



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

**INFLUENCIA DE LA CORTICOSTERONA EN EL UMBRAL DE  
RESPUESTA VOCAL EVOCADA Y AGRESIVA DEL ANURO  
*Pleurodema thaul* (Amphibia; Leptodactylidae).**

**CRISTIAN EDUARDO OLIVARES ZEPEDA**

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

PROFESOR GUÍA: RIGOBERTO A. SOLÍS M.

**SANTIAGO - CHILE**

**2011**



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

**INFLUENCIA DE LA CORTICOSTERONA EN EL UMBRAL DE  
RESPUESTA VOCAL EVOCADA Y AGRESIVA DEL ANURO  
*Pleurodema thaul* (Amphibia; Leptodactylidae).**

**CRISTIAN EDUARDO OLIVARES ZEPEDA**

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

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : RIGOBERTO SOLÍS M.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: SONIA ANTICEVIC C.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: MARCO GALLEGUILLOS C.	.....	.....

**SANTIAGO - CHILE  
2011**

## **AGRADECIMIENTOS.**

A mis padres Ricardo y Verónica y a mis hermanos Rodrigo, Verónica, Sylvia y Gonzalo, muchas gracias por su amor y por estar siempre apoyando mis pasos. Hoy cumpla una de las metas más importantes y es gracias a ustedes.

Agradezco al Dr. Rigoberto Solís por su enorme paciencia y confianza, y por brindarme siempre sus sabios consejos y amistad.

Gracias a Mauricio Ramos por su inapreciable ayuda durante todo este trabajo y por su gran amistad.

Gracias al Sr. Carlos Viedma por su asistencia en terreno.

Agradezco a los académicos Sra. Sonia Anticevic, Sr. Marco Galleguillos y Sr. Ricardo Olivares por sus valiosos comentarios para este escrito.

Muchas gracias a la Familia Rojas Pineda por su invaluable apoyo y amistad en los momentos difíciles.

A todos los que participaron de "EcoVet" durante los años 2008 y 2009, gracias por su amistad y por los buenos momentos que compartimos en aras de la fauna silvestre.

Agradezco a todos los integrantes del "Proyecto AltoAndino" durante los años 2008 y 2011, por acompañarme en la mejor experiencia de mi vida.

A mis amigos del Hogar Universitario Juan Gómez Millas: David, D'angelo, Felipe, Héctor, Juan y Kris, por todos los buenos momentos compartidos entre los estudios y el diario vivir.

Gracias a todos mis amigos (que son muchos) de la Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias de La Universidad de Chile, por la hermosa amistad que hemos cultivado en todos estos años. Lo mejor de la Universidad fue conocerlos a ustedes.

Finalmente, gracias a la Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias, por el Fondo de Investigación en Veterinaria 12101401.9102.005 que financió parcialmente esta Memoria de Título.

## INDICE

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	
• <b>Antecedentes Generales</b> .....	<b>4</b>
• <b>Conducta Vocal y Hormonas</b> .....	<b>6</b>
• <b>Conducta vocal y Corticosterona</b> .....	<b>7</b>
• <b>El Sujeto Experimental</b> .....	<b>13</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
• <b>Sitio de Estudio</b> .....	<b>15</b>
• <b>Síntesis de Estímulos Acústicos</b> .....	<b>15</b>
• <b>Sistema Experimental</b> .....	<b>17</b>
• <b>Protocolo de Estimulación</b> .....	<b>19</b>
• <b>Mediciones Corporales y Toma de Muestras</b> .....	<b>20</b>
• <b>Análisis de las Respuestas Vocales Evocadas</b> .....	<b>21</b>
• <b>Análisis Hormonal</b> .....	<b>23</b>
• <b>Análisis Estadístico</b> .....	<b>23</b>
<b>RESULTADOS</b>	
• <b>Objetivo 1</b> .....	<b>26</b>
• <b>Objetivo 2</b> .....	<b>26</b>
• <b>Objetivo 3</b> .....	<b>27</b>
• <b>Objetivo 4</b> .....	<b>27</b>
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>28</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>33</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>34</b>

## RESUMEN

En los anfibios anuros, la comunicación acústica juega un rol fundamental en la reproducción, ya que durante la estación reproductiva, los machos generalmente forman coros donde decenas o cientos de individuos emiten cantos o “llamadas de advertencia” para atraer a las hembras, las que a su vez “eligen” entre las potenciales parejas a través de la información codificada en estos cantos. Se han descrito diversos factores que pueden afectar las vocalizaciones de los anuros y por ende, la reproducción, existiendo un cuerpo de evidencia cada vez mayor que señala a los niveles circulantes de hormonas esteroidales como uno de estos factores.

En esta memoria se analizó la influencia de la hormona corticosterona (CORT) en la percepción de señales acústicas y en la conducta vocal de machos de *Pleurodema thaul*, estudiando particularmente el efecto de esta hormona en los umbrales de respuesta vocal evocada y agresiva. Esto se realizó mediante experimentos de canto evocado (“playback”), en los cuales machos de *P. thaul* fueron estimulados con intensidades crecientes de una imitación sintética de su llamada de advertencia especie-específica, seguido de la toma de muestras de sangre para la medición de sus niveles plasmáticos CORT.

Se encontró una correlación negativa entre los niveles circulantes de CORT y los umbrales de respuesta vocal evocada de los machos, pero no se encontró correlación estadísticamente significativa entre esta hormona y el umbral de respuesta agresiva. A su vez, se encontró una correlación negativa entre la superficie corporal y los umbrales de respuesta vocal evocada de los sujetos experimentales.

Estos datos sugieren un efecto positivo, aunque indirecto, de la CORT sobre la conducta reproductiva de este anuro, disminuyendo la intensidad de sonido con que son percibidas las llamadas de advertencia de sus vecinos más cercanos.

## **1.-INTRODUCCIÓN**

Una de las características más importantes que podemos reconocer en la evolución conductual de los sistemas vivos es la comunicación, siendo una de las formas de interacción social más importante la que se realiza por medio del sonido. El nivel de complejidad de este tipo de comunicación varía y se desarrolla a medida que avanzamos en la escala filogenética.

En los anfibios anuros (ranas y sapos), la comunicación acústica juega un rol fundamental en el éxito reproductivo de la mayoría de las especies. Dentro del acotado repertorio de vocalizaciones que poseen los anuros, la más común es el canto nupcial o “llamada de advertencia” producida por los machos. La producción y recepción de la llamada de advertencia sirve para coordinar la conducta reproductiva de los dos sexos. Las hembras usan las claves acústicas contenidas en estos cantos para orientarse hacia machos sexualmente activos (proceso conocido como fonotaxis) y elegir entre las potenciales parejas.

Se han descrito diversos factores bióticos y abióticos que pueden afectar las vocalizaciones de los anuros y por ende, la reproducción. Entre éstos se encuentran la estación del año, condiciones ambientales y diferencias en atributos físicos entre los individuos (condición corporal, salud, tamaño y edad). Además de estos últimos, existe evidencia que los niveles circulantes de hormonas esteroidales constituyen otro atributo individual que afecta la actividad vocal de ranas y sapos en los coros o agregaciones reproductivas.

El rol de los andrógenos sobre la conducta vocal ha sido descrito en varios estudios y sus efectos están relativamente claros, estimándose que son al menos necesarios para la iniciación y mantención estacional de la conducta de canto. También se ha propuesto que la hormona del estrés, corticosterona (CORT), puede tener efectos sobre la vocalización, no obstante, la literatura al respecto es bastante reducida y entrega resultados contradictorios y confusos, difíciles de interpretar.

Dado el carácter altamente conservado de las estructuras y sistemas hormonales implicados en el control de la conducta reproductiva entre las distintas taxa de vertebrados, el estudio de las bases hormonales de la comunicación acústica en anuros representa un modelo útil para investigar los mecanismos de acción de estos sistemas en la fisiología sensorial y el comportamiento de los vertebrados en general.

Este estudio intenta establecer el rol que cumple la hormona corticosterona en la percepción de señales acústicas y en la conducta vocal de machos de *Pleurodema thaul*, anfibio leptodactílido de amplia distribución en Chile central. Particularmente, se investigó en los machos de esta especie el efecto de esta hormona en los umbrales de intensidad de sonido, que evocan respuestas vocales y de contenido agresivo, respectivamente.

## **2.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1.-Antecedentes generales**

Uno de los factores más importantes que podemos reconocer en la evolución conductual de los sistemas vivos es la comunicación. Entre las modalidades de ésta, una de las formas de interacción social más importante es la que se realiza por medio del sonido. El nivel de complejidad de ésta varía y se desarrolla a medida que avanzamos en la escala filogenética (Wilczynski y Ryan, 1988).

Muchos de los despliegues conductuales asociados a la comunicación tienen lugar en el contexto de la reproducción. A menudo los despliegues conductuales más notorios son señales para atraer pareja, que sirven a su vez para identificar individuos de la misma especie, además del sexo y estado reproductivo de éstos. De este modo las señales de comunicación son también importantes componentes de la competencia territorial e intrasexual (Wells, 1977; Rand, 1988).

En este contexto, la más conocida y extensamente estudiada conducta de los anuros (ranas y sapos) es su sistema de comunicación acústica (Rand, 1988). Las señales acústicas emitidas por los anuros son bastante estereotipadas y acotadas en su repertorio (Solís, 1994), siendo la vocalización más estudiada el denominado canto nupcial o “llamada de advertencia”, emitida por los machos de numerosas especies para atraer hembras y en algunos casos para delimitar su territorio (Marler y Ryan, 1996; Burmeister y Wilczynski, 2000; Kelley, 2004). Además, en algunas especies también existen “cantos agresivos” con los cuales los machos repelen a otros individuos coespecíficos (Kelley, 2004), y “cantos de liberación” o de rechazo sexual, emitidos por machos y hembras no receptivas sexualmente cuando son abordadas por otros individuos (Moore *et al.*, 2005; Penna y Díaz-Páez, 2008).

La actividad reproductiva en anuros tiene diversos cursos temporales, habiendo especies con períodos reproductivos prolongados, de varias semanas e incluso meses y especies con reproducción explosiva, que concentran la actividad reproductiva en unos pocos días (Penna y Díaz-Páez, 2008). De lo anterior se desprende que en anuros existe una clara e inequívoca relación entre comunicación vocal y reproducción (Wilczynski y Chu, 2001). En la gran mayoría de las especies que vocalizan, los machos son los únicos que emiten cantos (Archs y Narins, 2009), los que en la estación reproductiva forman agrupaciones o coros donde decenas o cientos de individuos cantan simultáneamente para atraer a las hembras a los sitios de reproducción. A su vez, cada especie produce un canto distintivo especie-específico que facilita el aislamiento reproductivo pre cigótico y así, la especiación (Kelley, 2004). Las hembras usan las señales acústicas contenidas en estos cantos para guiarse hacia los machos sexualmente activos (proceso conocido como fonotaxis) y luego elegir entre las potenciales “parejas” (Leary, 2009).

Así, la producción y recepción de llamadas de advertencia sirve para coordinar la conducta reproductiva de los dos sexos (Arch y Narins, 2009), por lo que los sistemas de comunicación acústica en anuros están sometidos a una fuerte presión de selección sexual (Kelley, 2004).

Es importante mencionar que los machos de muchas especies que vocalizan pueden también adoptar una táctica “satélite” no vocalizadora. Los machos “satélites” permanecen frecuentemente en las proximidades de machos coespecíficos que sí cantan e intentan interceptar a las hembras que son atraídas por las llamadas de advertencia de éstos (Leary *et al.*, 2004; Wilczynski *et al.*, 2005).

A pesar del acotado repertorio vocal de los anuros, a nivel individual la conducta vocal presenta gran variabilidad y esta variación es de gran importancia para entender sus interacciones acústicas y sociales (Gómez-Lobo, 2002; Labra *et al.*, 2008).

Es sabido que ciertas características espectrales y temporales del canto son preferidas por las hembras y que algunas de estas características se encuentran bajo una selección estabilizadora (o selección direccional débil) mientras que otras se encuentran bajo una fuerte selección direccional (Gerhardt, 1991). La frecuencia dominante y la tasa de repetición de pulsos, por ejemplo, son a menudo propiedades acústicas denominadas “estáticas” (muestran bajos niveles de variación intra individual) y están sujetos a una selección estabilizadora (las hembras generalmente prefieren valores cercanos a la media poblacional). Sin embargo, como en muchos otros organismos, la persistencia de las señales, es decir, el tiempo total que el animal ocupa en cantar y el esfuerzo vocal (la cantidad de señales emitidas por unidad de tiempo) son también de importancia central en la elección de pareja. Los parámetros vocales que demuestran esfuerzo vocal, como la tasa y duración del canto, a menudo son altamente variables intra e inter individualmente (son dinámicas) y se encuentran generalmente bajo una fuerte selección direccional (Gerhardt, 1991; Emerson, 2001; Leary, 2009).

Se han descrito diversos factores que pueden afectar las vocalizaciones de los anuros y por ende, la reproducción. Entre éstos, la estación del año, condiciones ambientales y diferencias en atributos físicos entre los individuos como tamaño corporal, condición nutricional, salud y edad, han sido reportados (Moore y Jessop, 2003). Además de estos últimos, existe un cuerpo reciente, pero cada vez mayor de evidencia que indica que los niveles circulantes de hormonas esteroidales constituyen otro atributo individual que afecta la actividad vocal de ranas y sapos en los coros o agregaciones reproductivas (Moore *et al.*, 2005; Wilczynski *et al.*, 2005).

Por otra parte, a pesar de que la mayoría de las investigaciones en anuros se han centrado en la influencia hormonal sobre la producción de señales vocales, algunos estudios sostienen la idea de un potente rol de las hormonas sobre la regulación de la función auditiva y así, sobre la recepción y procesamiento de las señales acústicas (Al-Mana *et al.*, 2008; Arch y Narins, 2009).

## **2.2.-Conducta vocal y hormonas**

Dado el rol de la comunicación acústica como mediador de las interacciones sociales en anuros, no es sorprendente que sus sistemas de comunicación vocal estén fuertemente influenciados por los sistemas hormonales que regulan la reproducción (Archs y Narins, 2009).

Diversos estudios han determinado que los andrógenos y estrógenos son críticos para la expresión de la conducta reproductiva en machos y hembras, respectivamente, y sus efectos están relativamente estudiados. En machos, los andrógenos juegan un rol crítico durante las primeras etapas del desarrollo postmetamórfico, induciendo cambios importantes en los cartílagos y fibras musculares de la laringe e indirectamente en las neuronas motoras que las inervan. De este modo, los andrógenos masculinizan estructuras periféricas que influyen las propiedades del canto de advertencia de los machos (Leary, 2009). En concordancia con lo anterior, varios estudios han demostrado que en machos anuros adultos, poblaciones neuronales de regiones cerebrales y medulares implicadas en la modulación de la conducta de canto pueden presentar importantes cantidades de andrógenos y/o marcada inmunoreactividad a receptores para andrógenos (Wilczynski y Chu, 2001).

Sumado a lo anterior, existe consenso en que los andrógenos son al menos necesarios para la iniciación y mantención de la conducta estacional de canto (Moore *et al.*, 2005; Wilczynski *et al.*, 2005). Por ejemplo, en el anuro leptodactílido centroamericano *Eleutherodactylus coqui*, los machos que cantan activamente presentan altos niveles de testosterona, comparados con aquellos vocalmente inactivos (Townsend y Moger, 1987). De acuerdo con ese resultado, Solís (1994), registró un incremento de los niveles plasmáticos de testosterona coincidente con el establecimiento e inicio de la actividad vocal en machos del anuro chileno *Pleurodema thaul*. En otro estudio, Solís y Penna (1997) encontraron una correlación positiva entre los niveles circulantes de testosterona y el número de cantos evocados por machos de la especie *Batrachyla taeniata*; además, estos autores indican que los machos con más altos niveles de testosterona respondieron de manera menos selectiva, vocalizando incluso ante la presentación de estímulos de estructura temporal muy diferente al canto natural de la especie, sugiriendo que la testosterona tendría un importante efecto sobre el estado motivacional de los machos (Solís y Penna, 1997). Resultados similares se encontraron para el anuro chileno *Batrachyla Leptopus* (Gómez-Lobo, 2002).

El evidente rol de los esteroides gonadales sobre la conducta de comunicación no debe hacernos olvidar el hecho que otros factores hormonales pueden influenciar la fisiología y la conducta reproductiva (Wilczynski y Chu, 2001). Existe evidencia que diversos productos endocrinos y neuromoduladores, como las hormonas peptídicas y los esteroides adrenales, entre los que se encuentra la corticosterona (CORT), pueden influenciar la conducta de comunicación (Moore *et al.*, 1994; Rose *et al.*, 1995; Burmeister *et al.*, 2001; Wilczynski *et al.*, 2005).

### **2.3.-Conducta vocal y corticosterona**

Los vertebrados a menudo responden frente a situaciones estresantes mediante la activación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenales (HPA), lo que culmina con la liberación de hormonas glucocorticoideas (predominantemente corticosterona o cortisol, dependiendo de la especie) a la circulación general (Husak y Moore, 2008). Estas hormonas redirigen la fisiología y la conducta del animal hacia la sobrevivencia y sus acciones incluyen la activación de la gluconeogénesis y con ello, la movilización de aminoácidos y grasas desde las reservas celulares (Guyton y Hall, 2001), así como también la supresión de procesos anabólicos y conductas que no son necesarias para la sobrevivencia inmediata, como la síntesis de esteroides gonadales y los despliegues conductuales asociados a la reproducción (Moore y Jessop, 2003; Husak y Moore, 2008). En concordancia, una de las primeras acciones descritas para las “hormonas del estrés” es la supresión de la actividad reproductiva a través de la inhibición del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas (HPG) y la síntesis de esteroides gonadales (Wilczynski *et al.*, 2005). Así, mientras los andrógenos promueven la vocalización por organización y activación de las redes neuronales que subyacen a la actividad vocal, altos niveles de CORT pueden inhibir la producción de andrógenos y por lo tanto, la vocalización (Leary *et al.*, 2008a).

La extensa investigación de Moore y colegas en el anfibio urodela *Taricha granulosa* da soporte a la tesis que la CORT actúa como un potente y rápido inhibidor de la conducta reproductiva durante períodos de estrés agudo (Moore *et al.*, 2005). En machos de esta especie, la conducta de abrazo sexual o amplexo puede ser inhibida rápidamente por CORT o por exposición a situaciones estresantes que estimulen la secreción de CORT. El efecto inhibitorio de esta hormona sobre la conducta de amplexo es fuerte y ocurre rápidamente, a los pocos minutos de una inyección de CORT (Moore y Miller, 1984; Moore y Zoeller, 1985). La administración de corticosterona también suprime rápidamente la actividad de neuronas medulares específicas, asociadas a estimulación táctil durante el amplexo, en *T. granulosa* (Rose *et al.*, 1993; Rose *et al.*, 1995; Rose *et al.*, 1998; Rose y Moore, 1999).

Recientes estudios en anfibios confirman que altos niveles de corticoesteroides suprimen la conducta reproductiva y se correlacionan con bajos niveles de andrógenos (Emerson y Hess, 2001). Por ejemplo, en un estudio realizado en el anuro *Physalaemus pustulosus*, machos que recibieron implantes de CORT disminuyeron significativamente tanto la probabilidad de canto como los niveles circulantes de testosterona (Marler y Ryan, 1996). Burmeister *et al.* (2001), en un estudio realizado en *Hyla cinerea*, encontraron que niveles elevados de CORT tienen un efecto inhibitorio sobre la conducta de canto, potencialmente, vía efectos negativos sobre los niveles circulantes de andrógenos.

En contraste con lo anterior, Leary *et al.* (2004), hallaron que los machos vocalizadores de *Bufo woodhousii* y *Bufo cognatus* tienen niveles circulantes de CORT significativamente más altos que los machos satélites. Sin embargo, los niveles de testosterona y dihidrotestosterona parecen no diferir significativamente entre machos vocalizadores y satélites, no encontrando evidencia que altos niveles de CORT tengan un efecto inhibitorio sobre la producción de andrógenos en estas especies. Paradójicamente, en otro experimento, usando inyecciones de CORT, Leary *et al.* (2006) indican que la elevación en los niveles circulantes de corticosterona incrementan la probabilidad de que machos de *Bufo cognatus* y *Bufo woodhousii* adopten tácticas “satélites” no-vocalizadoras, aunque nuevamente las transiciones conductuales inducidas por corticosterona ocurren rápidamente (menos de una hora) e independientemente de los niveles circulantes de andrógenos, sugiriendo un efecto directo de los glucocorticoides sobre los centros cerebrales que controlan la producción de señales vocales, más que vía efectos sobre los niveles circulantes de andrógenos.

Por otro lado, existe un creciente cuerpo de evidencia científica que indica que en muchos anfibios, reptiles y aves de vida libre, las concentraciones de glucocorticoides están generalmente elevadas durante la estación reproductiva e incluso se elevan más durante los despliegues conductuales reproductivos (Romero, 2002). Por ejemplo, en *Rana catesbeiana*, machos que se encuentran activamente vocalizando tienen niveles de andrógenos y CORT más bajos y más altos, respectivamente, que machos satélites no vocalizadores (Mendonça *et al.*, 1985). De igual manera, en *Scaphiopus couchii*, machos vocalizadores y en amplexo tuvieron niveles de CORT significativamente más altos que machos post etapa reproductiva (Harvey *et al.*, 1997). En *Triturus carnifex*, las concentraciones plasmáticas de CORT muestran un “peak” al inicio de la estación reproductiva, y en los machos sexualmente activos, los niveles plasmáticos de CORT parecen incrementar durante el despliegue de la conducta de cortejo (Zerani y Gobbetti, 1993). Del mismo modo, en *Ambystoma opacum*, los niveles plasmáticos de CORT son altos durante la estación reproductiva, aunque no parecen incrementar más en machos que realizan conducta de cortejo (Houck *et al.*, 1996).

En relación a esto último, diversos estudios sobre los ciclos naturales de corticosterona en peces, anfibios y reptiles indican que las concentraciones plasmáticas de CORT generalmente incrementan durante la estación reproductiva, y que estos períodos no constituyen factores estresantes en el sentido “clásico” (Koolhaas *et al.*, 2011), sino que reflejan períodos de elevadas demandas energéticas en los cuales la secreción de CORT puede ser beneficiosa en varios sentidos (Pancak y Taylor, 1983; Someya *et al.*, 1983; Homan *et al.*, 2003; Ricciardella *et al.*, 2010). Por ejemplo, los elevados niveles plasmáticos de CORT en machos de especies anuras durante la estación reproductiva, pueden ser necesarios para mantener las altas demandas energéticas que requieren para desplazarse a los sitios de reproducción y/o participar activamente en los coros, teniendo en cuenta que durante la estación reproductiva, en muchas especies de anuros los machos no se alimentan durante largos períodos (Harvey *et al.*, 1997). De hecho, la actividad vocal de los anuros es conocida por ser uno de los despliegues conductuales más demandantes de energía dentro de los vertebrados ectotermos (Emerson y Hess, 2001), pudiendo requerir tasas de consumo de energía próximas a los límites fisiológicos. Esta demanda energética se relaciona con la potencia del sonido de las vocalizaciones y la cantidad de tiempo invertida en producirlas (Labra *et al.*, 2008). Cuando se encuentran cantando, los machos anuros experimentan gastos energéticos que pueden llegar a ser hasta 10 – 25 veces más altos que los de individuos en reposo, y algunos estudios han documentado una relación directa y positiva entre las tasas metabólicas y las tasas de canto (Emerson, 2001).

Combinando los gastos energéticos asociados con la actividad vocal y el rol inhibitor de la CORT sobre la producción de andrógenos, Emerson (2001) planteó el “Modelo de Vocalización Hormona Energético” para explicar las transiciones entre conducta vocalizadora y no vocalizadora en anuros (Figura 1). El modelo postula que, a la par con el aumento en los niveles circulantes de andrógenos durante la estación reproductiva, las demandas energéticas asociadas a la conducta de canto elevan los niveles circulantes de CORT (a este nivel CORT y andrógenos estarían positivamente correlacionados), los que finalmente alcanzan un nivel umbral que deprime la producción de andrógenos y con ello cesa la actividad vocal (a este nivel CORT y andrógenos estarían negativamente correlacionados), lo que sería similar a una respuesta al estrés de corto tiempo. La actividad vocal cesa hasta que las reservas energéticas del organismo sean repuestas mediante la ingesta de alimento, entonces la CORT circulante es metabolizada, los niveles de andrógenos se elevan y la actividad vocal se reinicia. Así, se espera que los individuos en mejor condición corporal mantengan mayores tasas de canto y a la vez soporten niveles más elevados de CORT, antes de sufrir una reacción de estrés de corto tiempo. Efectivamente, Emerson y Hess (2001), analizando diversos estudios en anuros, indican que mientras más alta es la tasa de canto entre y dentro de las especies, mayores son los niveles circulantes de CORT.

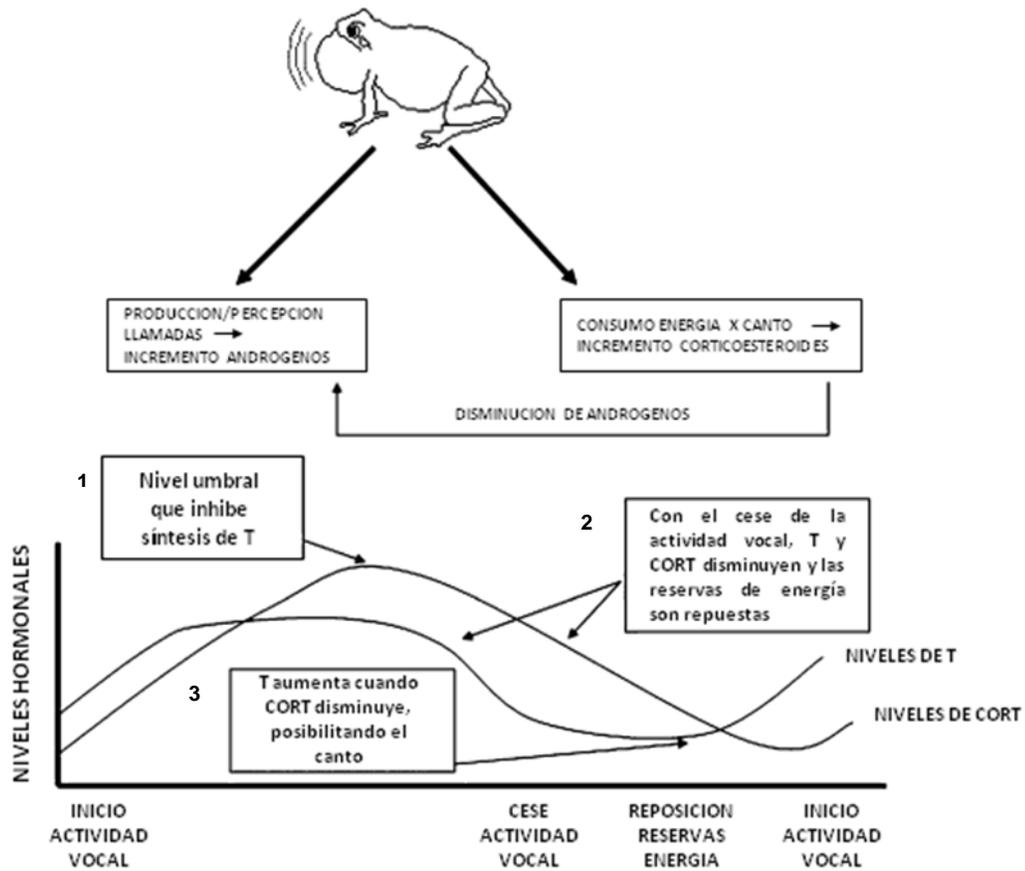


Figura 1: Esquema simplificado del "Modelo de Vocalización Hormona Energético" (Emerson, 2001). Con el inicio de la estación reproductiva, a la par con los niveles circulantes de andrógenos los niveles de CORT también aumentan, debido a los costos asociados con la actividad vocal (En esta etapa del ciclo andrógenos y CORT estarían positivamente correlacionados). A medida que transcurren los días y se mantiene la actividad vocal ambos niveles hormonales siguen aumentando, hasta que la CORT alcanza un nivel umbral que inhibe la síntesis de andrógenos (1). Con esto, La actividad vocal cesa hasta que las reservas energéticas del organismo sean repuestas mediante la ingesta de alimento, entonces la CORT circulante es metabolizada (2), los niveles de andrógenos se elevan (3) y la actividad vocal se reinicia. (Modificado a partir de Wilczynski *et al.*, 2005).

No obstante, Leary *et al.* (2008b) notaron que en *Bufo woodhousii* el esfuerzo de canto no estuvo correlacionado con los niveles circulantes de andrógenos, pero sí estuvo positivamente correlacionado con los niveles circulantes de CORT, apoyando la predicción que elevados esfuerzos de canto promueven la producción de CORT. Sin embargo, a pesar de esta correlación, condiciones corporales “pobres” no estuvieron asociadas a altos niveles de CORT, sugiriendo que otros factores afectan los niveles de CORT más que el estado energético en *Bufo woodhousii* (Leary *et al.*, 2008b). De manera alternativa, se sabe que en algunas especies los machos se alimentan entre los períodos de actividad vocal. Estas especies podrían tener llamadas de advertencias energéticamente menos “costosas” debido a los menores gastos energéticos en los que incurren. Como consecuencia, los machos de estas especies podrían nunca experimentar niveles de corticoesteroides lo suficientemente altos como para gatillar una respuesta al estrés de corto plazo que podría suprimir la actividad reproductiva (Emerson, 2001).

Leary *et al.* (2008a) observaron que altas densidades de machos en los coros estimulan la producción de CORT en *B. woodhousii*, y este efecto aparentemente no está relacionado a un incremento en el esfuerzo de canto o a una disminución de la condición corporal, lo que genera una nueva arista sobre el efecto de la CORT en la conducta reproductiva en anfibios: el ambiente social puede alterar la expresión de tácticas de apareamiento (vocalizadora/no vocalizadora), posiblemente a través de efectos moduladores sobre el sistema endocrino (Schubert *et al.*, 2009). Sin embargo, es extraño que si bien altos niveles de CORT incrementan la probabilidad de que los machos adopten conducta de “satélite”, éstos tienen menores niveles de CORT que los machos que sí vocalizan. Una posible explicación para esto es que el incremento en la proporción de machos satélites incrementa su detección por los machos vocalizadores, creando así las condiciones sociales que activan el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HPA) en los machos vocalizadores (Leary *et al.*, 2008a).

Otras investigaciones señalan que al parecer, para muchos animales la relación entre estrés y reproducción es altamente dependiente del contexto y por lo tanto, algunos individuos pueden exhibir una respuesta inhibitoria mientras que otros no (Moore y Jessop, 2003). Por ejemplo, las respuestas conductuales apropiadas frente a un estresor (estímulos sensitivos que activan el eje hipotálamo-hipófisis-adrenales (HPA)) dependen del contexto – su ambiente circundante y los recientes estados fisiológicos y conductuales – en que se encuentre un animal. Ciertamente, la recepción previa de señales auditivas coespecíficas, así como la participación previa en interacciones sexuales y/o agonistas pueden modificar el estado fisiológico de un individuo y de esta manera, influenciar sus futuras respuestas conductuales (Coddington y Moore, 2003; Schubert *et al.*, 2009).

Si bien el escenario actual de la investigación en torno al efecto de la CORT sobre la conducta de canto en anfibios es bastante confuso, la investigación en este campo puede entregar información extrapolable a otros vertebrados. Estudios en anfibios han demostrado que muchas de las hormonas que modulan la comunicación vocal son las mismas que han sido encontradas en otros taxa de vertebrados, indicando que los mecanismos hormonales que influyen la conducta reproductiva están evolutivamente conservados (Kelley, 2004; Moore *et al.*, 2005; Archs y Narins, 2009). Así, a través del estudio de los mecanismos por los cuales la actividad hormonal dentro del sistema auditivo de ranas conecta el estado fisiológico interno de un individuo con su ambiente social externo, podemos aprender y obtener valiosa información sobre los procesos básicos que subyacen el comportamiento social de los vertebrados en general (Wilczynski y Chu, 2001; Archs y Narins, 2009).

Mediante experimentos de canto evocado (“playback”), en los cuales machos de *Pleurodema thaul* fueron estimulados con intensidades crecientes de una imitación sintética de su llamada de advertencia especie-específica, seguido de la toma de muestras de sangre para la medición de sus niveles plasmáticos CORT, en esta Memoria de Título se intentó establecer el rol que cumple la hormona corticosterona en la percepción de señales acústicas y en la conducta vocal de machos de *P. thaul*, estudiando particularmente el efecto de esta hormona en los umbrales de intensidad de sonido, que evocan respuesta vocal y de contenido agresivo en los machos de esta especie.

## 2.4.-El sujeto experimental

*Pleurodema thaul* es un anfibio anuro de la familia *Leptodactylidae* (*Leiuperidae* según Frost, 2009), de amplia distribución en Chile, habiendo registros de su presencia desde la II hasta la XI región (Formas, 1995), siendo particularmente común en la región mediterránea de Chile central, donde se reproduce desde mediados de invierno hasta finales de primavera (Julio-Diciembre). Durante este período, los machos conforman coros en charcos y pozas aledañas a riachuelos de poca corriente, donde emiten su canto de advertencia desde la superficie del agua, sujetos a la vegetación emergente, con su saco vocal extendido (Penna *et al.*, 2008) (Figura 2). En agregaciones corales estables, los machos se disponen a distancias cercanas a los 3 metros y la intensidad de los cantos de los machos vecinos en la posición de un macho focal es cercana a los 81 dB SPL (“Sound Pressure Level”), lo cual corresponde aproximadamente a 70 dB RMS SPL (“Root Mean Square” o valor cuadrático medio) (Penna y Solís, 1998).

La llamada de advertencia de *P. thaul* corresponde a una de las vocalizaciones de mayor duración entre los anuros (entre 4 a 6 segundos) y consiste en una larga secuencia de pulsos de amplitud modulada (ver figura 5), cada uno cercano a los 4 milisegundos de duración (Penna y Veloso, 1990; Solís, 1994). Esta especie no produce una llamada agresiva diferente a la llamada de advertencia como otras ranas. Sin embargo, cuando los machos se ubican a cortas distancias unos de otros o cuando participan de interacciones agresivas, modifican la estructura temporal de sus cantos y en vez de producir pulsos uniformes, alternan pulsos de disímil duración (Penna y Solís, 1992).

Penna *et al.* (2008) determinaron mediante experimentos de canto evocado que la mínima intensidad de sonido a la cual los machos de *P. thaul* responden a una llamada de advertencia especie-específica (umbral de respuesta vocal evocada) fue en promedio 42,9 dB SPL (rango de 31 – 52 dB SPL). No obstante, se desconoce el umbral de intensidad que evoca una modificación de la respuesta vocal de los machos, asociada a interacciones de tipo agresivo. En adición a lo anterior, el amplio rango de intensidad para el umbral de respuesta vocal evocada registrado en este estudio sugiere que otros factores, entre estos, los niveles circulantes de hormonas esteroideas, podrían eventualmente influenciar la percepción acústica y/o la conducta vocal de machos de *P. thaul*.

Concordantemente, la peculiar duración del canto de advertencia de *P. thaul* y su condición de reproductor prolongado, confieren a este anuro interesantes características para el estudio de diversos factores que pueden afectar su conducta vocal e interacciones sociales (Solís, 1994). Además, el gran espaciamiento entre los machos en las agregaciones corales estables facilita la evaluación de umbrales conductuales en condiciones naturales (Penna *et al.*, 2008).

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Establecer el rol que cumple la hormona corticosterona en la percepción de señales acústicas y en la conducta vocal de machos de *Pleurodema thaul*.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. UMBRAL DE RESPUESTA VOCAL: Determinar la mínima intensidad de sonido a la cual los machos de *P. thaul* responden a su llamada de advertencia especie-específica.
2. UMBRAL DE RESPUESTA VOCAL AGRESIVA: Determinar la mínima intensidad de sonido a la cual los machos de *P. thaul* modifican el patrón temporal de su vocalización en respuesta a una llamada de advertencia especie-específica.
3. NIVELES HORMONALES: Determinar la concentración plasmática de corticosterona en machos de *P. thaul* sometidos a estimulación acústica, con intensidades crecientes de su llamada especie-específica.
4. CONDUCTA VOCAL–NIVEL HORMONAL: Establecer la relación existente entre los valores umbrales de respuesta vocal evocada con los correspondientes niveles plasmáticos de corticosterona en los machos de *Pleurodema thaul*.

### **3.-MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1.-Sitio de Estudio**

El sitio de estudio se encuentra en Chile central, en la VI región del Libertador General Bernardo O'Higgins, en la localidad de Los Maitenes (Lat. 34° 40' S, 71° 27' O) a 450 metros sobre el nivel del mar. Allí se encuentra una población de *P. thaul* distribuida a lo largo de un curso de agua poco profunda y corriente lenta.

Los experimentos se llevaron a cabo durante la primavera del año 2009, entre los meses de octubre y diciembre. Cada sesión experimental se realizó entre las 21:00 y las 03:00 horas, ya que en base a estudios previos, se ha determinado que la actividad de los coros de *P. thaul* es de tipo crepuscular, iniciándose coincidentemente con la disminución de la luminosidad y cesando al alba. Frecuentemente, el número de machos que participa en los coros y su actividad de canto es mayor durante la primera mitad del período de actividad (Solís, 1994).

#### **3.2.-Síntesis de Estímulos Acústicos**

Se generaron imitaciones sintéticas del canto de advertencia de *P. thaul* con el software Adobe Audition 3.0 (Adobe Systems Inc.). Debido a que los parámetros temporales de la llamada de advertencia de *P. thaul* son dependientes de la temperatura del agua (Solís, 1994; Labra *et al.* 2008), los estímulos fueron diseñados a partir de una función de regresión entre los parámetros temporales de las llamadas de 45 individuos de esta especie y la temperatura del agua en la cual fueron obtenidas esas llamadas, registradas en años previos en la región donde se realizó el estudio (Solís, 1994). Se sintetizaron estímulos para 9, 11, 13, 15, 17 y 19 grados Celsius, cuyos parámetros temporales se describen en la tabla 1.

Por otra parte, la frecuencia dominante del canto de advertencia de *P. thaul* no depende de la temperatura del sustrato en que se encuentre el animal (Solís, 1994), por lo que la frecuencia portadora para los estímulos fue de 2100 Hz, que corresponde a la frecuencia dominante promedio para las llamadas de advertencia de machos de *P. thaul* en la región donde fue realizado el estudio (rango 1670 – 2340 Hz) (Penna y Veloso, 1990).

Los estímulos fueron presentados con un intervalo entre llamadas correspondiente al doble de la duración de cada llamada, para así permitir un tiempo suficiente de respuesta para el macho que era estimulado.



Figura 2: Ejemplar macho de *P. thaul* con su saco vocal inflado

Temperatura (°C)	Nº pulsos por canto	Duración de pulso (ms)	Frecuencia de pulso (pulsos/s)
9	25	64	7,3
11	33	60	8,3
13	40	56	9,2
15	47	52	9,8
17	54	48	10,4
19	61	44	11,4

Tabla 1: Parámetros temporales para cada uno de los estímulos sintéticos. Los valores corresponden a los promedios de cada parámetro para la temperatura señalada, determinados previamente en la zona de estudio (Solís, 1994; Penna *et al.*, 2008).

### 3.3.-Sistema Experimental

El sistema experimental así como el protocolo de estimulación de este estudio fueron desarrollados en base a los utilizados por Solís y Penna (1997), los que a su vez han sido utilizados en otros estudios posteriores (Gómez-Lobo, 2002; Penna *et al.*, 2008).

Los estímulos fueron reproducidos en terreno con un reproductor multimedia portátil (I Pod Nano 8G), conectado a un atenuador (Hewlett-Packard 350 D), el que a su vez se conectó a un amplificador de 35 Watt (JBL 3540), finalmente conectado a un parlante de 10 cm de diámetro, por el cual se presentaron dichos estímulos.

Durante los experimentos en el sitio de estudio, el parlante se montó en un trozo de polietileno expandido que se dispuso en la superficie del agua, a una distancia de un metro del sujeto experimental. Las eventuales respuestas vocales generadas por el sujeto experimental fueron captadas con un micrófono direccional (Sennheiser ME 66), posicionado a 20-40 cm del individuo, apuntando en la misma dirección en que fue dispuesto el parlante, con el objetivo de maximizar la amplitud de las respuestas vocales evocadas y minimizar la interferencia de otros sonidos en la grabación.

El micrófono direccional se conectó al canal izquierdo de un grabador de cintas de cassette (Sony TC-D5M), mientras que la salida del reproductor multimedia portátil (I Pod Nano 8G) se conectó al canal derecho del mismo grabador de cintas. Así, tanto el estímulo sintético emitido como las respuestas vocales del sujeto experimental fueron grabados en el canal derecho e izquierdo del grabador de cintas de cassette, respectivamente (Figura 3).

Antes de iniciar cada sesión de experimentación, se realizaron los siguientes procedimientos y ajustes:

1. Con un termómetro digital (Digi-Sense 8528-20), se midió la temperatura del agua en las cercanías del sujeto experimental, para así elegir el estímulo con las características temporales más cercanas a la temperatura registrada.
2. Con la ayuda del Atenuador (Hewlett-Packard 350 D) la intensidad de los estímulos sintéticos emitidos se ajustó hasta alcanzar 70 dB SPL (RMS) a nivel del sujeto experimental, lo que fue medido con un sonómetro (Bruel and Kjaer 2230) ubicado 5-10 cm sobre el sujeto experimental, en posición vertical y apuntando hacia abajo. Este valor de presión de sonido coincide, aproximadamente, con la intensidad promedio de los cantos de los vecinos más cercanos a los cuales los machos de esta especie están expuestos en las agrupaciones reproductivas (promedio 73,3 dB SPL, en rango de 58,0 – 82,0 dB SPL) (Solís, 1994).

3. La actividad vocal de los vecinos del sujeto experimental fue suprimida tocando suavemente con la mano el agua y la vegetación que los circundaba, o bien capturándolos y removiéndolos del sitio de estimulación si fue necesario.

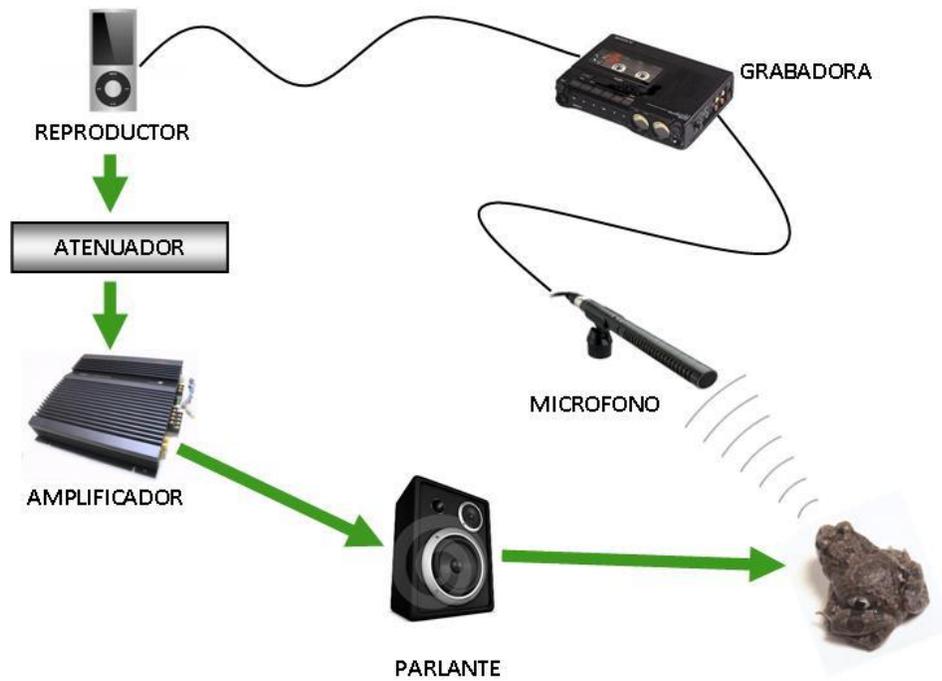


Figura 3: Esquema simplificado del sistema de estimulación y respuesta acústica. El reproductor multimedia se conectó a un atenuador, el que a su vez se conectó a un amplificador, conectado finalmente a un parlante de 10 cm de diámetro, por el cual se presentaron los estímulos. Las eventuales respuestas vocales evocadas por el sujeto experimental fueron captadas con un micrófono direccional, el que se conectó al canal izquierdo de un grabador de cintas de cassette, mientras que la salida del reproductor multimedia portátil se conectó con el canal derecho del mismo grabador de cintas, registrándose tanto el estímulo sintético emitido como las respuestas vocales del sujeto experimental.

### 3.4.-Protocolo de Estimulación

Al inicio de cada sesión experimental, la actividad vocal espontánea de los machos fue registrada durante un período de 90 segundos, luego de lo cual, se presentó una serie de tres repeticiones de estímulos a través del parlante a una intensidad de 70 dB SPL. Esta presentación de estímulos permitió evaluar la capacidad de respuesta de cada sujeto en condiciones experimentales (Penna *et al.*, 2008).

Luego, para determinar el umbral de respuesta vocal evocada, la intensidad del estímulo presentado fue disminuida a 28 dB SPL (nivel subumbral; Penna *et al.*, 2008), incrementando su intensidad en pasos de 3 dB SPL hasta alcanzar la mínima intensidad de sonido que evoca una respuesta en el sujeto experimental (intensidad umbral).

Una vez que se determinó la intensidad umbral, el sujeto experimental siguió siendo estimulado a intensidades crecientes de sonido, en pasos de 3 dB SPL, hasta alcanzar la máxima intensidad que nuestro sistema de estimulación permite (94 – 100 dB SPL) o hasta que el sujeto experimental dejara de responder (Penna *et al.*, 2008). Para comprobar si el cese de las respuestas se debió a un efecto inhibitorio de la alta intensidad de los estímulos finales y no a fatiga del individuo a lo largo del protocolo de estimulación, al final de éste se presentó, a modo de control, una serie de tres estímulos a 70 dB SPL (Figura 4).

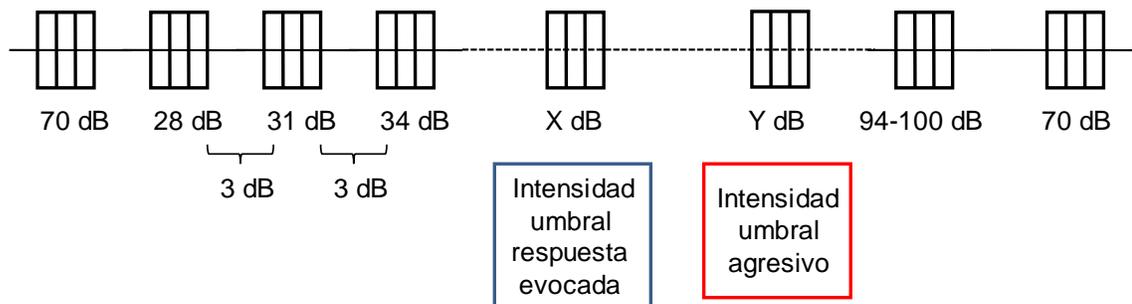


Figura 4: Esquema simplificado del protocolo de estimulación: a cada sujeto experimental se presentaron tres repeticiones de estímulos a través del parlante a una intensidad de 70 dB SPL a modo de control, luego de lo cual la intensidad del estímulo presentado fue disminuida a 28 dB SPL (nivel subumbral; Penna *et. al.*, 2008), incrementando su intensidad en pasos de 3 dB SPL hasta alcanzar la mínima intensidad de sonido que evoca una respuesta en el sujeto experimental (intensidad umbral). Acto seguido el sujeto experimental continuó siendo estimulado a intensidades crecientes de sonido en pasos de 3 dB SPL, hasta alcanzar la máxima intensidad que nuestro sistema de estimulación permite (94 – 100 dB SPL) o hasta que el sujeto experimental deje de responder. En este segundo tramo del protocolo de estimulación se alcanzó la mínima intensidad de sonido que indujo un cambio en los patrones temporales en las respuestas evocadas de cada individuo (umbral de respuesta agresiva), lo cual sólo se determinó posteriormente en el laboratorio. Al final del protocolo se presentó, a modo de control, una serie de tres estímulos a 70 dB SPL.

Una vez determinada la intensidad umbral de respuesta vocal evocada, durante la presentación de los siguientes estímulos a cada sujeto experimental, se alcanzó la mínima intensidad de sonido que indujo un cambio en la estructura temporal de la llamada de advertencia (umbral de respuesta vocal agresiva). Esto se conoció sólo cuando las grabaciones de las respuestas evocadas se digitalizaron y analizaron computacionalmente en el laboratorio.

### **3.5.-Mediciones Corporales y Toma de Muestras**

Inmediatamente finalizada la exposición a los estímulos auditivos, cada sujeto experimental fue capturado con la mano y en no más de 15 minutos, en cada individuo se realizó lo siguiente:

- Medición de la longitud hocico-cloaca con un Pie de Metro (Vernier caliper) con una precisión de +/- 0,1 mm.
- Determinación del peso corporal con una balanza (Acculab 333), con una precisión de +/- 0,1 g.
- Previa inmovilización del sujeto experimental, se tomó una muestra de sangre, mediante punción intracardíaca con una jeringa heparinizada desechable de 1 ml, provista de una aguja de 25G.

Todos los individuos fueron mantenidos cautivos hasta el fin de la estadía en el sitio de estudio, para así evitar la posibilidad de capturar dos veces a un mismo individuo. Al final de la permanencia en terreno todos los sujetos experimentales fueron liberados en su sitio de captura.

Todos los procedimientos experimentales fueron efectuados según el protocolo aprobado por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

### 3.6.-Análisis de las Respuestas Vocales Evocadas

Las grabaciones de los estímulos emitidos y las respuestas evocadas por los sujetos experimentales fueron digitalizadas en un computador Macintosh Power PC 3600, utilizando el software SoundEdit 6.0 (Macromedia Inc.), a una tasa de muestreo de 44000 Hz.

Las respuestas vocales evocadas fueron medidas y analizadas con el software Raven Pro 1.3 (Bioacoustics Research Program, Cornell Lab of Ornithology), determinándose las siguientes variables respuesta (ver Figura 5):

- Duración de la respuesta (seg).
- Número de pulsos por respuesta.
- Duración de pulsos (mseg).
- Número de modulaciones de amplitud por pulso (MA).

Se consideró que un estímulo evocó respuesta si el sujeto experimental emitió un canto durante la presentación del estímulo y/o después de la presentación de éste, pero antes que se iniciara la presentación de un siguiente estímulo (Penna *et al.*, 2008).

Para determinar la duración de pulso y el número de modulaciones de amplitud por pulso, se midieron estas variables en 5 pulsos de la porción media de cada respuesta evocada. Así, para las tres repeticiones sucesivas de un estímulo presentadas a una misma intensidad, se calcularon promedios de las cuatro variables de respuesta vocal evocada.

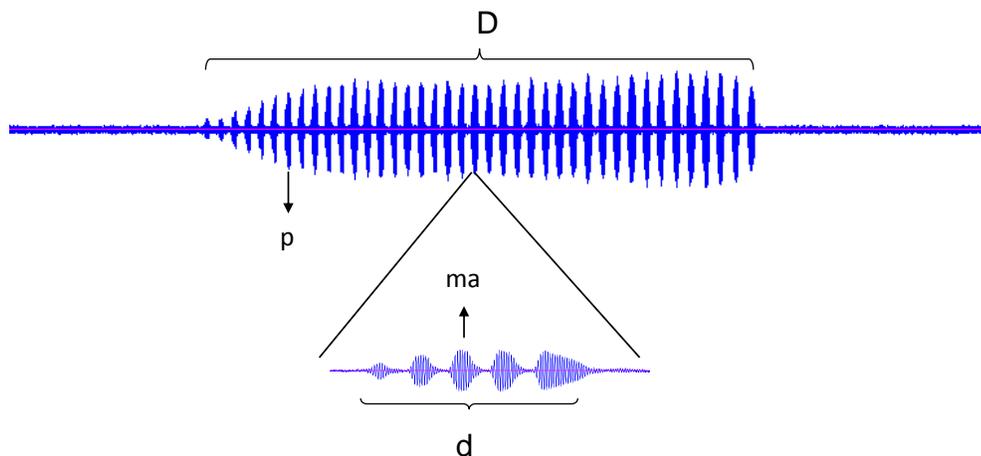


Figura 5: Esquema de las cuatro variables analizadas en cada respuesta vocal evocada: duración de canto (D), número de pulsos (p), duración del pulso (d), y número de modulaciones de amplitud por pulso (ma).

Para determinar el umbral de respuesta evocada se consideró la mínima intensidad que generó, por lo menos, dos respuestas a las tres presentaciones del estímulo. A su vez, para determinar el umbral de respuesta agresiva, se utilizó como criterio definitorio la homogeneización de los pulsos y reducción del número de modulaciones de amplitud de la porción final del canto que se produce a altas intensidades (Penna y Solís, 1992) (Figura 6).

Finalmente, los valores determinados para cada variable respuesta fueron graficados con el software Sigma Plot 6.0 (Systat Software Inc), lo que permitió su inspección visual y así, la determinación del umbral agresivo.

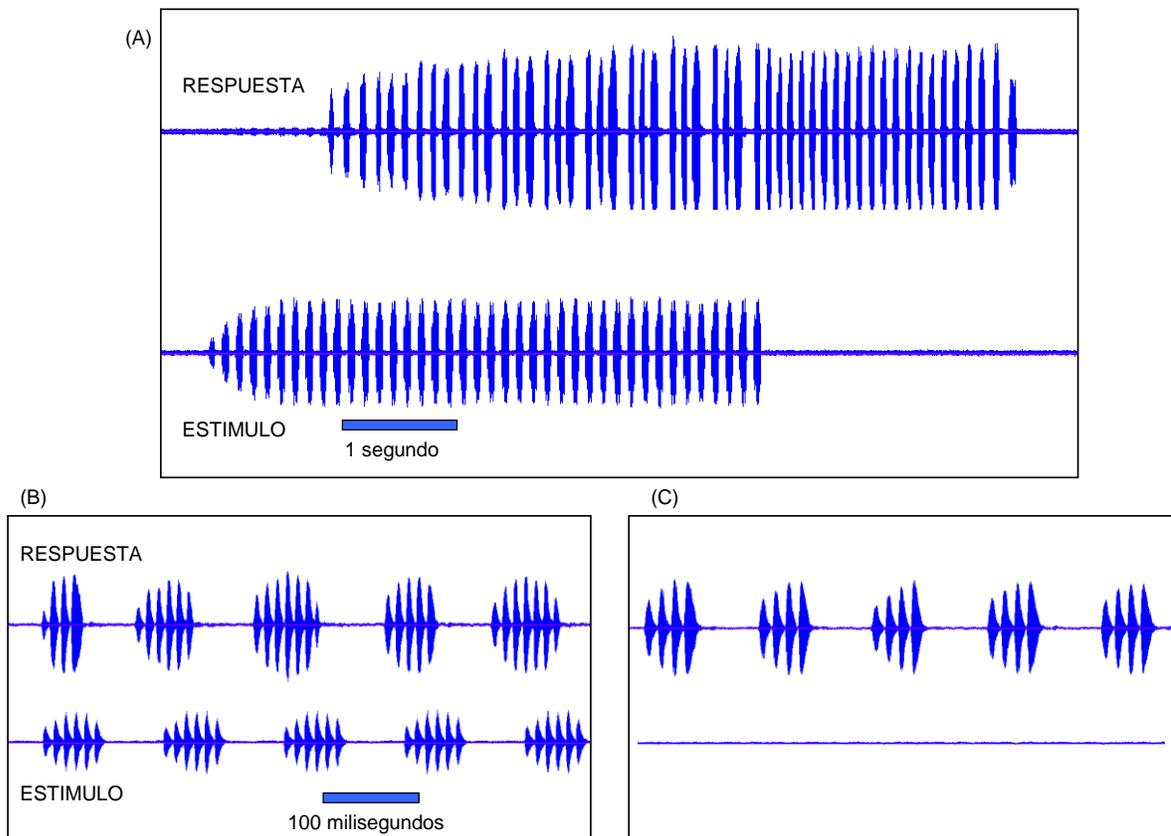


Figura 6: Oscilograma de una respuesta agresiva tras un estímulo presentado a 69 dB SPL (A). En la vista detallada se puede ver que en la porción de la respuesta que no se encuentra traslapada con el estímulo (C) ocurre una homogeneización y una reducción del número de modulaciones de amplitud de cada pulso, en comparación con la porción de la respuesta que sí se encuentra traslapada con el estímulo (B).

### **3.7.-Análisis Hormonal**

Luego de obtenidas las muestras de sangre, cada una fue transferida a un tubo capilar de microhematocrito heparinizado, que fue sellado en uno de sus extremos y sometido a centrifugación inmediata. Las fracciones plasmáticas resultantes fueron mantenidas en hielo seco durante el período de realización del trabajo en terreno.

Posteriormente, en el laboratorio las muestras fueron almacenadas a  $-20^{\circ}$  C hasta su análisis. Los niveles plasmáticos de corticosterona en cada muestra fueron medidos usando un kit de radioinmuno ensayo (RIA), usando una técnica de fase sólida con reactivos disponibles comercialmente (Coat-a-Count, Siemens).

Debido al pequeño volumen total de sangre (20-30  $\mu$ L) obtenido de los sujetos experimentales, las muestras fueron diluidas con el calibrador cero del kit, en orden de obtener los 50  $\mu$ L requeridos por el protocolo. Todas las muestras se analizaron en el mismo ensayo, eliminando así las variaciones entre ensayos.

Para corroborar que la estimulación acústica no produjo cambios hormonales en los sujetos experimentales, se tomaron también muestras de sangre de cinco machos que no fueron sometidos al protocolo de estimulación (machos control;  $n=5$ ). El criterio para elegir un macho como control fue que éste se encontrara vocalizando activamente.

### **3.8.-Análisis Estadístico**

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de correlación no paramétrica (prueba de correlación de Spearman) para determinar la relación entre:

1. Niveles plasmáticos de corticosterona y umbral de respuesta vocal evocada.
2. Niveles plasmáticos de corticosterona y umbral de respuesta vocal agresiva.

La comparación entre la concentración de corticosterona de los sujetos experimentales y los sujetos controles se realizó con la prueba de Mann-Whitney. Para todas las pruebas se consideró un nivel de significancia  $p \leq 0,05$ .

#### 4.-RESULTADOS

Un total de 16 machos de *P. thaul* fueron sometidos al protocolo experimental. En todos los individuos fue posible extraer una muestra de sangre y así determinar los niveles circulantes de CORT al finalizar el protocolo de estimulación. La temperatura del agua registrada a lo largo de todas las noches de experimentación fluctuó entre 13,1°C y 15,4°C, utilizándose los estímulos pertinentes para cada noche de trabajo.

El detalle de los datos registrados para cada individuo se muestra en la tabla 2. La longitud hocico cloaca promedio fue de 33,81 mm (rango 29,00 – 38,00 mm), mientras que el peso promedio fue de 2,80 gramos (rango 2,00 – 3,60 gramos). Además, se estimó la superficie corporal para cada individuo a partir de su peso corporal (Figura 7).

Sujeto Experimental	Peso (g)	Talla (mm)	Temperatura ambiente (°C)	Superficie corporal	Umbral de respuesta (dB)	Umbral agresivo (dB)	[CORT] (ng/ml)
PT08-2	3,40	38,0	15,4	2,26	36,0	64,0	191,15
PT08-3	3,00	35,0	15,4	2,08	36,5	75,0	187,44
PT09-1	2,20	31,0	13,4	1,69	46,0	76,0	22,44
PT09-3	2,80	33,0	14,4	1,98	45,0	63,0	35,87
PT09-9	2,60	33,0	13,4	1,89	37,0	77,0	74,49
PT09-10	2,70	33,0	14,2	1,93	46,0	67,0	27,23
PT09-11	2,40	33,0	15,4	1,79	52,0	73,0	31,35
PT09-12	2,80	35,0	15,3	1,98	44,0	67,0	119,90
PT09-14	2,80	35,0	13,9	1,98	46,0	76,0	93,69
PT09-19	2,50	33,0	13,9	1,84	49,2	71,0	90,18
PT09-20	2,90	34,0	14,7	2,03	43,4	77,0	7,98
PT09-22	2,80	34,0	13,1	1,98	42,0	75,0	50,29
PT09-26	2,00	29,0	14,0	1,58	44,2	74,0	55,68
PT09-28	2,80	32,0	15,0	1,98	46,0	76,0	60,72
PT09-29	3,60	36,0	15,0	2,34	37,2	75,0	190,98
PT09-30	3,50	37,0	15,8	2,30	36,9	62,0	65,30

Tabla 2: Detalle de las variables registradas para cada sujeto experimental.

**Estimación de la Superficie Corporal a Partir del Peso de los Machos**  
**(Canals, 2010<sup>1</sup>).**

$$A = K_1 L^2 \quad A = \text{área}; L = \text{dimensión lineal}$$

$$V = K_2 L^3 \quad V = \text{volumen}$$

$$A^3 = K_1^3 L^6$$

$$V^2 = K_2^2 L^6 \rightarrow L^6 = \frac{V^2}{K_2^2}$$

$$A^3 = K_1^3 \frac{V^2}{K_2^2} = CV^2 \quad \text{donde } C = \frac{K_1^3}{K_2^2}$$

$$A^3 = CV^2 \quad / \sqrt[3]{\quad}$$

$$A = CV^{\frac{2}{3}}$$

Como la densidad de los seres vivos es aproximadamente 1, podemos reemplazar volumen por peso corporal

$$A = CW^{\frac{2}{3}} \quad \text{con } W = \text{peso corporal}$$

Figura 7: Fórmula para la estimación del peso corporal a partir del peso.

## OBJETIVO 1

El valor promedio para la intensidad umbral de respuesta vocal evocada fue de  $42,96 \pm 4,91$  dB SPL RMS (rango 36,00 – 52,00 dB SPL RMS). El umbral de respuesta vocal evocada se correlacionó significativamente y de manera inversa con la superficie corporal de los individuos ( $r_s=-0,607$ ;  $P < 0,05$ ) (Figura 8). No se encontró correlación significativa entre el umbral de respuesta y el peso o la talla de los individuos.

## OBJETIVO 2

El valor promedio para la mínima intensidad de sonido a la cual los sujetos experimentales modificaron el patrón temporal de su vocalización (umbral de respuesta agresiva) fue de  $71,75 \pm 5,32$  dB SPL RMS (rango 62,00 – 77,00 dB SPL RMS). No se encontró correlación significativa entre el umbral agresivo y el peso, la talla y la superficie corporal de los individuos.

Por otra parte, tampoco se observó alguna correlación entre los umbrales de respuestas vocal evocada y los umbrales de respuesta agresiva ( $r_s=0,158$ ;  $P > 0,05$ ).

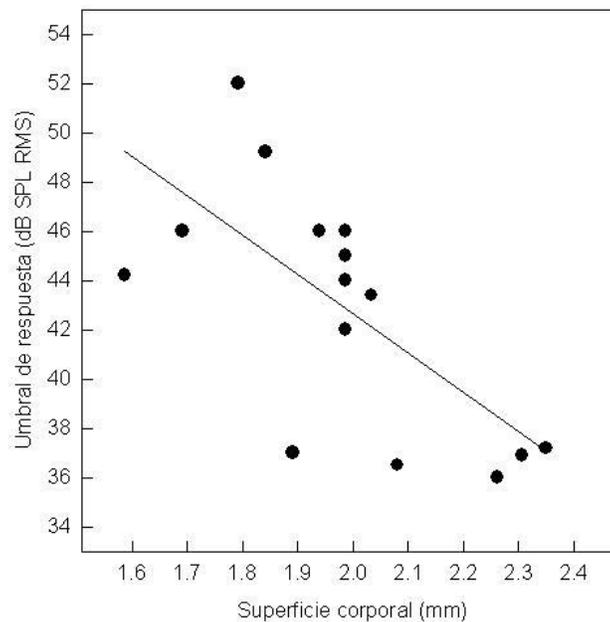


Figura 8: relación entre los valores de intensidad de umbral de respuesta vocal evocada y superficie corporal de los machos.

### OBJETIVO 3

La concentración plasmática promedio de CORT de los machos estimulados fue de  $81,54 \pm 60,96$  ng/ml (rango 7,98 – 191,15 ng/ml). Por su parte, la concentración plasmática promedio de CORT de los sujetos control fue de  $73,18 \pm 47,39$  ng/ml (rango 16,03 – 127,37 ng/ml). La prueba de Mann-Whitney indicó que los valores de CORT de los machos estimulados no son diferentes de los medidos en los machos controles ( $Z=0,16$ ,  $p=0,868$ ).

### OBJETIVO 4

Los umbrales de respuesta vocal evocada estuvieron significativa e inversamente correlacionados con los niveles plasmáticos de CORT ( $r_s=-0,499$ ;  $P < 0,05$ ) (Figura 9). En otras palabras, mientras más altos fueron los niveles circulantes de CORT, más baja fue la intensidad de sonido que evocó respuesta.

No hubo correlación significativa entre los umbrales de respuesta agresiva con los niveles plasmáticos de CORT ( $r_s=-0,158$ ;  $P > 0,05$ ).

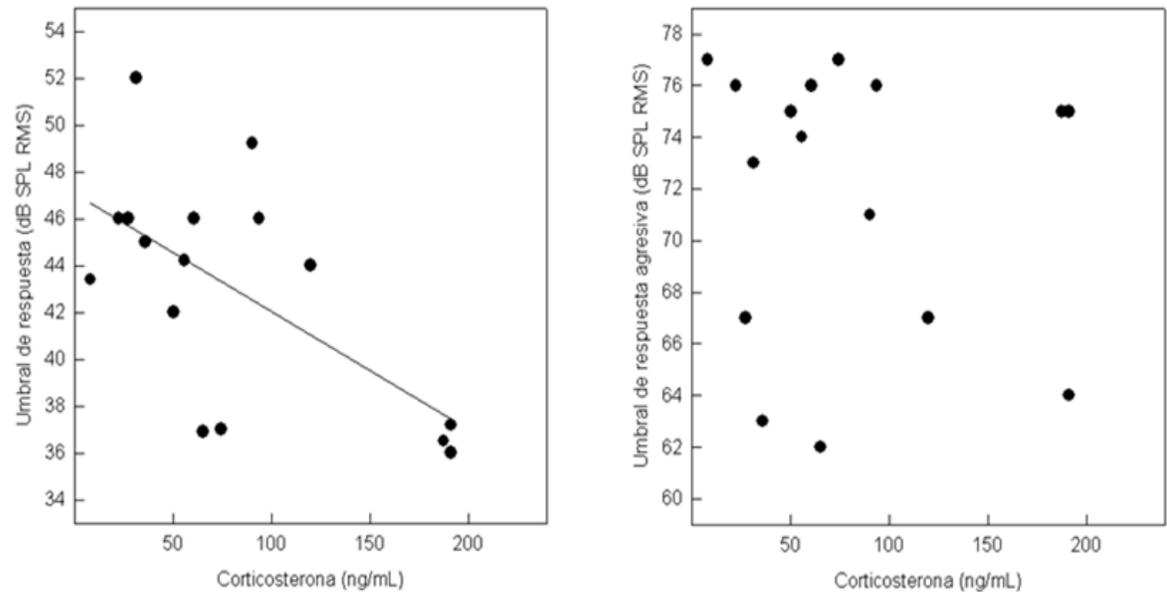


Figura 9: Relaciones entre los valores para umbral de respuesta vocal evocada y agresiva en los machos y sus correspondientes niveles plasmáticos de CORT.

## 5.-DISCUSION

El umbral de respuesta vocal evocada para machos de *P. thaul* registrado en esta memoria de título es muy similar al encontrado por Penna *et al.* (2008) para la misma especie. Incluso, el rango de variación es muy parecido (36,00 – 52,00 dB SPL RMS en el presente trabajo; 31–52 dB SPL RMS en Penna *et al.* (2008), lo cual da validez tanto al sistema experimental como al protocolo de análisis de las respuestas vocales evocadas utilizados en este estudio. Cabe destacar que en ambos trabajos los experimentos fueron desarrollados en fechas similares dentro de cada año.

El umbral de respuesta agresiva observado en este estudio, es decir, la mínima intensidad de sonido a la cual los sujetos experimentales modificaron el patrón temporal de su vocalización, fue de 71,75 dB SPL RMS (rango 62,00 – 77,00 dB SPL RMS). Este dato constituye el primer registro para umbrales agresivos de un anfibio anuro en Chile. Es destacable el hecho que este valor se acerca bastante a la intensidad de sonido a la cual los machos de esta especie perciben los cantos de sus vecinos más próximos en las agregaciones naturales (73,3 dB SPL) (Solís, 1994). Como los machos de *P. thaul* normalmente se disponen a distancias interindividuales cercanas a los 3 m., Penna *et al.* (2008) indican que el umbral de respuesta vocal evocada de su estudio, muy similar al observado en este trabajo, podría alcanzarse a 74 m. de distancia entre el individuo focal y su vecino más cercano, lo que permitiría un amplio rango de comunicación entre los individuos, que así evitarían interacciones agresivas cuyo costo energético es mayor.

La concentración plasmática de CORT de los machos estimulados fue en promedio 81,54 ng/ml. Dicho valor es similar a aquellos encontrados en otras poblaciones de anfibios en condiciones naturales (Giacoma *et al.*, 1994; Ricciardella *et al.*, 2010) y se acercan a los registrados por Schubert *et al.* (2009) en machos de la especie de salamandra *Plethodon shermani* expuestos a extractos de feromona masculina, los que tuvieron niveles circulantes de CORT superiores a los 50 ng/ml en promedio. A pesar que en este último caso se trata de un anfibio urodelo, la homología con los datos del presente estudio puede ser válida, dado que en ambos casos los sujetos experimentales fueron expuestos a señales reproductivas coespecíficas intrasexuales.

Existen diversos estudios en anuros que indican un aumento en las concentraciones basales de CORT como respuesta al estrés asociado a la captura, manipulación, cautiverio, entre otros (Moore *et al.*, 2005; Wilczynski *et al.*, 2005). No obstante, se sabe que dicho aumento ocurre al menos 30 minutos después de la exposición al evento estresante en cuestión (Moore *et al.*, 1994; Rose *et al.*, 1995). En esta investigación, la captura, medición corporal, pesaje y muestreo de sangre de los sujetos experimentales duraron en promedio no más de quince minutos en total. Además, la prueba de Mann-Whitney indicó que los valores de CORT de los machos estimulados

no son diferentes de los medidos en los machos controles, debilitando la posibilidad de que el protocolo de estimulación haya influido en los niveles de CORT registrados. De esta manera y en base a estos antecedentes, es poco probable que los valores observados en este estudio sean efecto de una respuesta al estrés de corto plazo asociada a la estimulación y/o manipulación, sino más bien reflejan concentraciones “basales” de individuos de vida libre de *P. thaul*, expuestos a estímulos sociales en condiciones naturales.

En Chile no se han realizado estudios sobre los patrones anuales de hormonas corticoesteroides en un anfibio. No obstante, existe un creciente cuerpo de evidencia científica que indica que en muchas especies de vida libre, las concentraciones de glucocorticoides están generalmente elevadas durante la estación reproductiva y quizás, el más claro ritmo estacional en la concentración de estas hormonas se ha visto en anfibios. En la revisión hecha por Romero (2002), el 100% de las especies anuras modulan estacionalmente sus concentraciones de glucocorticoides, y el 80% de éstas presentan los mayores valores durante la estación reproductiva. Este podría ser el caso para *P. thaul*, dada la naturaleza de reproductor prolongado de este anuro.

De ser cierto que en *P. thaul* existe un patrón anual de hormonas corticoesteroides, donde los niveles más altos se encuentran en la estación reproductiva, es posible que el “Modelo de Vocalización Hormona Energético” propuesto por Emerson (2001) explique, al menos en parte, los niveles de CORT registrados en este estudio. A medida que avanza la estación reproductiva, la actividad vocal se hace más intensa, lo que se traduce en una mayor demanda energética que es suplida por el uso de las reservas energéticas corporales, proceso mediado por la CORT. Así, sería esperable que en el inicio de la estación reproductiva, con el incremento de la actividad vocal los niveles circulantes de andrógenos también vayan en aumento y, para mantener la esteroidogénesis, los niveles circulantes de CORT también aumenten (en esta etapa andrógenos y CORT estarían positivamente correlacionados). Sin embargo, llega un momento en que las reservas energéticas se agotan, instante en el cual se alcanzan niveles de CORT que inhiben la síntesis de andrógenos y con ello la actividad vocal (en esta etapa andrógenos y CORT estarían inversamente correlacionados) (Figura 1). No obstante, es importante destacar que este modelo parte del supuesto de que los machos que participan activamente de los coros no realizan conducta de forrajeo durante los días de actividad vocal, situación que en *P. thaul* no ha sido completamente dilucidada. Al respecto, Díaz Páez (2003) indica que el 49,4% de los machos de una población de *P. thaul* tuvieron contenido alimentario estomacal durante el período reproductivo, infiriendo que esta proporción de machos mantuvo conducta de forrajeo. Por ende, cabe la posibilidad que los machos de *P. thaul*, o por lo menos una proporción importante dentro de cada población, nunca experimenten niveles de corticoesteroides lo suficientemente altos como

para gatillar una respuesta al estrés de corto plazo que pudiera suprimir la actividad reproductiva, situación clave en el modelo propuesto por Emerson (2001).

En contra del paradigma clásico de un efecto negativo de la CORT sobre la conducta reproductiva y/o aspectos fisiológicos asociados a ésta, los datos del presente estudio indican que en *P. thaul*, altos niveles plasmáticos de CORT podrían de manera indirecta potenciar la conducta reproductiva, a través de una disminución de los umbrales de respuesta vocal evocada. En otras palabras, individuos con niveles plasmáticos más altos de CORT poseen umbrales de respuesta menores, pudiendo detectar a intensidades más bajas los cantos de sus vecinos. Dado que en esta especie los machos “delimitan” y “defienden” su territorio a través de la producción de señales acústicas, al mismo tiempo que su producción está fuertemente influenciada por la intensidad con que son percibidas las señales de sus vecinos, individuos con menores umbrales podrían detectar más prontamente a machos “intrusos”, al mismo tiempo que podrían delimitar de manera más eficiente su territorio. En consecuencia, esta relación inversa entre CORT y umbrales de respuesta podría ser especialmente beneficiosa en el inicio de la estación reproductiva, donde las agregaciones corales son más inestables y los machos deben competir activamente por los sitios de canto. En la región mediterránea de Chile central, *P. thaul* se reproduce desde mediados de invierno hasta finales de primavera (Julio-Diciembre) (Formas, 1995), aunque en la zona donde se realizó el presente estudio se han encontrado machos sexualmente activos inclusive en Enero (Solís, 1994). Además, el año en que se realizaron los experimentos las lluvias iniciales ocurrieron bien avanzado el invierno (agosto). Es probable entonces que el período durante el cual se realizaron los experimentos (octubre-diciembre de 2009) comprenda el inicio y el “peak” de la actividad reproductiva para la población en estudio y los “beneficios” de altos niveles de CORT plasmáticos anteriormente descritos sean plausibles.

Por otra parte, se han descrito diversos factores que pueden afectar la producción y percepción de las vocalizaciones en los anuros, tales como: estación del año, condiciones ambientales y diferencias en atributos físicos entre los individuos. Entre estos últimos pueden mencionarse el tamaño corporal, condición nutricional, salud, edad (Moore y Jessop, 2003) y ciertamente, los niveles circulantes de hormonas como CORT, esteroides gonadales (Solís y Penna, 1997; Gómez-Lobo, 2002), neuropéptidos como la arginina vasotocina, un homólogo de la arginina vasopresina presente en mamíferos (Rose *et al.*, 1995; Burmeister *et al.*, 2001), otras moléculas de acción central como las catecolaminas (Wilczynski y Chu, 2001; Leary, 2009), entre otros. Algunas investigaciones señalan a los niveles circulantes de globulinas de adhesión a esteroides y la cantidad de receptores celulares para glucocorticoides como factores importantes en la regulación de la acción de estas hormonas sobre la conducta vocal (Romero, 2002). Finalmente, recientes investigaciones indican que las respuestas conductuales reguladas por CORT son altamente dependientes del contexto - su ambiente circundante y los recientes estados

fisiológicos y conductuales – en que se encuentre un animal (Coddington y Moore, 2003; Leary *et al.*, 2008a; Schubert *et al.*, 2009). Esta gran variedad de factores podría contribuir a la falta de correlación entre los niveles de CORT y umbrales agresivos observada en el presente estudio.

Sumado a lo anterior, se ha establecido que en anuros la percepción del sonido puede en algunos casos tener un componente extra timpánico, en cuyo caso la conducción de las ondas sonoras a través de la boca, paredes corporales laterales, pulmones y todo el cuerpo, afecta la direccionalidad de las vibraciones de la membrana timpánica y las respuestas del nervio auditivo (Wilczynski *et al.*, 1987), lo que indica que la percepción auditiva pudiera estar relacionada de alguna forma con la superficie corporal de los individuos, como se verificó en este estudio (figura 8).

De las revisiones de Moore *et al.* (2005), Wilczynski *et al.* (2005) y Leary (2009), se desprende que en la creciente evidencia derivada de investigaciones en torno a la regulación hormonal de la conducta vocal en anfibios, la mayoría de las investigaciones se ha centrado en la producción de señales vocales, en desmedro de la percepción de éstas. Algo análogo ha ocurrido en torno a la regulación hormonal de esta conducta, donde se ha privilegiado el estudio de la influencia de los esteroides sexuales, principalmente testosterona, en desmedro de la CORT. En este contexto, los datos de esta memoria de título pueden constituir el primer hallazgo reportado de una influencia de la CORT sobre la percepción auditiva en anuros, a través de una disminución en los umbrales de respuesta vocal evocada. Los mecanismos subyacentes a este efecto son hasta ahora desconocidos. No obstante, se sabe que el oído interno de humanos y de animales experimentales demuestra una abundancia de receptores para glucocorticoides (GRs), tanto en tejidos nerviosos y no nerviosos (Canlon *et al.*, 2007). Además, la sensibilidad del sistema auditivo periférico a glucocorticoides puede depender de varios factores, incluidos la concentración y activación de los GRs, la activación de ciertos factores transcripcionales, la irrigación sanguínea hacia el sistema auditivo, la modulación del balance de fluidos cocleares (Canlon *et al.*, 2007; Al-Mana *et al.*, 2008), entre otros.

Es importante mencionar que el centro primario para la integración central de estímulos auditivos en anfibios, el *torus semicircularis*, homólogo del colículo inferior presente en mamíferos, expresa un amplio rango de receptores hormonales (Al-Mana *et al.*, 2008). Asimismo, el *torus semicircularis* se interconecta a través de aferencias y eferencias neuronales con diversos núcleos y áreas cerebrales como el Sistema Límbico, el Sistema Reticular Activante, el Hipotálamo y, a través de éste último, con el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenales (HPA) (Al-Mana *et al.*, 2008). Es posible entonces que la CORT ejerza un efecto directo sobre estructuras periféricas del sistema auditivo para así modular la sensibilidad auditiva, o bien que ejerza una modulación a nivel del sistema nervioso central en diversos núcleos cerebrales.

El conocimiento en torno al efecto de los glucocorticoides sobre la percepción auditiva en anfibios puede tener implicancias terapéuticas en el ámbito de la medicina veterinaria y humana, donde diversos desórdenes auditivos son tratados en base a corticoesteroides, basándose principalmente en su efecto anti inflamatorio, aún cuando los mecanismos exactos de la acción de dichas hormonas en estos tejidos no están del todo claros (Canlon *et al.*, 2007).

Como se dijo anteriormente, diversos estudios indican que los mecanismos hormonales que influyen la conducta reproductiva están evolutivamente conservados (Kelley, 2004; Moore *et al.*, 2005; Archs y Narins, 2009). Así, a través del estudio de los mecanismos por los cuales la actividad hormonal en el sistema auditivo de ranas conecta el estado fisiológico interno de un individuo con su ambiente social externo, podemos aprender sobre los procesos básicos que subyacen el comportamiento social de los vertebrados (Wilczynski y Chu, 2001; Archs y Narins, 2009).

Finalmente, aunque no se encontraba entre los objetivos de esta Memoria de Título, es importante señalar que los anfibios son el grupo taxonómico que más rápido está desapareciendo en todo el mundo. El 32 % de las 6300 especies de anfibios están amenazadas, en comparación con el 12 % de las aves y el 23 % de los mamíferos. 122 especies de anfibios están extintas desde 1980 y el tamaño de sus poblaciones han disminuido en al menos un 43 % en las últimas décadas. Debido a sus peculiares ciclos de vida, los anfibios son especies extremadamente sensibles a pequeños cambios en el ambiente, lo que los convierte en excelentes especies centinelas (Charrier, 2008). En la medida en que se aumenta el conocimiento y comprensión sobre la biología de estas especies, se puede contar con más y mejores herramientas para su conservación y la de los ambientes en los que habitan.

## CONCLUSIONES

1. En machos del anuro leptodactílido *Plurodema thaul* existe influencia de la hormona esteroidal corticosterona sobre la percepción auditiva, a través de una correlación negativa entre los niveles plasmáticos de esta hormona y los umbrales de respuesta vocal evocada, durante su estación reproductiva, en condiciones naturales.
2. Estos datos sugieren un efecto positivo, aunque indirecto, de la CORT sobre la conducta reproductiva de este anuro, disminuyendo la intensidad de sonido con que son percibidas las llamadas de advertencia de sus vecinos más cercanos.
3. Los mecanismos que subyacen a este efecto son hasta ahora desconocidos. En base a diversos estudios se puede especular que la corticosterona tenga un efecto directo sobre estructuras periféricas del sistema auditivo de anuros para así modular la sensibilidad auditiva de éstos, o bien dichos efectos ocurran a través de una modulación central en diversos núcleos cerebrales.
4. No existe influencia de la corticosterona sobre los umbrales agresivos en machos de *P. thaul*.
5. En machos de *P. thaul* existe una relación inversa entre la superficie corporal y los umbrales auditivos.

## 6.-BIBLIOGRAFÍA

**AL-MANA, D.; CERANIC, B.; DJAHANBAKHCH, O.; LUXON, L.** 2008. Hormones and the Auditory System: A Review of Physiology and Pathophysiology. *Neuroscience*. **153**: 881 – 900.

**ARCH, V.; NARINS, P.** 2009. Sexual hearing: The influence of sex hormones on acoustic communication in frogs. *Hearing Research*. **252 (1-2)**: 15-20.

**BURMEISTER, S.; SOMES, C.; WILCZYNSKI, W.** 2001. Behavioral and hormonal effects of exogenous vasotocin and corticosterone in the green treefrog. *General and Comparative Endocrinology*. **122**: 189 – 197.

**BURMEISTER, S.; WILCZYNSKI, W.** 2000. Social signals influence hormones independently of calling behavior in the treefrog (*Hyla cinerea*). *Hormones and Behavior*. **38**: 201 – 209.

**CANLON, B.; MELTNER, I.; JOHANSSON, P.; TAHERA, Y.** 2007. Glucocorticoid receptors modulate auditory sensitivity to acoustic trauma. *Hearing Research*. **226**: 61-69.

**CHARRIER, A.** 2008. Declinación global de anfibios. El caso de la Rana de Darwin. Simposio Declinación Global de Anfibios. Pontificia Universidad Católica de Chile. 11 y 12 de Septiembre de 2008. Santiago, Chile In: < <http://www.bio.puc.cl/caseb/simposio/Documentos.htm> > [consulta: 30-04-2011].

**CODDINGTON, E.; MOORE, F.** 2003. Neuroendocrinology of context-dependent stress responses: vasotocin alters the effect of corticosterone on amphibian behaviors. *Hormones and Behavior*. **43**: 222 - 228.

**DÍAZ PÁEZ, H.** 2003. Dinámica espacio temporal de una comunidad de anfibios en el centro sur de Chile. Relevancia en las interacciones sociales de *Pleurodema thaul*. Tesis de Doctorado. Concepción, Chile. Universidad de Concepción. 266 pp.

**EMERSON, S.B.** 2001 Male Advertisement Calls: behavioral variation and physiological processes. In: Ryan, M.J. Anuran Communication. Smithsonian Institution Press, Washington D.C., E.E.U.U. pp. 36-44.

**EMERSON, S.; HESS, D.** 2001. Glucocorticoids, androgens, testis mass, and the energetics of vocalization in breeding male frogs. *Hormones and Behavior*. **39**: 59 - 69.

**FORMAS, R.** 1995. Anfibios. **In:** Simonetti, J.; Arroyo, M.; Spotorno, A.; Lozada, E. *Diversidad Biológica de Chile*. EXPLORA CONICYT Editores. Santiago, Chile. pp. 314-325.

**FROST, D.** 2009. Amphibian Species of the World 5.3, an Online Reference. 1998-2009, Darrel Frost and The American Museum of Natural History. **In:** <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>> [consulta: 15-03-2011]

**GERHARDT, H.** 1991. Female choice in treefrogs: Static and dynamic acoustic criteria. *Animal Behavior*. **42**: 615 - 635.

**GIACOMA, C.; HALLIDAY, T.; LODI, L.; LUPO, C.** 1994. Corticosterone and androgen plasma levels in male toads *Bufo bufo* during the reproductive period. *Ethology Ecology and Evolution*. **6**: 545 - 550.

**GÓMEZ-LOBO, D.** 2002. Concentración Plasmática de Testosterona e Intensidad de Sonido, en la Conducta Vocal de *Batrachyla Leptopus*. Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. 55 pp.

**GUYTON, A.; HALL, J.** 2001. Funciones de los glucocorticoides. **In:** Guyton, A.; Hall, J. *Tratado de Fisiología Médica*. Décima Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Querétaro, México. pp. 1052 - 1058.

**HARVEY, L.; PROPPER, C.; WOODLEY, S.** 1997. Reproductive Endocrinology of the Explosively Breeding Desert Spadefoot Toad, *Scaphiopus couchii*. *General and Comparative Endocrinology*. **105**:102-113.

**HOMAN, R.; REED, J.; ROMERO, M.** 2003. Corticosterone concentrations in free-living spotted salamanders (*Ambystoma maculatum*). *General and Comparative Endocrinology*. **130**: 165 – 171.

**HOUCK, L.; MENDONÇA, M.; LYNCH, T.; SCOTT, D.** 1996. Courtship behavior and plasma levels of androgens and corticosterone in male marbled salamanders, *Ambystoma opacum* (Ambystomatidae). *General and Comparative Endocrinology*. **104**: 243 - 252.

**HUSAK, J.; MOORE, I.** 2008. Stress hormones and mate choice. *Trends in Ecology & Evolution*, Vol. 23. **10**: 532 - 534.

**KELLEY, D.** 2004. Vocal communication in frogs. *Current Opinion in Neurobiology*. **14**:751–757.

**KOOLHAAS, J.; BARTOLOMUCCI, A.; BUWALDA, B.; DE BOER, S.; FLÜGGE, G.; KORTE, S.; MEERLO, P.; MURISON, R.; OLIVIER, B.; PALANZA, P.; RICHTER-LEVIN, G.; SGOIFO, A.; STEIMER, T.** 2011. Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. **35**: 1291 – 1301.

**LABRA, A.; VIDAL, M.; SOLIS, R.; PENNA, M.** 2008. Ecofisiología de anfibios y reptiles. **In:** Vidal, M; Labra, A. Herpetología de Chile. Science Verlag Editores. Santiago, Chile. pp. 483 – 516.

**LEARY, CH.; JESSOP, T.; GARCIA, A.; KNAPP, R.** 2004. Steroid hormones profiles and relative body condition of calling and satellite toads: implications for proximate regulation of behavior in anurans. *Behavioral Ecology*, **15**: 313 – 320.

**LEARY, CH.; GARCIA, A.; KNAPP, R.** 2006. Elevated corticosterone levels elicit non-calling mating tactics in male toads independently of changes in circulating androgens. *Hormones and Behavior*, **49**: 425 – 432.

**LEARY, CH.; GARCIA, A.; KNAPP, R.** 2008a. Density-dependent mating tactic expression is linked to stress hormone in Woodhouse's toad. *Behavioral Ecology*, **19**: 1103 - 1110.

**LEARY, CH.; GARCÍA, A., KNAPP, R.; HAWKINS, D.** 2008b. Relationships among steroid hormone levels, vocal effort and body condition in an explosive-breeding toad. *Animal Behaviour*, **76**: 175 – 185.

**LEARY, CH.** 2009. Hormones and acoustic communication in anuran amphibians. *Integrative and Comparative Biology*. **49 (4)**: 452-470.

**MARLER, C.; RYAN, M.** 1996. Energetics constraints and steroid hormone correlates of male calling behaviour in the túngara frog. *Journal of Zoology*. **240**: 397 – 409.

**MENDONÇA, M.; LICHT, P.; RYAN, M. J.; BARNES, R.** 1985. Changes in Hormone Levels in Relation to Breeding Behavior in Male Bullfrogs (*Rana catesbeiana*) at the Individual and Population Levels. *General and Comparative Endocrinology*. **58**: 270-279.

**MOORE, F.; BOYD, S.; KELLEY, D.** 2005. Historical perspective: Hormonal regulation of behaviors in amphibians. *Hormones and Behavior*. **48**: 373–383.

**MOORE, F.; LOWRY, C.; ROSE, J.** 1994. Steroid-neuropeptide interactions that control reproductive behaviors in an amphibian. *Psychoneuroendocrinology*. **19**: 581-592.

- MOORE, I.; JESSOP, T.** 2003. Stress, reproduction and adrenocortical modulation in amphibians and reptiles. *Hormones and Behavior*. **43**: 39 - 47.
- MOORE, F.; MILLER, L.** 1984. Stress-induced inhibition of sexual behavior: corticosterone inhibits courtship behaviors of a male amphibian (*Taricha granulosa*). *Hormones and Behavior*. **18**: 400 - 410.
- MOORE, F.; ZOELLER, R.** 1985. Stress-induced inhibition of reproduction: evidence of suppressed secretion of LHRH in an amphibian. *General and Comparative Endocrinology*. **60**: 252 - 258.
- PANCAK, M.; TAYLOR, D.** 1983. Seasonal and daily plasma corticosterone rhythms in American toads, *Bufo americanus*. *General and Comparative Endocrinology*. **50**: 490-497.
- PENNA, M.; DIAZ-PAEZ, H.** 2008. Comunicación Acústica en Anfibios. **In:** Vidal, M; Labra, A. Herpetología de Chile. Science Verlag Editores. Santiago, Chile. pp. 517-545.
- PENNA, M.; SOLÍS, R.** 1992. Canto Nupcial Evocado en el Sapo de Cuatro Ojos, *Pleurodema thaul*. **In:** Cuarto Congreso Nacional y Primero Iberoamericano de Etología. Cáceres, España. 1992. p. 34.
- PENNA, M.; SOLIS, R.** 1998. Frog call intensities and sound propagation in the South American temperate forest region. *Behavioral Ecology & Sociobiology*. **42**: 371 – 381.
- PENNA, M.; VELÁSQUEZ, N.; SOLÍS, R.** 2008. Correspondence between evoked vocal responses and auditory thresholds in *Pleurodema thaul* (Amphibia; Leptodactylidae). *Journal of Comparative Physiology*. **194**: 361 – 371.
- PENNA, M.; VELOSO, A.** 1990. Vocal Diversity in Frogs of the South American Temperate Forest. *Journal of Herpetology*, **24** (1): 23 – 33.
- RAND, A.** 1988. An overview of anuran acoustic communication. **In:** Fritzsche, B.; Ryan, M.; Wilczynski, W.; Hetherington, T.; Walkowiak, W. The Evolution of The Amphibian Auditory System. John Wiley eds. New York, E.E.U.U. pp. 415 – 431.
- RICCIARDELLA, L.; BLILEY, J.; FETH, C.; WOODLEY, S.** 2010. Acute stressors increase plasma corticosterone and decrease locomotor activity in a terrestrial salamander (*Desmognathus ochrophaeus*). *Physiology & Behavior*. **101**: 81 – 86.

**ROMERO, M.** 2002. Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*. **128**: 1-24.

**ROSE, J.; KINNAIRD, J.; MOORE, F.** 1995. Neurophysiological Effects of Vasotocin and Corticosterone on Medullary Neurons: Implications for Hormonal Control of Amphibian Courtship Behavior. *Neuroendocrinology*. **62**: 406 – 417.

**ROSE, J.; MARRS, G.; MOORE, F.** 1998. Rapid, corticosterone-induced disruption of medullary sensorimotor integration related to suppression of amplexic clasping in behaving roughskin newts (*Taricha granulosa*). *Hormones and Behavior*. **34**: 268 - 282.

**ROSE, J.; MOORE, F.** 1999. A neurobehavioral model for rapid actions of corticosterone on sensorimotor integration. *Steroids*. **64**: 92 - 99.

**ROSE, J.; MOORE, F.; ORCHINIK, M.** 1993. Rapid neurophysiological effects of corticosterone on medullary neurons: relationship to stress-induced suppression of courtship clasping in an amphibian. *Neuroendocrinology*. **57**: 815 - 824.

**SCHUBERT, S.; WACK, C.; HOUCK, L.; FELDHOF, P.; FELDHOF, R.; WOODLEY, S.** 2009. Exposure to pheromones increases plasma corticosterone concentrations in a terrestrial salamander. *General and Comparative Endocrinology*. **161**: 271 – 275.

**SOMEYA, R.; ISHII, S.; URANO, A.** 1983. Analysis of the migratory movement for breeding in the toad, *Bufo japonicus*. *Zoology Magyar*. **92**: 649.

**SOLÍS, R.** 1994. Factores moduladores de las interacciones sociales acústicas del anuro *Pleurodema thaul*. Tesis de Doctorado. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. 76 pp.

**SOLÍS, R.; PENNA, M.** 1997. Testosterone Levels and Evoked Vocal Responses in a Natural Population of the Frog *Batrachyla taeniata*. *Hormones and Behavior*. **31**: 101 – 109.

**TOWNSEND, D.; MOGER, W.** 1987. Plasma androgen levels during male parental care in a tropical frog (*Eleutherodactylus coqui*). *Hormones and Behavior*. **21**: 92-99.

**WELLS, K.** 1977. The social behavior of anuran amphibians. *Animal Behavior*. **25**: 666 - 693.

**WILCZYNSKI, W.; CHU, J.** 2001. Acoustic Communication, Endocrine Control and the Neurochemical Systems of the Brain. In: Ryan, M.J. Anuran Communication. Smithsonian Institution Press, Washington D.C., E.E.U.U. pp. 36-44.

**WILCZYNSKI, W.; LYNCH, K.; O'BRYANT, E.** 2005. Current research in amphibians: Studies integrating endocrinology, behavior, and neurobiology. *Hormones and Behavior*. **48**: 440 – 450.

**WILCZYNSKI, W.; RESLER, C.; CAPRANICA, R.** 1987. Tympanic and extratympanic sound transmission in the leopard frog. *Journal of Comparative Physiology A*. **161**: 659 – 669.

**WILCZYNSKI, W.; RYAN, M.** 1988. The auditory system as a model for neurobiology, behavior and evolution. In: Fritsch, B.; Ryan, M.; Wilczynski, W.; Hetherington, T.; Walkowiak, W. The Evolution of The Amphibian Auditory System. John Wiley eds. New York, E.E.U.U. pp. 3 – 12.

**ZERANI, M.; GOBBETTI, A.** 1993. Corticosterone during the annual reproductive cycle and in sexual behavior in the crested newt, *Triturus carnifex*. *Hormones and Behavior*. **27**: 29 - 37.