrenocortical en esas especies podría estar suprimida durante la reproducción (Wingfield, 1994; Wingfield *et al.*, 1992; 1998).

De modo similar, la hipersensibilidad a un agente estresante mientras los individuos crían a su descendencia puede disminuir su adecuación, ya que concentraciones altas de GCs pueden llevar a abandono del nido. Así, es importante para un animal regular la reactividad del eje HPA de acuerdo a su estado fisiológico. Esta regulación puede alcanzarse en varios niveles del eje, ya sea regulando la liberación de hormonas liberadoras, o modificando la sensibilidad de receptores a éstas (Wada *et al.*, 2006).

Wada y Shimizu (2004), mostraron que en el ruiseñor japonés (*Cettia diphone*), la respuesta adrenocortical del macho está suprimida en las etapas primarias de la temporada reproductiva. Es destacable que esta especie suprime la respuesta adrenocortical en esta etapa, ya que así puede competir y establecer territorio en un área relativamente delimitada con suficientes recursos alimenticios. Aunque *Cettia diphone* es una especie poligínica y los machos no proveen ningún tipo de cuidado parental directo, éstos hacen guardia mientras la hembra es aún receptiva, ya que siempre hay machos no emparejados competidores alrededor del territorio. Por otra parte, cuando la hembra está incubando y por lo tanto, ya no es receptiva, el macho puede modificar su territorio e intentar atraer a otra hembra. Esta puede ser la razón por la cual la respuesta adrenocortical vuelve a ser alta en el período post-eclosión. El potencial para aumentar la corticosterona en respuesta a estrés agudo puede así permitir una modificación parcial o total del territorio, debido a los efectos de la corticosterona en movilidad y abandono del territorio (Breuner *et al.*, 1998). Esto sugiere que la supresión adrenocortical al inicio de la temporada reproductiva y el cese de ésta en etapas más avanzadas, se relaciona intrínsecamente con la estrategia reproductiva poligínica de *Cettia diphone*, además de sus conductas territoriales.

Holberton y Wingfield (2003), proponen que en especies monogámicas la “inversión reproductiva” de una hembra, se espera sea mayor durante la etapa preparental que la de los machos. Cuando los huevos eclosionan y ambos padres los aprovisionan a los pichones, es esperable que cese la diferencia en el esfuerzo reproductivo entre los sexos y,

por lo tanto, que no difieran en la respuesta adrenocortical frente a un evento de estrés agudo.

En otro estudio de respuesta aguda a un evento de estrés, se capturaron aves de la especie *Poecile atricapilla* en distintas latitudes (Alaska y Colorado) y se mantuvieron en iguales condiciones. Luego de tres meses se compararon sus respuestas adrenocorticales sin encontrar diferencias en las concentraciones basales ni máximas de corticosterona alcanzadas. Los autores concluyen que son necesarios más estudios de actividad adrenocortical en animales de una misma especie, tanto en condiciones naturales como controladas, para entender mejor la respuesta adrenocortical frente a un evento estresante (Pravosudov *et al.*, 2004).

Además de las severas condiciones para la reproducción y la crianza, que se experimentan en hábitats con climas extremos como sub-árticos y áridos, pueden haber otros casos en que la respuesta adrenocortical sea suprimida en favor del éxito reproductivo (Wada y Shimizu, 2004).

En esta memoria se aborda la sensibilidad de los individuos de dos poblaciones a distinta latitud del ave *Aphrastura spinicauda* (Rayadito) frente a un evento estresante, mediante la evaluación de posibles variaciones en la reactividad del eje HPA, representada en los cambios de las concentraciones plasmáticas de corticosterona.

El rayadito es un pequeño paseriforme de la familia de los furnáridos, anidador secundario de cavidades, endémico de los bosques templados de Chile y Argentina, extendiéndose en Chile desde la zona central hasta el extremo sur del continente. El estudio en dos sitios extremos de su amplia distribución latitudinal nos permitirá establecer si existe un efecto del clima y la estacionalidad, que influye en una temporada reproductiva más corta y condiciones climáticas menos estables mientras mayor es la latitud, en la respuesta fisiológica frente a estímulos estresantes no predecibles.

HIPÓTESIS

Los rayaditos que habitan en latitudes extremas, de estacionalidad más marcada, han evolucionado suprimiendo la respuesta adrenocortical al estrés de captura y manipulación durante la temporada reproductiva, para poder así maximizar las opciones de éxito frente a eventos climáticos altamente impredecibles.

OBJETIVO GENERAL

Establecer si existen diferencias en la respuesta adrenocortical al estrés de captura y manipulación de rayaditos en dos poblaciones con climas contrastantes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar los cambios en la concentración plasmática de corticosterona bajo el procedimiento estandarizado de estrés de captura y manipulación, en dos poblaciones de rayadito que habitan regiones climáticamente contrastantes (Cerro Manquehue e Isla Navarino).
- Comparar las respuestas adrenocorticales de ambas poblaciones, entre sexos y niveles basales y máximos de corticosterona.

MATERIAL Y MÉTODOS

Especie de estudio

El rayadito (*Aphrastura spinicauda*), es un suboscino perteneciente a la familia furnariidae, endémico de los bosques templados australes de Chile y Argentina, con una distribución que abarca desde Chile central (31°S) hasta Tierra del Fuego y el Cabo de Hornos, alcanzando los bosques más australes del mundo. Habita desde la cordillera de los Andes hasta la costa del Pacífico. Es un ave pequeña (12 - 14 gramos), no migratoria, diurna, de dieta principalmente insectívora, aunque ocasionalmente consume material vegetal. A pesar de ser una de las familias más diversificadas e importantes en número en el hemisferio sur, los furnáridos, permanecen relativamente poco estudiados (Moreno *et al.*, 2005; 2007; Ippi, 2009).

Se han descrito tres subespecies de rayadito a lo largo de su distribución, siendo *A. s. spinicauda* (Gmelin, 1789), la que encontramos en la mayor parte de la distribución de la especie (Johnson y Goodall, 1967) y que corresponde a la que habita en los dos sitios muestreados en esta memoria, cerro Manquehue e isla Navarino. Además de ésta, existen *A. s. fulva* (Angelini) que habita únicamente en la isla Grande de Chiloé y *A. s. bullocki* (Chapman) en la isla Mocha (Johnson y Goodall, 1967).

Las diferencias fenotípicas en coloración del plumaje y las distancias relativamente cortas que separan a estas islas del continente (tanto Chiloé como isla Mocha son islas continentales), sugieren que el rayadito posee una capacidad de dispersión relativamente baja, dada quizás por un uso especializado del bosque y/o por una baja capacidad de vuelo de larga distancia (Ippi, 2009).

Los rayaditos, durante su reproducción, son usuarios secundarios de cavidades naturales que encuentran en troncos o árboles viejos y utilizan con facilidad cajas anidaderas artificiales, lo cual ha permitido estudiar diversos aspectos de su biología reproductiva (Moreno *et al.*, 2005; 2007). El rayadito es una especie que no presenta dimorfismo sexual, aunque el macho, en promedio, es de mayor tamaño y peso que las hembras y donde ambos sexos comparten las tareas de cuidado parental (Moreno *et al.*, 2007).

El amplio rango de distribución del rayadito implica que sus poblaciones están sometidas a una gran variación climática, dada por una disminución en las temperaturas promedio, acompañada de un aumento en las precipitaciones y el viento, a medida que se avanza hacia mayores latitudes (Hajek y di Castri, 1975). Adicionalmente, las poblaciones del extremo sur experimentan importantes variaciones en el fotoperíodo, donde los días van progresivamente alargándose a medida que se acerca el solsticio de verano y luego comienzan a disminuir aceleradamente. Por lo tanto, las variables ecológicas que afectan el desarrollo de los individuos de estas poblaciones, pueden determinar respuestas diferentes frente a determinadas situaciones en relación a características conductuales y variables fisiológicas.

Poblaciones de Estudio

Cerro Manquehue

Ubicado en el sector oriente de la ciudad de Santiago, el estudio se realizó en la Granja Educativa Manquehue (33°21'S, 70°34'O, 900 m.s.n.m.), que posee un clima mediterráneo, caracterizado por tener cuatro estaciones bien marcadas con veranos secos y cálidos e inviernos fríos y lluviosos (Hajek y Di Castri, 1976). Aquí los rayaditos tienen una estación reproductiva que se extiende desde inicios de septiembre hasta febrero, donde es frecuente encontrar más de una postura por pareja (Vásquez R.A., datos no publicados). De las dos poblaciones estudiadas, ésta es la que presenta el clima más estable, ya que no presenta muchos eventos climáticos considerados impredecibles. Las lluvias desde septiembre en adelante, una vez comenzada la temporada reproductiva, son poco frecuentes, de baja intensidad y duración y, además, las temperaturas son más elevadas que en el extremo austral.

Isla Navarino

El segundo sitio fue Isla Navarino, aproximadamente a cuatro kilómetros al oeste de Puerto Williams (54°56'S, 67°38'O, 15 m.s.n.m.) que posee un clima subantártico, donde se experimentan inviernos muy fríos con temperaturas bajo cero, precipitaciones principalmente de nieve (Hajek y Di Castri, 1976), que se prolongan incluso hasta avanzado el verano, vientos fuertes y fríos, típicos del extremo austral de la Patagonia, donde además las estaciones están escasamente diferenciadas, con un leve aumento de temperatura hacia el verano, y con un cambio en el fotoperíodo altamente marcado, donde los días comienzan a acortarse rápidamente luego del solsticio de verano.

Protocolo de captura, toma y análisis de muestras

Los muestreos fueron realizados en el período concurrente desde septiembre a diciembre del año 2008, en el marco del período reproductivo del rayadito. Se utilizaron sólo nidos correspondientes a primeras posturas dentro de la temporada.

Para estandarizar el período en el cual fueron muestreados los individuos, con el fin de evitar sesgos por posibles variaciones en la sensibilidad del eje HPA observadas entre sub-fases del período reproductivo en otras aves, los adultos fueron capturados y muestreados entre los días 4 y 10 después de nacidos los pichones, con un espacio mínimo de 2 días entre el muestreo de los padres de un mismo nido. Todas las capturas se realizaron entre las 8 y 11 horas A.M., para evitar así variaciones debidas al ciclo diario de los glucocorticoides. Aprovechando el retraso en la temporada reproductiva de los rayaditos que se reproducen a mayores latitudes, se realizó primero el muestreo en Santiago y luego en Navarino. Se capturaron y muestrearon un total de 26 nidos completos, es decir en los cuales se muestrearon los dos adultos, obteniendo un total de 52 individuos.

Del total de nidos, 12 fueron muestreados en la población de Manquehue y 14 en isla Navarino. Lamentablemente en dos individuos de Manquehue se perdieron las muestras de los 30 minutos, por lo que finalmente los análisis comprenden a 22 individuos de la población de Manquehue (11 machos y 11 hembras).

No se realizaron capturas ni tomas de muestras los días en que se presentaron nevazones o tormentas de granizo en Navarino, ya que éstas aumentan los niveles de estrés y por lo tanto, las concentraciones basales de corticosterona plasmática de algunas aves (Wingfield *et al.*, 1998).

Estrés de captura y manipulación

Para evaluar la sensibilidad del eje hipotálamo-adenohipófisis-adrenal a un evento impredecible inductor de estrés agudo, se capturó a los adultos mediante puertas-trampa colocadas en las cajas nido al momento del experimento. Inmediatamente después de la captura, se retiró al individuo y se realiza una punción de la vena alar (Fig. 1), recolectando la sangre con un tubo capilar, hasta que se hubiera llenado en sus dos terceras partes, aproximadamente (50 – 70µl).



Figura 1: Toma de muestra con tubo capilar mediante punción de la vena alar.

Se tomaron tres muestras a cada individuo capturado. La primera muestra, se tomó dentro de los tres minutos después de su captura. Ésta fue tomada para estimar las concentraciones basales de corticosterona, considerando que si bien la respuesta es instantánea, el aumento en la concentración de corticosterona en un evento de estrés agudo es observable en circulación solamente luego de tres minutos después de la captura (Wingfield, 1994).

Para el rayadito, con una masa corporal media de 12 g., no se recomienda extraer más de un total de 120 µl de sangre completa, por lo que extrajimos entre medio y dos tercios de tubo capilar en cada tiempo, para un total aproximado de 100 – 140 µl de sangre por cada individuo muestreado. Por regla general, no se debe extraer más del 2% del peso del animal en un período igual o menor a 14 días y no más del 1% por sesión. Se recomiendan cantidades de un tercio a medio tubos capilares para aves >7 gr, 1 tubo capilar para aves de 7 a 15 g., y 2 tubos capilares para aves más grandes (Gaunt *et al.*, 1997).

Otras dos muestras fueron tomadas a los 10 y 30 minutos luego de la captura y con éstas, se estableció la curva de elevación de corticosterona con el estrés provocado por la captura y manipulación. En los intervalos de tiempo entre cada muestra, se mantuvo a los individuos en bolsas de tela y entre el intervalo de los 10 y 30 minutos se marcaron mediante la aplicación de anillos metálicos, midieron y pesaron, siguiendo el protocolo desarrollado por Wingfield (1994).

Las muestras obtenidas fueron mantenidas en recipientes refrigerados en los mismos tubos capilares, por un tiempo máximo de 3 horas hasta el regreso al laboratorio, donde fueron centrifugadas en una centrífuga de hematocrito con el objeto de separar el plasma del componente celular. Luego de la centrifugación, se extrajo el plasma de cada tubo con una jeringa Hamilton de 50µl, el que fue conservado en tubos Eppendorf individuales, congelados a -20°C hasta su posterior análisis. Los análisis se realizaron en el laboratorio del profesor Wingfield, en la Universidad de California, Davis, USA., donde se cuantificaron las concentraciones de corticosterona plasmática mediante la técnica de radioinmunoanálisis (para más detalles sobre el procedimiento de RIA véase Wingfield. *et al.*, 1992; Wingfield, 1994).

Este estudio experimental se realizó dentro del marco del proyecto FONDECYT 1090794 “*Animal Personalities and the underlying roles of behavioral innovation and decision-making*”, el cual ha sido aprobado por el comité de ética de la Universidad de Chile, en certificado anexado al final de este documento (Anexo 1).

Sexado molecular

El ADN fue aislado desde muestras de sangre almacenadas en tarjetas FTA® (Whatman, EEUU.), mediante el siguiente protocolo: se cortaron porciones de muestras sanguíneas de las tarjetas FTA de aproximadamente 3 mm de diámetro, las que fueron colocadas en tubos Eppendorf con 250 µl de buffer de lisis (0,15M NaCl, 0,05M Tris, 0,001M EDTA, pH=8) y se incubaron por 6 horas a una temperatura de 4°C . Luego se agregaron 7 µl de SDS 20% y 50 µg de Proteinasa K en solución. Los tubos fueron incubados a 55°C por toda la noche.

Después de la incubación de agregaron 250 µl de Acetato de Amonio 4M para precipitar las proteínas, agitando a temperatura ambiente durante 30 minutos. Subsecuentemente los tubos fueron centrifugados a 50000 G por 15 minutos.

Luego de recuperar el sobrenadante, que contiene el ADN disuelto y desechar el precipitado de proteínas, se precipitó el ADN con etanol absoluto (100%), descartándose el sobrenadante y luego se lavó dos veces más con etanol 70%, para finalmente ser resuspendido en 50 µl de agua destilada estéril.

Las reacciones de polimerasa en cadena (PCR) se realizaron usando 1 µl de resuspendido de ADN, 1 U de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU.), 200mM dNTP, 1mM de Taq Buffer, 2,5mM de MgCl₂, y 10mM de los primers 2550F (5'-GTTACTGATTCGTCTAC GAGA-3') y 2718R (5'-ATTGAAATGATCCAGTGC TTG-3'), alcanzando un volumen final de 20 µl. La reacción consistió en un primer ciclo de denaturación (94°C por 2 minutos), luego diez ciclos de denaturación (94°C por 30 segundos), alineamiento (60°C por 30 segundos) y extensión (72°C por 30 segundos), bajando la temperatura de alineamiento en 1°C cada ciclo hasta alcanzar los 50°C, donde se mantiene por otros 35 ciclos. Luego una fase final de extensión de 72°C por 5 minutos, 25°C por 5 minutos y luego mantenida a 4°C. Los primers amplificaron la secuencia CHD1 (*Chromo-helicase-DNA binding protein*), presente en ambos cromosomas de aves W y Z (Fridolfsson y Ellegren, 1999).

Los productos de la amplificación correspondieron a CHD1W de 450 pares de bases y CHD1Z de 600 pares de bases. Las aves se sexaron entonces como hembras cuando ambos fragmentos fueron amplificados (heterocigoto WZ), y como machos cuando sólo la banda de 600 pares de bases fue visible (homocigoto ZZ) (Moreno *et al.* 2007; Fig 2).

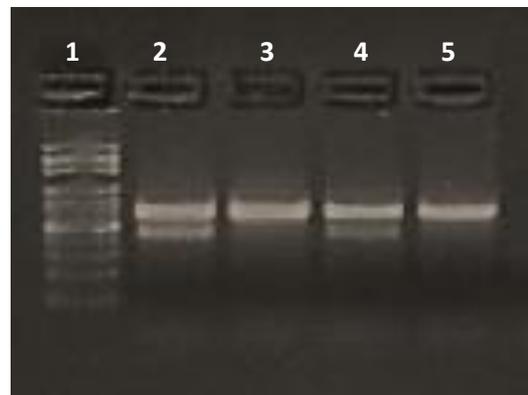


Figura 2: Productos de amplificación de PCR para identificación de sexos en rayadito usando los primers 2550F y 2718R. Dos bandas (columnas dos y cuatro) corresponden a hembras, mientras que una banda (columnas tres y cinco) corresponden a machos. La primera columna corresponde a un marcador de peso molecular.

Análisis estadístico

Se compararon los valores de concentración plasmática de corticosterona entre poblaciones utilizando un análisis de varianza (ANDEVA) de medidas repetidas de dos vías, para así comprobar si existen diferencias entre sujetos (poblaciones) y también intra-sujetos (tiempos de medición). Aunque los datos de concentración plasmática de corticosterona no difirieron estadísticamente de la distribución normal, con el programa SPSS Statistics mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, fueron transformados previo al análisis usando logaritmo natural, para cumplir con el supuesto de homocedasticidad. Además, se realizaron pruebas *t* de Student para comparar las medias poblacionales de los distintos tiempos de medición, a fin de interpretar correctamente los resultados. Se utilizaron los datos sin transformar para elaborar los gráficos de perfil. Todos los análisis se realizaron con el programa SPSS Statistics 17 (SPSS Inc, EEUU.).

RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados del ANDEVA de dos vías con medidas repetidas, en la cual una vía es entre grupos (poblaciones) y la otra los niveles de corticosterona, donde para cada individuo existe una muestra a los 1, 10 y 30 minutos.

No existieron correlaciones significativas entre la concentración plasmática de corticosterona basal y la hora de captura dentro de los horarios en que fueron capturados los individuos para Manquehue ($r = -0,185$, $p = 0,411$) ni para Navarino ($r = 0,003$, $p = 0,989$), por lo tanto, se incorporaron todos los individuos al análisis.

En el ANDEVA de dos vías de medidas repetidas, se observa que dentro de las poblaciones existe un efecto significativo para los niveles de corticosterona en los distintos tiempos muestreados (ANDEVA medidas repetidas, $F = 120,173$; $p < 0,001$). No se observaron efectos tanto para las interacciones entre corticosterona-población (ANDEVA medidas repetidas, $F = 1,858$; $p = 0,162$), como para corticosterona-sexo (ANDEVA medidas repetidas, $F = 0,515$; $p = 0,599$). Los resultados de estos efectos de interacción nos indican que no existen diferencias en la magnitud de los cambios en los niveles de corticosterona plasmática durante el experimento entre estos grupos y que por lo tanto, la forma de la curva de elevación de corticosterona no presenta diferencias (Tabla 3, Fig. 3 y 4).

Tabla 3: Pruebas de efectos intra-poblacionales. Se utilizó el modelo univariado de ANDEVA ya que mediante la prueba de esfericidad de Mauchly se estableció que se cumple el supuesto de esfericidad ($W = 0,916$; $p = 0,128$).

Origen	SS tipo III	Gl	Cuadrados medios	F	Sig.
Cort	38,215	2	19,107	120,173	0,000
Cort * Población	0,591	2	0,295	1,858	0,162
Cort * Sexo	0,164	2	0,082	0,515	0,599
Error(Cort)	14,628	92	0,159		

Las pruebas de efectos inter poblacionales del ANDEVA, muestran que existe una diferencia significativa para los niveles de corticosterona entre las dos poblaciones estudiadas ($p < 0,001$). Además muestran que no existe diferencia significativa para los niveles de corticosterona plasmática entre sexos ($p = 0,064$) (Tabla 4, Fig. 3).

Tabla 4: Pruebas de los efectos inter-poblacionales.

Origen	SS tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Población	9,798	1	9,798	23,781	0,000
Sexo	2,074	1	2,074	5,455	0,064
Error	19,777	48	0,412		

Al observar las comparaciones por pares, para explicar el origen de las diferencias entre las concentraciones plasmáticas de corticosterona para los tres tiempos de medición, observamos que éstas presentan un incremento significativo para el intervalo entre el nivel basal y la muestra tomada al minuto 10 ($p < 0,001$). En tanto que entre la muestra de los 10 y la de los 30 minutos no existe una diferencia significativa ($p = 0,609$) (Tabla 5, Fig. 3).

Para interpretar correctamente los resultados del ANDEVA, comparamos las medias poblacionales para cada uno de los tiempos de medición, donde encontramos que las diferencias inter poblacionales en los niveles de corticosterona plasmática, se manifiestan desde los niveles basales observados en la muestra obtenida antes de los 3 minutos luego de su captura y se mantienen en las muestras de los 10 y 30 minutos (Tabla 6).

Tabla 5: Comparaciones por pares. Diferencias significativas en las medias se indican mediante asterisco.

(I)Cort	(J)Cort	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia	
					Límite inferior	Límite superior
1	10	-1,057*	,070	,000	-1,198	-,916
	30	-1,099*	,089	,000	-1,278	-,919
10	1	1,057*	,070	,000	,916	1,198
	30	-,042	,081	,609	-,204	,121
30	1	1,099*	,089	,000	,919	1,278
	10	,042	,081	,609	-,121	,204

Tabla 6: Pruebas t de Student para la igualdad de medias entre Manquehue e Isla Navarino

LnMin	T	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
						Inferior	Superior
1	4,904	48	,000	,688	,140	,406	,970
10	4,199	48	,000	,467	,111	,243	,691
30	2,381	48	,021	,389	,164	,061	,719

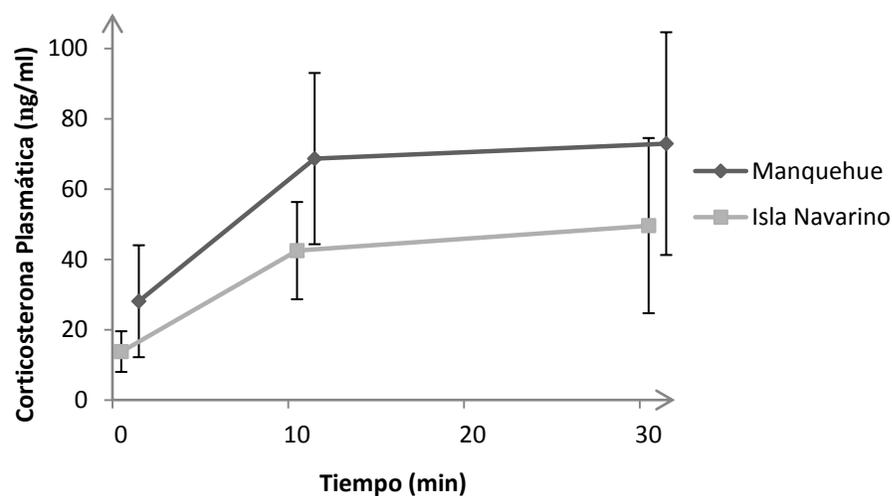


Figura 3: Concentración de corticosterona plasmática en función de la población. Los datos representan las medias poblacionales y las barras la desviación estándar de cada media. En la figura se observan los niveles basales (minuto 0) de corticosterona plasmática de ambas poblaciones y sus respectivos aumentos frente a un evento de estrés agudo.

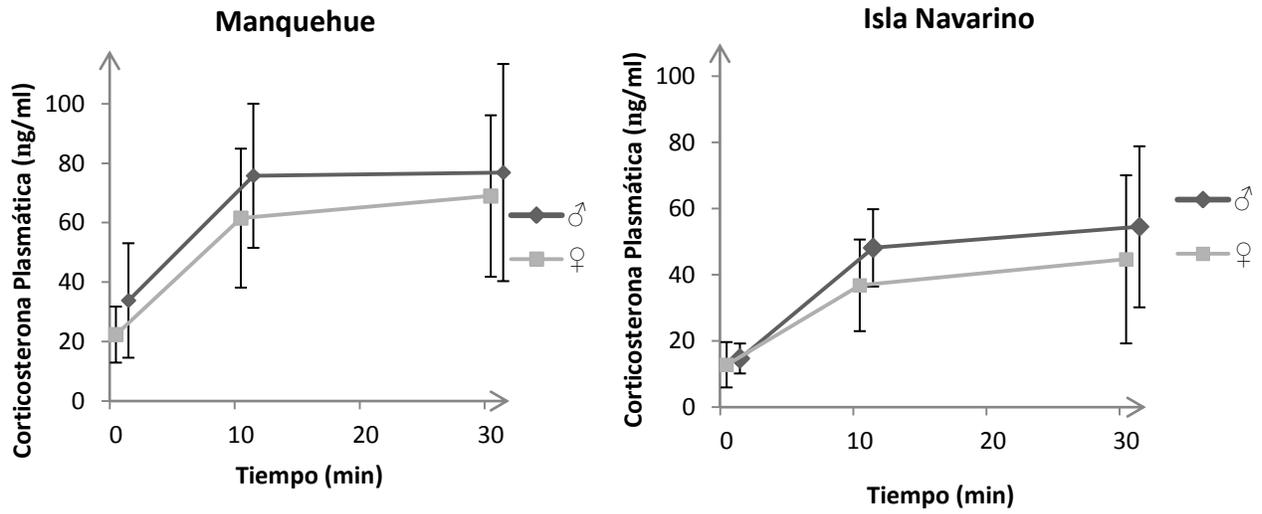


Figura 4: Variación en las concentraciones plasmáticas de corticosterona según sexos y tiempo, para cada población. Los datos representan las medias poblacionales y las barras la desviación estándar de cada media.

DISCUSIÓN

Análisis inter-poblacional

Los resultados demuestran que existe una diferencia significativa en las concentraciones plasmáticas de corticosterona entre las dos poblaciones, aunque la diferencia no se explica por cambios en la magnitud o velocidad de la respuesta adrenal al evento de estrés agudo, por lo que no sería indicativo de un cambio en la reactividad del eje HPA frente a un evento agudo, sino que responde a diferencias en el nivel basal de corticosterona, sobre el cual se eleva con el transcurso del tiempo una respuesta que no difiere entre las poblaciones, presentando variaciones que se mantienen del mismo modo a los 10 y 30 minutos desde la captura.

No se observaron diferencias en la forma de la elevación de corticosterona entre las dos poblaciones, presentando ambas un incremento significativo entre el nivel basal y a los 10 minutos desde la captura, el cual se mantiene a los 30 minutos, sin presentar diferencias significativas entre los 10 y 30 minutos. Lamentablemente por las características de la especie, debido al bajo peso y, por lo tanto, bajo volumen de sangre y a experiencias previas, donde se han observado en otros estudios casos de muerte súbita de rayaditos luego de tiempos de manipulación prolongados, se decidió no tomar una cuarta muestra que podría haber sido a los 45 - 40 minutos, o una muestra intermedia a los 20 minutos para determinar mejor el momento del nivel máximo, o el de estabilización de las concentraciones de corticosterona plasmática. Sin embargo, con estos resultados podemos considerar que para estudios posteriores, en los que el objetivo sea comparar poblaciones de rayadito, sería suficiente con tomar dos muestras de sangre, considerando además de la concentración basal, sólo una segunda muestra a los 30 minutos.

Con estos resultados, no se puede refutar la hipótesis de que en poblaciones extremas exista una regulación negativa del eje HPA, ya que esta menor concentración basal de corticosterona plasmática y por lo tanto, el presentar valores menores durante toda la curva, puede considerarse como un fenómeno de valor adaptativo, donde debido a un efecto de supresión o inhibición, el eje HPA se mantiene a un menor nivel de actividad, con

una concentración plasmática de corticosterona circulante basal menor en poblaciones de mayores latitudes, que les conferiría una mayor resistencia frente a eventos que activen una respuesta de estrés. Podemos afirmar esto, ya que el aumento de la concentración de corticosterona se presenta de igual manera en las dos poblaciones, lo que produce finalmente que los valores máximos de corticosterona plasmática sean menores en Isla Navarino que en Manquehue, produciendo así una respuesta fisiológica y conductual de menor intensidad, resultante en menores probabilidades de abandonar las actividades reproductivas, en la población del extremo sur. En esta población, los rayaditos suelen enfrentarse a eventos como nevazones o temporales de viento y granizo una vez comenzada la época de postura, e incluso mientras se encuentran aprovisionando ya a los pichones, por lo tanto, para su éxito reproductivo es importante la capacidad de poder sobrellevar estos fenómenos, con el fin de al menos conseguir una nidada exitosa en la temporada reproductiva. Además, es posible que por las duras condiciones del invierno austral, en esta población exista una menor sobrevivencia tanto para los pichones como para los adultos.

Análisis intra-poblacional

Intrapoblacionalmente, observamos que no existen diferencias significativas entre machos y hembras, en sus concentraciones plasmáticas de corticosterona en ninguna de las dos poblaciones estudiadas, por lo que podemos considerar que la reactividad del eje HPA o su nivel de estresabilidad es similar entre sexos y que esta similitud, se mantiene estable entre poblaciones de distinta latitud. De todos modos observamos que la media de corticosterona plasmática de los machos muestra una tendencia a ser mayor que la de las hembras, aunque no presentan diferencias estadísticamente significativas.

El rayadito es un ave conductualmente monógama, donde una vez eclosionados los huevos, macho y hembra comparten tanto las tareas de alimentación como de retiro de sacos fecales del nido durante todo el desarrollo de los pichones (Moreno *et al.*, 2007). Se ha visto que machos y hembras de rayadito, no presentan diferencias en las conductas de defensa del nido, ante la presencia de depredadores en los días 4 a 6 de la crianza de pichones (Ippi, 2009). De este modo los dos padres realizan igual inversión parental en el

intento reproductivo, durante toda la crianza de los pichones y frente a un evento de estrés agudo no difieren en su respuesta adrenocortical.

Sería interesante evaluar con mayor potencia una posible diferencia entre machos y hembras, aumentando el número de individuos muestreados y si es posible, agregando al menos una población más dentro del rango latitudinal, para definir si existen o no diferencias estadísticas entre la respuesta de machos y hembras, que podrían estar relacionadas con algún mayor grado de cuidado parental de la hembra sobre los polluelos, suprimiendo ésta su respuesta adrenocortical en mayor grado que los machos a medida que aumenta la latitud y por lo tanto, la demanda energética por parte de los pichones.

Otros factores inter poblacionales

La temporada reproductiva más corta en Isla Navarino, comenzando después y terminando antes que en Manquehue, probablemente a causa de factores como temperatura y duración del día (en Manquehue el primer huevo fue puesto el 20 de septiembre y la primera eclosión ocurrió el 15 de octubre, mientras que en Isla Navarino la primera oviposición fue el 16 de octubre y la primera eclosión el 10 de noviembre), que hace más difícil que ocurran segundas nidadas por pareja, además del mayor número de huevos por nido en Isla Navarino que en Manquehue (Vásquez, datos no publicados), podría estar relacionada con una mayor importancia de una nidada (inversión energética), para el éxito reproductivo de los adultos y por el hecho de que aún presenta precipitaciones de lluvia, granizo y nieve hasta avanzada la temporada, incluso cuando ya han eclosionado algunos nidos, por lo tanto, sería beneficioso suprimir esta respuesta en virtud de evitar el abandono temporal o total del nido y así, maximizar las posibilidades de una nidada exitosa.

Las diferencias en las concentraciones de corticosterona plasmática entre las dos poblaciones, sin embargo, puede estar relacionada con algunos factores adicionales a las diferencias climáticas de origen latitudinal de ambos sitios. El riesgo de depredación puede afectar conductas de forrajeo y alimentación de juveniles y también, la presencia de depredadores puede incrementar la concentración de corticosterona plasmática en aves con polluelos (Scheuerlein, 2001). De este modo, al tener un riesgo de depredación mayor en

Manquehue que en Isla Navarino (Vásquez, datos no publicados), podría ser el caso que en esta población los rayaditos tuvieran niveles de corticosterona incrementados para poder responder con más rapidez frente a intentos de depredación.

La respuesta de GCs plasmáticos frente a la presencia de humanos ha resultado bastante predecible. Los animales “ingenuos”, sin contacto previo con humanos, presentan una concentración plasmática de GCs elevada frente a la visita de turistas (Fowler, 1999; Walker *et al.*, 2006), y la mayoría de las especies se habitúan a la presencia humana con el paso del tiempo, presentando similares o iguales concentraciones basales entre poblaciones visitadas frecuentemente y poblaciones no intervenidas (Fowler, 1999; Romero y Wikelski, 2002; Walker *et al.*, 2005; 2006; Ellenberg *et al.*, 2007). Bajo este supuesto se considera que nuestra presencia desde hace un par de años, durante la temporada reproductiva completa, con monitoreo de las cajas nido más de una vez por semana desde antes incluso de la formación de los nidos, no produce alteraciones en los niveles basales de corticosterona en los individuos estudiados, además, ambos sitios han sido estudiados de igual forma durante los años previos, equiparando el efecto de adecuación a la presencia humana en las dos poblaciones.

Otro factor que podría estar afectando el grado de estrés, podría atribuirse a distintos niveles de contaminación ambiental en los dos sitios de muestreo. Estudios demuestran que iguanas y pingüinos contaminados en derrames de petróleo, presentan concentraciones de GCs mayores que individuos de áreas limpias (Fowler *et al.*, 1995; Wikelski, 2001). Sin embargo, no se han realizado estudios que demuestren efectos de la contaminación del aire sobre el estrés de poblaciones naturales. Un estudio realizado en aves *Ficedula hypoleuca*, comparando efectos de la contaminación por metales pesados producida por una mina de cobre, no encontró diferencias entre poblaciones expuestas y libres de contaminación (Eeva *et al.*, 2005).

Con respecto al monitoreo de nidos post experimentos, no se observaron casos de abandono por parte de los adultos luego de realizar las series de estrés. Por lo tanto, debido a que en este estudio sólo hicimos seguimiento diario del nido y no observamos la conducta de los adultos inmediatamente posterior al experimento, no pudimos realizar correlaciones entre las respuestas adrenocorticales y conductuales de cada población, aunque esto nos indica que el estrés inducido por el experimento no produce en ninguna de

las dos poblaciones un abandono definitivo del nido, sino que, como se ha observado en otros estudios, solamente ocurre una interrupción de las tareas por un breve período de tiempo (van Dongen *et al.*, 2009). Esto nos indica además que la realización de experimentos de campo, como el protocolo captura y manipulación para medir estrés, no interfiere con el proceso reproductivo de las aves al menos durante la etapa parental.

A futuro podría realizarse un experimento para observar diferencias entre poblaciones, en el tiempo que demoran los adultos en retornar a las actividades de aprovisionamiento del nido después de realizarse sus mediciones, ya que sabemos que los individuos demoran un período variable de tiempo en volver a sus actividades, luego de ser capturados y manipulados, reduciendo durante ese período su tasa de aprovisionamiento a los polluelos (van Dongen *et al.*, 2009). Así podríamos relacionar más íntimamente el evento de estrés agudo provocado, con variables conductuales ligadas directamente al éxito reproductivo. Además sería interesante agregar más poblaciones de latitudes intermedias a este estudio, con el fin de establecer si los resultados corresponden efectivamente a un efecto de la latitud, o si son más importantes otros factores y si el factor latitud define un aumento direccional en la supresión de los niveles de corticosterona durante la reproducción.

Finalmente, podemos destacar que el estudio del estrés de poblaciones naturales en cualquier especie animal, es mucho más complejo que medir los niveles de corticosterona y definir con esta información el grado de estrés de una población, por ejemplo, cuando se busca evaluar estados de bienestar de una población. Existen muchas variables que pueden afectar produciendo distintas condiciones hormonales, siendo estas normales para la población. Es importante entonces identificar las diferencias de las condiciones a las que estén sometidas las distintas poblaciones, donde pueden existir diferencias fisiológicas entre individuos residentes en climas más o menos estables y por ejemplo, entre machos compitiendo por hembras, machos jóvenes, hembras preñadas, criando o receptivas. Por lo tanto el entendimiento de los mecanismos subyacentes a los cambios observados en poblaciones expuestas a distintas perturbaciones, cambios temporales o permanentes de su medio ambiente, es un aspecto relevante si se quieren usar herramientas de endocrinología para la conservación de poblaciones animales. Los niveles y cambios de GCs, pueden correlacionarse tanto con cambios del medio ambiente como con parámetros

reproductivos, pero la intensidad y dirección de estas relaciones no siempre se ajusta a las predicciones. Los GCs responden a estados internos y externos de formas no lineales (Busch y Hayward, 2009), por lo tanto, es necesario considerar diversos factores que puedan estar afectando a distintas poblaciones y establecer ciertas asociaciones para una correcta interpretación.

CONCLUSIONES

1. Las poblaciones estudiadas de rayadito presentan diferentes concentraciones basales de corticosterona plasmática, con una magnitud menor en la población de Isla Navarino (mayor latitud) que en Manquehue, diferencia que se mantiene al enfrentarse a un evento de estrés agudo, manifestándose también en los niveles máximos alcanzados durante el experimento.
2. La magnitud de la respuesta del eje HPA, medida por la concentración plasmática de corticosterona frente al protocolo de captura y manipulación, no difiere entre estas dos poblaciones.
3. Machos y hembras no presentaron diferencias estadísticamente significativas en sus niveles de corticosterona frente a un evento de estrés agudo, fenómeno que se relacionaría con su estrategia reproductiva y la inversión reproductiva que realizan ambos padres durante la crianza de los pichones.

BIBLIOGRAFÍA

Bijlsma R., Loeschcke V. 1997. Environmental Stress. Adaptation and Evolution. Birkhauser. Basle. 325pp.

Breuner C.W., Greenberg A.L., Wingfield J.C. 1998. Noninvasive corticosterone treatment rapidly increases activity in Gambel's white-crowned sparrows (*Zonotrichia leucophrys gambelii*). Gen. Com. Endocr. 111: 386–394.

Breuner C.W., Patterson S.H., Hahn T.P. 2008. In search of relationships between the acute adrenocortical response and fitness. Gen. Com. Endocr. 157: 288–295.

Busch D.S., Hayward L.S. 2009. Stress in a conservation context: A discussion of glucocorticoid actions and how levels change with conservation-relevant variables. Biol. Conserv. 142: 2844-2853.

Darwin C. 1859. On the origin of the species by means of natural selection, or, the preservation of favoured races in the struggle for life. John Murray. London. 502 pp.

Eeva T., Hasselquist D., Langefors A., Tummeleht L., Nikinmaa M., Ilmonen P. 2005. Pollution related effects on immune function and stress in a free-living population of pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*). J. Avian Biol. 36: 405–412.

Ellenberg U., Setiawan A.N., Cree A., Houston D.M., Seddon P.J. 2007. Elevated hormonal stress response and reduced reproductive output in yellow-eyed penguins exposed to unregulated tourism. Gen. Com. Endocr. 152: 54–63.

Fenske M. 1989. Application of a new, simple method for quantitative collection of 24-hour urines in small laboratory animals: Determination of basal excretion of proteins, creatinine, urea, electrolytes, and free steroids. Z. Versuchstierkd. 32: 65-70.

Fowler G.S., Wingfield J.C., Boersma P.D. 1995. Hormonal and reproductive effects of low levels of petroleum fouling in magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). Auk. 112: 382–389.

Fowler G.S. 1999. Behavioral and hormonal responses of Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) to tourism and nest site visitation. Biol. Conserv. 90: 143–149.

Fridolfsson A-K., Ellegren H. 1999. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. J Avian Biol. 20: 116.121.

Ganong, W.F. 1991. Fisiología médica. Decimotercera edición. El Manual Moderno, México D.F. 744 pp.

Gaunt A.S., Oring L.W., Able K.P., Anderson D.W., Baptista L.F., Barlow J.C., Wingfield J.C. 1997. Guía para la utilización de aves silvestres en investigación. The Ornithological Council, Washington D.C., USA. 62 pp.

Hajek E., Di Castri F. 1976. Bioclimatología de Chile. Vicerrectoría Académica, P. Universidad Católica de Chile, 128 pp.

Hoffmann A. A., Parsons, P. A. 1991. Evolutionary Genetics and Environmental Stress. Oxford University Press, Oxford. 284 pp.

Holberton R.L., Wingfield J.C. 2003. Modulating the corticosterone stress response: a mechanism for balancing individual risk and reproductive success in Arctic-breeding sparrows? Auk. 120: 1140-1150.

Ippi S. 2009. Conducta Antidepredatoria y Territorial en el Rayadito (*Aphrastura spinicauda*): Comparaciones Interpoblacionales en Conducta Vocal y de Defensa. Tesis Doctorado en Ciencias. Universidad de Chile, Fac. Ciencias. 152 pp.

Johnson A. W., Goodall J.D. 1967. The birds of Chile and adjacent regions of Argentina, Bolivia and Peru. Platt Establecimientos Gráficos S. A., Buenos Aires. 447 pp.

Korte S., Koolhaas J., Wingfield J.C., McEwen B. 2005. The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29: 3–38.

Lazarus R. S., Folkman S. 1984. Coping and adaptation. *Handbook of Behavioral Medicine* (W. D. Gentry, ed.). Guilford. New York, USA. pp. 282-325.

Levine S., Ursin H. 1991. What is stress? *Stress, Neurobiology and Neuroendocrinology* (M. R. Brown, G. F. Koob, and C. Rivier, eds.). Marcel Dekker, New York, USA. pp. 3-21.

Miller M. W., Hobbs N. T., Sousa M. C. 1991. Detecting stress responses in Rocky Mountain bighorn sheep (*Ovis canadensis canadensis*): Reliability of cortisol concentrations in urine and feces. *Can. J. Zool.* 69: 15-24.

Moller A.P., Milinski M. 1998. *Stress and behavior* (Møller AP, Milinski M, Slater PJB, eds.). San Diego: Academic Press. 552 pp.

Moreno J., Merino S., Vásquez R.A., Armesto J. 2005. Breeding biology of the Thorn-tailed rayadito (furnariidae) in south-temperate rainforests of Chile. *The Condor* 107: 69-77.

Moreno J., Merino S., Lobato E., Rodríguez-Gironés M.A., Vásquez R.A. 2007. Sexual dimorphism and parental roles in the Thorn-tailed rayadito (furnariidae). *The Condor* 109: 312-320.

Norris D.O. 2007. *Vertebrate Endocrinology*, 4th edition. Elsevier Academic Press, Burlington, MA, USA. 511 pp.

Pravosudov V., Kitaysky A., Wingfield J.C., Clayton N. 2004. No latitudinal differences in adrenocortical stress response in wintering black-capped chickadees (*Poecile atricapilla*). *Comp. Biochem. Phys. A.* 137: 95–103.

Romero L.M. 2002. Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *Gen. Com. Endocr.* 128: 1–24.

Romero L.M., Wikelski M. 2002. Exposure to tourism reduces stress-induced corticosterone levels in Galápagos marine iguanas. *Biol. Conserv.* 108: 371–374.

Sapolsky R. M. 1982. The endocrine stress-response and social status in the wild baboon. *Horm. Behav.* 16: 279-292.

Sapolsky R.M., Romero L.M., Munck A.U. 2000. How do glucocorticosteroids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory and preparative actions. *Endocr. Rev.* 21: 55–89.

Scheuerlein A., Van't Hof T.J., Gwinner E. 2001. Predators as stressors? Physiological and reproductive consequences of predation risk in tropical stonechats (*Saxicola torquata axillaris*). *P. Roy. Soc. Lond. B.* 268: 1575–1582.

Selye H. 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138: 32-32

van Dongen W., Lazzoni I., Vásquez R.A. 2009. Behavioral experiments in a wild passerine cause short-term reductions in parental provisioning and nestling mass. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 82: 223-231

von Holst D. 1998. The concept of stress and its relevance for animal behavior. *Stress and behavior* (Møller AP, Milinski M, Slater PJB, eds). Academic Press. San Diego, USA. pp. 1-132.

Wada H., Moore I., Breuner W., Wingfield J.C. 2006. Stress Responses in Tropical Sparrows: Comparing Tropical and Temperate *Zonotrichia*. *Physiol. Biochem. Zool.* 79(4): 784–792.

Wada M., Shimizu T. 2004. Seasonal changes in adrenocortical responses to acute stress in polygynous male bush warblers (*Cettia diphone*). *Gen. Com. Endocr.* 135: 193–200.

Walker B.G., Boersma P.D., Wingfield J.C. 2005. Physiological and behavioral differences in Magellanic penguin chicks in undisturbed and tourist-visited locations of a colony. *Conserv. Biol.* 19: 1571–1577.

Walker B.G., Boersma P.D., Wingfield J.C. 2006. Habituation of adult Magellanic penguins to human visitation as expressed through behavior and corticosterone secretion. *Conserv. Biol.* 20: 146–154.

Weiner H. 1991. Behavioral biology of stress and psychosomatic medicine. *Stress, Neurobiology and Neuroendocrinology* (M. R. Brown, G. F. Koob, and C. Rivier, eds.). Marcel Dekker, New York, USA. pp. 23-51.

Weiss J.M. 1968. Effects of coping responses on stress. *J. Comp. Physiol. Psych.* 65: 251-260.

Wikelski M., Romero L.M., Snell H.L. 2001. Marine iguanas oiled in the Galápagos. *Science* 292: 437–438.

Wingfield J.C. 1994. Modulation of the adrenocortical response to stress in birds. In *Perspectives in Comparative Endocrinology* (K.G. Davey, R.E. Peter, and S. S. Tobe, Eds.). National Research Council of Canada, Ottawa. p.p. 520-528.

Wingfield J.C., Vleck C.M., Moore M.C. 1992. Seasonal changes of the adrenocortical response to stress in birds of Sonoran desert. *J. Exp. Zool.* 264: 419–428.

Wingfield J.C., Maney D., Breuner C., Jacobs J., Lynn S., Ramenofsky M., Richardson R. 1998. Ecological bases of hormone-behavior interactions: the "emergency life history stage". *Am. Zool.* 38: 191-206.

Wingfield J.C., Kitaysky A.S. 2002. Endocrine responses to unpredictable environmental events: Stress or anti-stress hormones? *Integ. Comp. Biol.* 42: 600-609.

Wingfield J. C., Meddle S.L., Moore I., Busch S., Wacker D., Lynn S., Clark A., Vásquez R.A., Addis E. 2007. Endocrine responsiveness to social challenges in northern and southern hemisphere populations of *Zonotrichia*. *J. Ornithol.* 148S: 435-441.

ANEXO 1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
COMITÉ DE ÉTICA

Casilla 653, Santiago-Chile
e-mail : apreller@uchile.cl

Teléfono 56-2-9787395
Fax : 239 27 55

Integrantes del Comité de Ética

Dr. Nicolas Guiliani
Dra. Madeleine Lamborot
Dra. Ana Preller
Dr. Aurelio San Martín
Dr. Tito Ureta
Dr. Alberto Veloso

CERTIFICADO

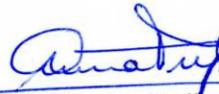
El Comité de Ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile ha revisado el Proyecto de Investigación *Animal personalities and the underlying roles of behavioral innovation and decision-making*. El investigador responsable es el Dr. Rodrigo Vásquez, académico del Departamento de Ciencias Ecológicas de esta Facultad.

El comité ha analizado el *Protocolo de manejo de especies vivas para experimentación* presentado por el investigador, el resumen del proyecto y la sección Materiales y Métodos completa, además de una copia de la Resolución emitida por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG).

Como resultado de este análisis hemos constatado que en el proyecto se utilizarán diferentes especies de aves y mamíferos. La captura de dichas especies, los lugares y métodos de captura que serán utilizados, así como las condiciones de cautiverio, están debidamente autorizados por el SAG. Los experimentos se harán en terreno y en el laboratorio del Dr. Vásquez, en el Departamento de Ciencias Ecológicas. El transporte, manipulación y cuidado de los animales capturados se hará de acuerdo con las normas del ASM (American Society of Mammalogists). No se sacrificarán animales; una vez finalizada la investigación, éstos serán devueltos a los lugares de captura.

En relación a los aspectos de Bioseguridad, el proyecto no contempla la manipulación de reactivos ni desechos peligrosos.

En conclusión, las metodologías propuestas están de acuerdo con las normas internacionalmente aceptadas y el proyecto presentado cumple con las normas establecidas por este Comité.


Dra. Ana Preller
Presidenta Comité de Ética



Santiago, 10 de Julio de 2008

