



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS



**“INFLUENCIA DE LA TESTOSTERONA EN EL UMBRAL DE
RESPUESTA VOCAL EVOCADA Y AGRESIVA DE MACHOS DEL
ANURO *Pleurodema thaul*”**

MAURICIO ANDRÉS RAMOS OLIVER

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 TESTOSTERONA EN EL UMBRAL DE
RESPUESTA VOCAL EVOCADA Y AGRESIVA DE MACHOS DEL
ANURO *Pleurodema thaul*”**

MAURICIO ANDRÉS RAMOS OLIVER

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

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : RIGOBERTO A. SOLÍS M.
PROFESOR CONSEJERO: BESSY URQUIETA M.
PROFESOR CONSEJERO: VÍCTOR H. PARRAGUEZ C.

SANTIAGO, CHILE
2011

Resumen: Los anuros hacen uso de señales acústicas para comunicarse en sus interacciones sociales. Entre ellas se encuentran el canto o llamada de advertencia, que atrae a las hembras e indica la presencia de quien lo emite a otros machos, y el canto agresivo. Las hormonas esteroidales pueden modificar la producción y el procesamiento sensorial de estas señales en los individuos emisor y receptor, respectivamente. Una forma en que las hormonas podrían actuar, es modulando los umbrales de intensidad a los cuales responden a estas señales los machos conoespecíficos. Para probar esta hipótesis, se expuso en terreno a 18 machos de *Pleurodema thaul* a experimentos de estimulación acústica. Imitaciones sintéticas del canto o llamada de advertencia de esta especie fueron presentadas, a intensidades crecientes, para establecer los umbrales de respuesta vocal evocada y de respuesta agresiva. Finalizada la estimulación, se tomaron muestras de sangre para determinar las concentraciones plasmáticas de testosterona (T) mediante radioinmunoensayo. No se encontró una correlación entre los niveles de T y los umbrales de respuesta vocal evocada y agresiva. Los resultados sugieren que la testosterona no afecta directamente los umbrales de dichas respuestas y que probablemente actúe de manera indirecta, junto a otros factores hormonales como arginina vasotocina, en la modulación de la percepción acústica.

Palabras claves: *Pleurodema thaul*, testosterona, comunicación acústica, umbrales.

Abstract: Anurans use acoustic signals for communication in their social interactions. Among them there are the advertisement call, that attracts females and indicates the presence of the broadcaster to other males, and the aggressive call. Steroid hormones can modify the production and sensory processing of these signals on the broadcasting and recipient individuals respectively. A possibility is that the hormones can be modulating the intensity thresholds of response to these signals. To prove this hypothesis, 18 males of *Pleurodema thaul* were exposed to playback, in field experiments. Synthetic imitations of the species-specific mating call, were presented with increasing intensities in order to establish the evoked vocal and aggressive response thresholds. After the stimulation blood samples were taken to establish the plasma testosterone (T) concentrations by radioimmunoassay. No relationship was found between the T levels and the vocal evoked and aggressive response thresholds. The results suggest that the testosterone is not directly affecting the threshold for these responses and probably is acting indirectly, together with other hormonal factors like arginine vasotocin, in the modulation of acoustic perception.

Keywords: *Pleurodema thaul*, testosterone, acoustic communication, thresholds.

INTRODUCCIÓN

Ocurre comunicación cuando la aparición o las acciones de un animal influyen el comportamiento de otro (Rand, 1988). La comunicación acústica es un rasgo compartido por la mayoría de los vertebrados (Bass, 2007), siendo utilizada por gran parte de los anfibios anuros (ranas y sapos) para mediar el comportamiento sexual y la reproducción. Generalmente, las hembras encuentran y eligen a sus parejas usando las señales acústicas entregadas por los machos (Wells, 1977).

Comunicación acústica en anuros

El repertorio vocal de los anuros es acotado (Wilczynski y Ryan, 1988). Una de las vocalizaciones más estudiadas es la llamada de advertencia producida por los machos para atraer hembras y en algunas especies, para señalar su presencia a los machos competidores (Moore *et al*, 2005). Las llamadas de advertencia son producidas por un macho adulto listo para reproducirse y con frecuencia, son emitidas repetidamente y a coro con otros machos. Dependiendo de si el individuo que se acerca al territorio del macho que está cantando es una hembra o un macho, en ciertas especies, estas señales pueden ser seguidas por la llamada de cortejo, que lleva al amplexo (del latín *amplexus* que significa abrazo y que en biología se utiliza para nombrar el acoplamiento durante la cópula de los anfibios anuros), o por la de agresión, que conduce a un ataque o persecución, respectivamente (Rand, 1988).

El canto agresivo es emitido por un macho cuando interactúa acústicamente con otro competidor, pero a veces se da por un macho defendiendo sus huevos (cuidado

parental) o por hembras defendiendo su sitio de alimentación. En algunas ocasiones, los cantos agresivos usados a corta distancia difieren de aquellos usados durante el contacto mismo o una lucha (Rand, 1988).

Las vocalizaciones emitidas por los anuros tienen patrones especie específicos y por lo tanto, generan respuestas sólo en individuos pertenecientes a la misma especie (Penna y Veloso, 1990).

Los cantos pueden presentar variaciones en sus características sonoras y estas modificaciones son de gran importancia para entender las interacciones acústicas de los anuros. Las características temporales se refieren a la duración y variaciones de amplitud de las señales acústicas en el tiempo y la composición espectral de un sonido está dada por el rango de frecuencias de la señal, la frecuencia dominante, la frecuencia fundamental y las frecuencias armónicas (Bradbury y Veherencamp, 1998).

Hormonas y conducta vocal

Existen dos sistemas hormonales cuya influencia sobre el comportamiento reproductivo de los machos es ampliamente reconocida, incluida la comunicación acústica en anuros. El primero es un sistema neuromodulador compuesto por el hipotálamo y la neurohipófisis y que secreta arginina vasotocina (AVT). El segundo, es un sistema que consiste en una serie de hormonas esteroidales (por ejemplo, testosterona, dihidrotestosterona, estradiol). La regulación de estos esteroides ocurre a través del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal, o eje reproductivo (Arch y Narins 2009).

Las hormonas esteroidales gonadales actúan exacerbando los

comportamientos reproductivos en anfibios adultos. Por ejemplo, en primera instancia, y basado en estudios de comportamiento vocal en anuros, los andrógenos testiculares inducen el desarrollo de cambios en el cartílago y fibras musculares en la laringe. De este modo, masculinizan estructuras periféricas que influyen las propiedades del canto de advertencia de los machos (Moore *et al.*, 2005). También, se ha establecido que una gonadectomía causa que los machos cesen de cantar, mientras que tratamientos con andrógenos pueden revertir este efecto (Wetzel y Kelley, 1983) Por otra parte, las hormonas esteroideas son conocidas por afectar la vocalización de los anuros, actuando sobre el sistema nervioso central a nivel del cerebro y en las vías motoras periféricas (Kelley, 1980; Penna *et al.*, 1992). Además, los peces teleósteos, los anfibios y las aves muestran un patrón común de receptores de andrógenos en el núcleo vocal del tronco encefálico (Bass y Remage-Healey, 2008).

La conducta vocal en machos de anfibios anuros es particularmente apropiada para el estudio del nexo entre los niveles hormonales y el comportamiento reproductivo (Leary *et al.*, 2008). Sin embargo, pocos estudios han explorado la relación entre la actividad vocal y los niveles de hormonas en machos en terreno. Además, estas investigaciones han reportado resultados contradictorios (Solís y Penna, 1997). 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, se ha reportado una significativa correlación positiva entre los niveles de testosterona y el número de

pulsos presentes en el canto de advertencia de *Pleurodema thaul* en agregaciones reproductivas en Chile central (Solís, 1994). Del mismo modo, se determinó una correlación positiva entre la concentración de testosterona y el número de cantos evocados en respuesta a la estimulación en machos de *Batrachyla taeniata* (Solís y Penna, 1997).

Por otra parte, en el anuro *Rana catesbeiana* se ha reportado una relación opuesta, cuyos machos que cantan más activamente, presentan niveles de testosterona más bajos que aquellos que no vocalizan dentro del mismo coro (Mendonça *et al.*, 1985), aunque se señala que el inicio de la actividad vocal y el establecimiento de territorios, se correlaciona positivamente con un incremento en los niveles de testosterona y de 5 α dihidrotestosterona. En el mismo sentido, en un estudio realizado en *Hyla cinerea* se demostró que las señales sociales acústicas son las que incrementan los niveles de andrógenos (Burmeister y Wilczynski, 2000).

Los diversos efectos, mencionados anteriormente, de la testosterona sobre la vocalización en diferentes anuros, indican que la acción de esta hormona tiene un carácter especie-específico (Solís y Penna, 1997). Además, estos estudios confirman la conclusión de que los andrógenos tienen un rol facilitador, mas no determinante, para producir la actividad vocal en los machos (Moore *et al.*, 2005).

En otros vertebrados, como machos de las especies de peces *Porichthys notatus* y *Opsanus beta* existe un paralelo entre altos niveles de andrógenos y el cambio de conducta vocal, desde no estar vocalizando, a la emisión de cantos de advertencia

durante la estación reproductiva. Otros estudios en teleósteos muestran que los esteroides pueden modular rápidamente el comportamiento vocal y las propiedades de respuesta de los potenciales de acción de neuronas que coordinan la producción vocal. Por otra parte, se ha determinado la existencia de sitios de unión en el cerebro para esteroides, en varias especies de aves cantoras (Bass y Remage-Healey, 2008).

Las hormonas reproductivas también contribuyen a la coordinación del comportamiento reproductivo entre el emisor y el receptor, modulando la sensibilidad y el filtro espectral del sistema auditivo. Hay evidencia en numerosas especies de vertebrados, incluidos los humanos, de que la percepción acústica es influenciada por las hormonas circulantes (Arch y Narins, 2009). Por ejemplo, en humanos, se encontró una pequeña, pero significativa variación en la función auditiva durante el ciclo ovárico como consecuencia de la fluctuación de hormonas que afectan áreas superiores de procesamiento auditivo (Al-Mana *et al.*, 2010). En anuros, la recepción de señales acústicas conoespecíficas tiene efecto sobre la liberación de hormonas. Estas hormonas, a su vez, modulan la actividad del sistema auditivo, para influir en el comportamiento sexual durante la estación reproductiva (Arch y Narins, 2009). Una posibilidad para la acción hormonal en la función auditiva es a través de cambios en el umbral de respuesta (Solís y Penna, 1997). Sin embargo, la importancia de ese mecanismo no ha sido explorada.

A nivel neurofisiológico, estudios autorradiográficos e inmunocitoquímicos en *Xenopus laevis* han encontrado que en el *torus semicircularis* (TS) del mesencéfalo de los anuros, un núcleo auditivo que es considerado como

homólogo del colículo inferior de los mamíferos y que representa el centro primario de procesamiento auditivo en el sistema nervioso central, contiene células que contienen tanto andrógenos como estrógenos. No obstante, hasta la fecha, es relativamente poco lo que se conoce acerca del efecto directo de la acción hormonal en el procesamiento de las señales de comunicación en el TS (Kelley, 1980; Arch y Narins, 2009).

Características conductuales de *P. thaul*

El sujeto de estudio de esta memoria es *Pleurodema thaul*, un anuro de la familia Leptodactylidae (Leiuperidae según Frost, 2009) distribuido principalmente en la región mediterránea de Chile central (Penna *et al.*, 2008). Se puede encontrar también en la región del bosque templado, donde es el único representante de la subfamilia Leptodactylinae (Penna y Veloso, 1990). Se reproduce desde la mitad del invierno hasta el final de la primavera (julio-diciembre) (Solís, 1994) y pertenece al grupo de anuros denominados “reproductores prolongados”, o sea los machos forman agregaciones reproductivas por más de un mes, emitiendo cantos desde posiciones estables (Wells, 1977). Los machos de esta especie cantan desde la superficie del agua, en arroyos de lento caudal o pozas, posados en la vegetación, parcialmente sumergida en las orillas del agua, con sus sacos vocales ampliamente distendidos y sus miembros traseros flotando libremente (Figura 1). El canto de advertencia de esta especie consiste en una larga secuencia de pulsos (> 60), compuestos por modulaciones de amplitud y que tiene una duración promedio de 4,5 segundos (rango: 1,9-9,9) (Solís, 1994). Este anuro no produce un canto agresivo distintivo como los machos de otras especies y en las interacciones a



Figura 1. Macho de *P. thaul* con saco vocal inflado

corta distancia, ante la irrupción de un macho extraño, el macho residente modifica la estructura temporal de su canto. En vez de producir pulsos uniformes, alternan pulsos que tienen duraciones disímiles. En las agrupaciones corales estables, los machos están separados por distancias mayores a dos metros y la intensidad de los cantos de sus vecinos en la posición de un macho focal, es aproximadamente de 81 dB SPL (“Sound Pressure Level”) (Penna y Veloso, 1990; Penna *et al.*, 2008).

Un estudio reciente determinó el umbral auditivo de machos de *P. thaul*, es decir, la mínima intensidad de un estímulo sonoro que produce una respuesta vocal (Penna *et al.*, 2008). Este alcanzó un valor promedio de 43 dB SPL RMS (“root mean square” o valor cuadrático medio). Además, se pudo constatar una gran variabilidad en los valores umbrales de los machos (rango 31- 52 dB SPL RMS), que podría ser atribuible a efectos hormonales. Resulta de interés, entonces, estudiar el rol que tiene una hormona reproductiva como la testosterona, con acción en varios núcleos relacionados con la percepción acústica, sobre el umbral de

respuesta vocal evocada y agresiva en machos de *P. thaul*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar del estudio

El estudio se realizó en Chile central, entre los meses de octubre y diciembre, en la localidad de Los Maitenes, (34°40'39”S, 71°26'00”W), una zona de secano costero (VI región del Libertador Bernardo O’Higgins). En ese lugar existe una población de *P. thaul* que se distribuye en el curso de un pequeño estero de aguas poco profundas, donde los machos forman sus agrupaciones corales.

Síntesis de estímulos acústicos

Se generaron imitaciones sintéticas del canto de advertencia de *P. thaul* con el programa Adobe Audition 3.0 (Adobe Systems Inc.). Debido a que la estructura temporal de esta vocalización es dependiente de la temperatura del agua, los estímulos se diseñaron de acuerdo a las funciones de regresión de los parámetros temporales del canto (duración, número de pulsos, frecuencia de pulsos, etc.) con la

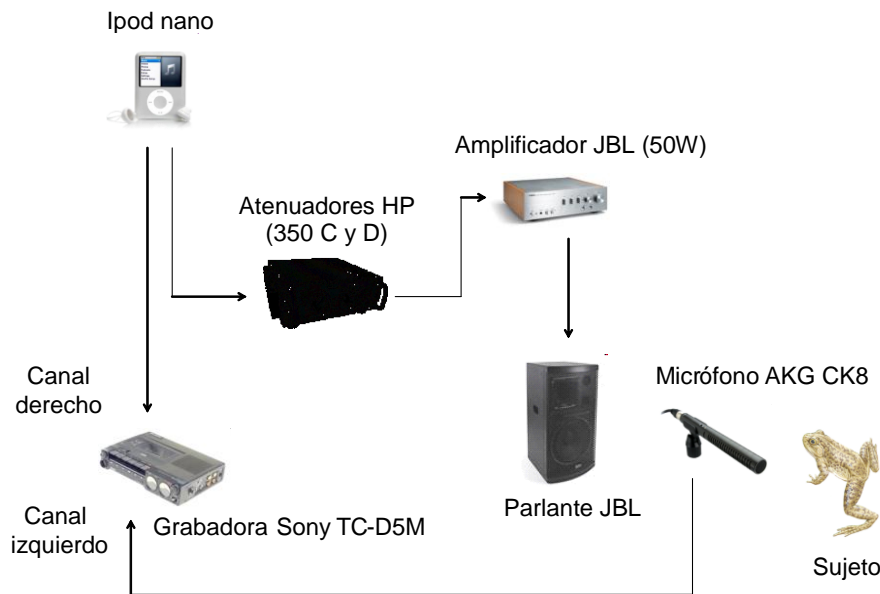


Figura 2: Esquema de la disposición del sistema de estimulación acústica.

temperatura del agua (Solís, 1994). Se sintetizaron estímulos para 9, 11, 13, 15, 17 y 19°C con los siguientes parámetros temporales: 25, 33, 40, 47, 54 y 61 pulsos por canto; duración del pulso: 64, 60, 56, 52, 48 y 44 ms y frecuencia de pulso de 7,3; 8,3; 9,2; 9,8; 10,4 y 11,4 pulsos/s, respectivamente. Estos valores corresponden a los promedios de estos parámetros a las temperaturas antes señaladas, determinados previamente en la zona de estudio (Solís, 1994; Penna *et al.*, 2008). Los estímulos fueron presentados con un intervalo entre presentaciones del doble de la duración del canto, de tal manera de permitir un tiempo suficiente para la respuesta del macho que estaba siendo estimulado. La frecuencia portadora de todos los estímulos fue de 2100 Hz, que es la frecuencia dominante promedio del canto de advertencias de *P. thaul* en la región donde se realizó el estudio (Solís, 1994).

Sistema experimental

El estímulo fue emitido por un reproductor portátil de música (iPod Nano G8) conectado a un adaptador de impedancia, dos atenuadores (Hewlett-

Packard 355 C y D), un amplificador (JBL) y un parlante de 10 cm de diámetro (JBL). La salida del reproductor se conectó al canal derecho de un grabador de cassette (Sony TC-D5M) para grabar el estímulo. La respuesta vocal del sujeto experimental fue grabada en el canal izquierdo de esta misma grabadora (Figura 2).

Durante los experimentos en el lugar de estudio, el parlante se montó sobre una base de madera dispuesta sobre una cámara de goma, en la superficie del agua, cerca de la orilla, a aproximadamente 1 m del sujeto experimental. Las respuestas vocales fueron grabadas con un micrófono direccional (AKG CK8) posicionado a 20-40 cm del individuo, apuntando en la misma dirección en que fue dispuesto el parlante y delante de él, con el objetivo de minimizar la interferencia de estímulos emitidos, en la grabación. El micrófono se conectó al canal izquierdo del grabador Sony TC-D5M. Los experimentos fueron realizados entre las 21:00 y 04:00 horas.

La intensidad de los estímulos se ajustó con los atenuadores, para



Figura 3: Llevando a cabo calibración con el micrófono de un sonómetro

alcanzar 70 dB SPL RMS, en la posición del sujeto experimental, antes de comenzar la sesión de estimulación. Este valor de intensidad 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 (Penna y Solís, 1998). El ajuste de la intensidad en la posición del individuo experimental se llevó a cabo posicionando el micrófono de un sonómetro (Extech 407780, Extech Instruments), mediante un cable de extensión, a 5-10 cm sobre el sujeto experimental, en posición vertical, apuntando hacia abajo (Figura 3). Antes de iniciar la estimulación se midió la temperatura del agua cercana al sujeto experimental con un termómetro digital (Digi-Sense 8528-20, Thermo Fisher Scientific Inc.) y se eligió el estímulo con las características temporales de la llamada más cercana a la temperatura registrada para la subsecuente emisión. Después de estos ajustes iniciales, todo vecino que estuviera emitiendo cantos fue silenciado moviendo suavemente la vegetación y/o el agua con una ramita o, si fuese necesario, capturándolo. Este procedimiento impide la posibilidad de registrar respuestas evocadas por

otras fuentes de estimulación distintas a la experimental.

Protocolo de estimulación

Se expuso a los experimentos de estimulación acústica a un total de veintidós machos, a los cuales se les presentó tres repeticiones del estímulo a 70 dB SPL. Por antecedentes bibliográficos, este valor de intensidad debiera evocar una respuesta (Solís y Penna, 1997) y se utilizó a modo de control. A continuación, para determinar el umbral de la respuesta vocal evocada, la intensidad de la presentación del estímulo fue reducida a nivel subumbral de 28 dB SPL (Penna *et al.*, 2008) y, posteriormente, a partir de este valor, se presentó el estímulo incrementando su intensidad en pasos de 3 dB, hasta que el macho respondiera a la estimulación. Una vez establecida la mínima intensidad que evocó respuesta (intensidad umbral), los machos siguieron siendo estimulados hasta alcanzar 94-100 dB SPL, máxima intensidad que permite nuestro sistema de estimulación (Penna *et al.*, 2008) o hasta que los sujetos dejaron de responder. Según Penna y Solís (1992) el umbral de respuesta agresiva de los machos debiera estar entre el valor

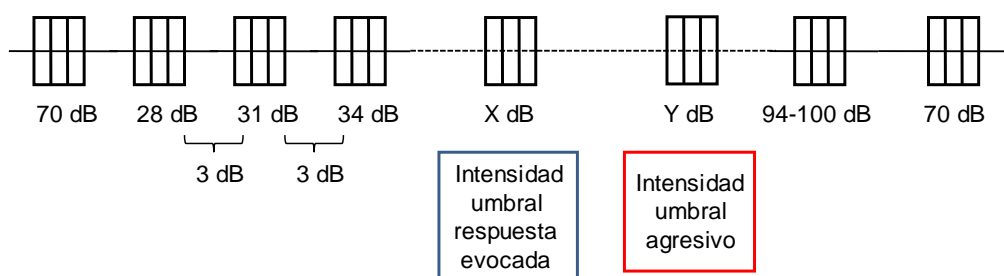


Figura 4. Protocolo de presentación de los estímulos acústicos. Cada rectángulo dividido en tres, representa las tres repeticiones a cada una de las intensidades de estimulación, con incrementos de 3 dB.

umbral de respuesta vocal evocada y uno menor a 90 dB. Sin embargo, la determinación de este valor sólo se pudo realizar con posterioridad, al analizar las respuestas acústicas, ya que la modificación de los parámetros temporales del canto asociados a la respuesta agresiva en *P. thaul* no es discernible con la simple audición. Para verificar si el cese de las respuestas se debió a un efecto inhibitorio de la alta intensidad de estimulación y no a fatiga del individuo durante la presentación del protocolo de estimulación, a modo de control se presentó nuevamente el estímulo a 70 dB SPL. Tres repeticiones sucesivas del estímulo fueron emitidas a cada nivel de intensidad (Figura 4).

Los sujetos experimentales fueron capturados de forma manual inmediatamente terminada la presentación del protocolo de estimulación. Se midió la longitud hocico-cloaca con un pie de metro ($\pm 0,1$ mm). El peso corporal se midió con una balanza Acculab 333 ($\pm 0,1$ gr) (Sartorius Mechatronics).

Análisis de las respuestas

Las grabaciones de las vocalizaciones de los sapos y los estímulos fueron digitalizados con un computador Macintosh PowerPC 3600 a una tasa de muestreo de 44000 Hz usando el programa SoundEdit 6.0

(Macromedia Inc.), en formato aiff. Cuatro variables del canto se utilizaron para evaluar la respuesta vocal de un sapo: duración del canto, número de pulsos por canto, duración de los pulsos y número de modulaciones de amplitud por pulso (Figura 5). Las últimas dos medidas fueron cuantificadas en cinco pulsos tomados en la porción media del canto. Se consideró que un estímulo evocaba respuesta si el sujeto emitió un canto durante la presentación del estímulo y/o durante el intervalo precedente al comienzo de la siguiente repetición del estímulo (Penna *et al.*, 2008). Se calcularon promedios de las cuatro medidas de respuesta vocal evocada para las tres repeticiones sucesivas del estímulo presentadas a la misma intensidad. 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. Por otra parte, 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).

La medición de las variables se realizó con el programa Raven Pro 1.3 (Bioacoustics Research Program, Cornell Lab of Ornithology) y posteriormente, los valores

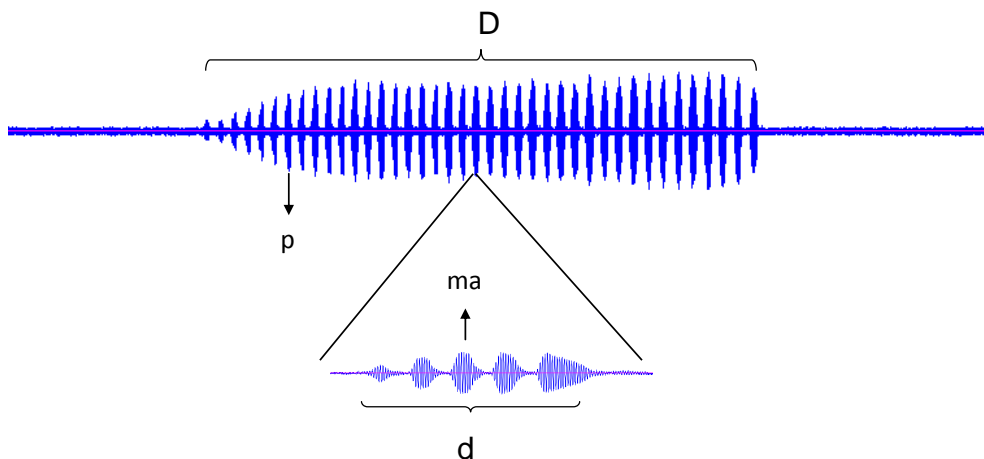


Figura 5. Esquema de las cuatro variables tomadas para evaluar cada respuesta: (1) la duración del canto (D), (2) el número de pulsos (p) de cada canto, (3) la duración de los pulsos (d) y (4) el número de modulaciones de amplitud (ma) de cada pulso evaluado.

determinados para cada una de ellas fueron graficados con el software Sigma Plot 6.0 (Systat Software Inc) para su inspección visual. Este procedimiento permitió la determinación del umbral agresivo.

Análisis hormonal

Inmediatamente finalizada la sesión de presentación del protocolo de estimulación para cada individuo experimental, este fue capturado y se le tomó una muestra de sangre mediante punción intracardíaca, con una jeringa desechable de 1 ml heparinizada (25G), con el objeto de medir la concentración plasmática de testosterona. Las muestras fueron transferidas a tubos capilares heparinizados y a continuación centrifugados. La fracción plasmática se almacenó refrigerada (-10° C) durante la permanencia en terreno, para posteriormente ser guardadas a -20° C en el laboratorio, hasta que se realizó su análisis por radioinmunoensayo (RIA). Los machos se mantuvieron cautivos hasta el final de la permanencia en terreno (para evitar muestrearlos dos veces) y posteriormente fueron liberados en sus sitios de captura.

Las concentraciones de testosterona plasmática se midieron usando un sistema de RIA de fase sólida (Coat-a-Count Total Testosterone, Siemens), que ha sido previamente utilizado en ésta y otras especies (Solís, 1994; Solís y Penna, 1997). Este radioinmunoensayo está diseñado para cuantificar testosterona en plasma humano sin extracción, siendo altamente específico para este andrógeno (se ha informado una reactividad cruzada con dihidrotestosterona < 5%) y detecta concentraciones en un rango de 0,04-16,0 ng/ml.

Debido al pequeño volumen total de sangre (20-30 µL) obtenido de los machos, las muestras fueron diluidas con el calibrador cero, en orden de obtener los 50 µL de muestra 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, se tomaron muestras de sangre de siete machos que no fueron sometidos al

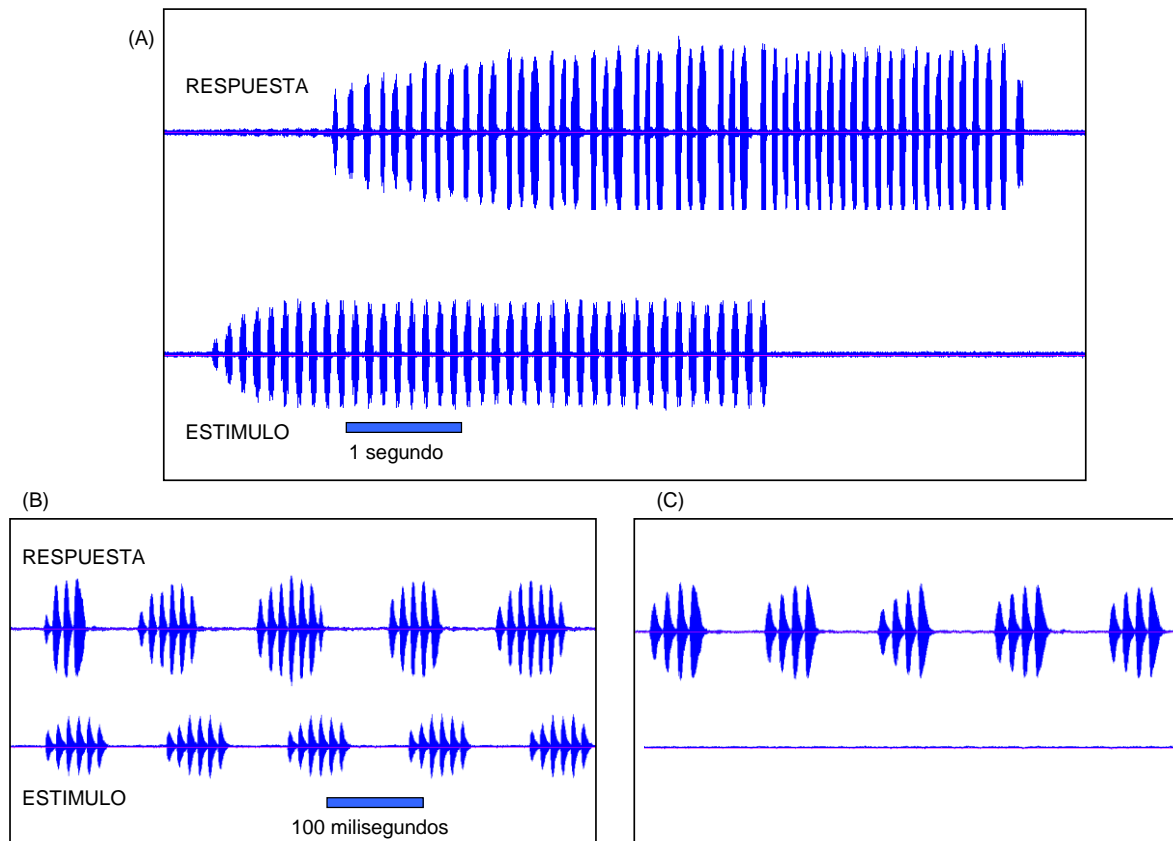


Figura 6. Oscilograma de una respuesta agresiva tras un estímulo a 69 dB SPL (A). En la vista detallada se puede ver que en la porción de la respuesta que no se encuentra traslapada con el estímulo (C) ocurre una homogenización y una reducción del número de modulaciones de amplitud de cada pulso, en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

protocolo de estimulación (machos control; n=7). El criterio para elegir un sapo como control fue que se encontrara vocalizando.

Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó con estadística no paramétrica. En particular, se llevaron a cabo análisis de correlación (Spearman) entre las concentraciones hormonales y las intensidades umbrales.

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

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.

RESULTADOS

Se sometió al protocolo de estimulación a veintidós machos, dos de los cuales fueron eliminados por bajo hematocrito de sus muestras de sangre y otros dos, por presentar umbrales auditivos no bien definidos y muy por sobre el rango encontrado por Penna *et al.* (2008) (rango 31-52 dB RMS SPL). De esta forma, se consideraron dieciocho animales para el análisis de umbral de respuesta vocal evocada y de respuesta agresiva. El promedio de talla y peso de los individuos fue 33,83

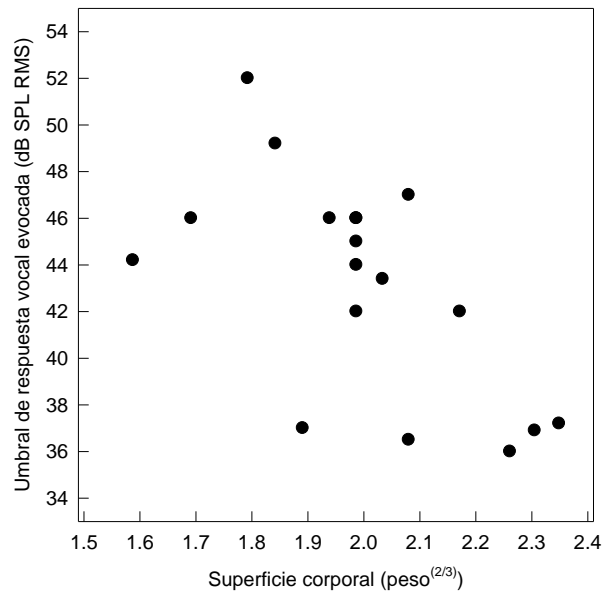


Figura 7. Relación entre los valores de intensidad umbral de respuesta vocal evocada y superficie corporal (cm^2). La correlación entre estas variables se dio de manera inversa

$\pm 2,06$ mm (29,00-38,00) y $2,83 \pm 0,40$ g (2,00-3,60), respectivamente. La concentración plasmática promedio de testosterona de los machos estimulados fue de $30,15 \pm 11,01$ ng/mL (14,23-49,67) y la de los machos controles fue de $28,99 \pm 7,08$ ng/mL (13,63-36,56). La prueba de Mann-Whitney reveló que los valores de testosterona de los machos estimulados no son diferentes de los medidos en los machos controles ($Z=0,544$, $p=0,585$). Durante los experimentos en terreno, la temperatura del agua fluctuó entre 13 y 15,4 °C, razón por la cual se utilizaron los estímulos sintéticos con las variables temporales correspondientes a 13 y 15 °C, según el caso. El valor promedio para la intensidad umbral de respuesta evocada fue de $43,13 \pm 4,58$ dB (36,00-52,00) y para la agresiva de $72,39 \pm 5,25$ dB (62,00-80,00). Además, estos valores no presentaron dependencia de los atributos físicos del macho como la talla ($r_s=-0,298$; $P>0,05$), peso ($r_s=0,073$; $P>0,05$) y condición nutricional ($r_s=-0,157$; $P>0,05$) (Green, 2001). Sin

embargo, el umbral de respuesta vocal evocada se correlacionó significativamente y de manera inversa con la superficie corporal de los individuos ($r_s=-0,607$; $P\leq 0,05$) (Figura 7), estimada a partir del peso corporal (ver anexo 1).

Finalmente, no se encontró una relación estadísticamente significativa de los niveles de testosterona plasmáticos con los valores de los umbrales de respuesta evocada ($r_s = 0,033$; $P>0,05$) y los umbrales agresivos ($r_s= 0,086$; $P>0,05$) (Figura 8).

DISCUSIÓN

En anuros, se ha propuesto que la actividad vocal de los machos es influenciada por los niveles circulantes de hormonas sexuales (Wilczynski *et al.*, 2005; Arch y Narins, 2009). De hecho se han descrito receptores para testosterona en áreas del cerebro involucrados en el procesamiento vocal

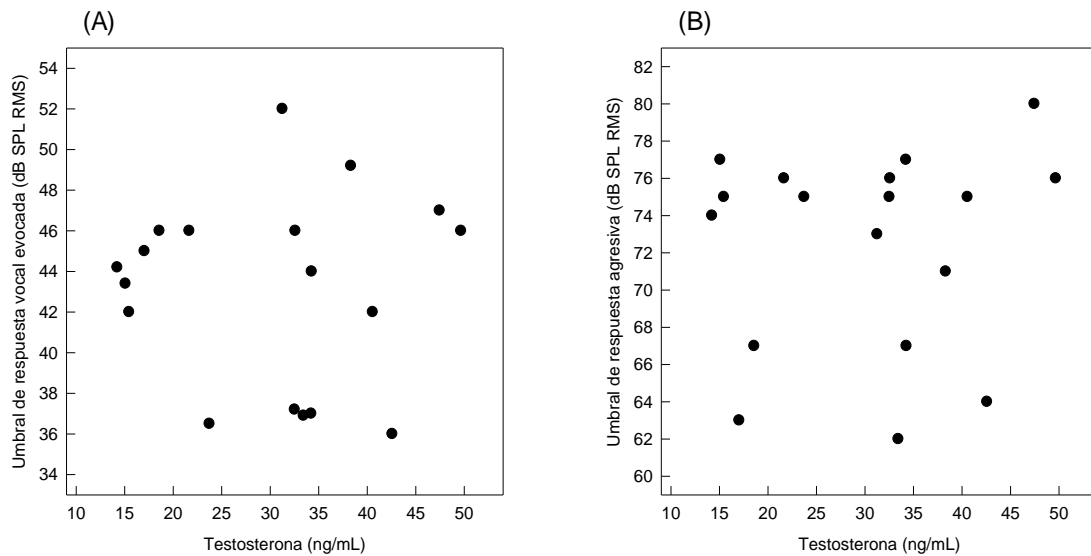


Figura 8. Relación entre los valores de intensidad umbral que evocaron una respuesta vocal evocada (A) y agresiva (B) en los machos y sus correspondientes niveles plasmáticos de testosterona.

y también auditivo (*torus semicircularis*) (Kelley, 1980; Penna *et al.*, 1992). Estos antecedentes, entre otros, permiten suponer la participación de esta hormona, no sólo en la producción vocal de los machos, sino también en la percepción de señales acústicas. Sin embargo, los resultados muestran la ausencia de una relación directa y significativa de la hormona con la intensidad a la que un individuo es capaz de captar las señales sonoras que emite un conoespecífico. La percepción de estas señales cobra importancia, ya que regula el espaciamiento entre machos en las agregaciones reproductivas de *P. thaul* y permite la defensa de territorios mediante la emisión de cantos agresivos. No obstante, estos resultados son concordantes con otros reportados durante la redacción de esta memoria, obtenidos mediante registros neurofisiológicos en neuronas del *torus semisircularis* de machos de la rana *Hyla cinerea*. En esa investigación se estableció la ausencia de influencia de la

testosterona en los umbrales auditivos, determinados a partir de los audiogramas de esta especie (Miranda y Wilczynski, 2009). A la luz de estos resultados, es posible suponer que otros factores, distintos a los aquí investigados, estarían modulando las interacciones acústicas en los machos de *P. thaul*. En esta línea, se ha encontrado la participación de otras hormonas en diversas conductas reproductivas de anfibios (anuros y urodelos). Por ejemplo, se ha reportado que la administración del neuropéptido arginina vasotocina (AVT) facilita el despliegue del canto de advertencia en *R. catesbeina*, *H. cinerea*, *Hyla versicolor*, *Acris crepitans* y *Bufo cognatus*. (Penna *et al.*, 1992; Boyd, 1994; Marler *et al.*, 1995; Propper y Dixon, 1997; Chu *et al.*, 1998; Tito *et al.*, 1999). También se ha visto que en *H. versicolor* la administración de AVT aumenta los cantos agresivos (Tito *et al.*, 1999), pero sólo se ha descrito la distribución de sus receptores en el

cerebro para *R. catesbeiana* (Boyd, 1994).

Por otra parte, algunos experimentos han revelado que bloqueando la secreción de prolactina (Giorgio *et al.*, 1982) o impidiendo su actividad (Toyoda *et al.*, 1996) se puede suprimir los comportamientos de cortejo en tritones sexualmente activos. Estos descubrimientos, en conjunto con experimentos de castración/tratamiento con andrógenos, han mostrado que la castración elimina el comportamiento de amplexo y que los implantes de testosterona restablecen esta conducta (Moore 1978; Deviche y Moore, 1988). Sin embargo, fuera de la temporada reproductiva, la administración del andrógeno no estimula el amplexo (Deviche y Moore, 1988). Estos resultados respaldarían la idea de que los andrógenos son necesarios, empero no determinantes para activar las conductas reproductivas en machos anfibios.

Además de lo comentado anteriormente, se debe considerar la posibilidad de que factores no hormonales también estén afectando la sensibilidad a las señales sonoras. En este sentido, se ha establecido que en anuros la conducción del sonido 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 de los individuos, la cual en este estudio se vio significativamente correlacionada con los umbrales de respuesta evocada.

En función de los resultados de este estudio y los demás reseñados en este escrito, se hace patente la necesidad de mayor investigación en

terreno, que nos entregue evidencias de la acción de las hormonas en su conjunto, sobre las conductas reproductivas y la percepción acústica en los anuros y los vertebrados en general.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mi familia (Mauricio, Ana María, Sebastián, Nicolás, Valentina e Isabel) por su incondicional amor, apoyo y paciencia durante todos estos años. A mi amada Camila, por su ayuda, apoyo y principalmente su amor. Al doctor Rigoberto Solís, amigo y profesor guía en todo el sentido de la palabra. A Cristián Olivares amigo y compañero de batalla en la realización de este estudio. A mis amigos (Sebastián, Jorge, Francisco, Felipe, Rafael, Cristián, Marcelo, Sergio, Miguel, Felipe y Andrés) por sus inagotables consejos y el cariño de siempre. A Bernardita Julio por su ayuda. A don Carlos Viedma por su asistencia en terreno. Parte de los recursos utilizados para la elaboración de esta memoria fueron provistos por FIV 12101401.9102.005.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-MANA, D.; CERANIC, B.; DJAHANBAKHCH, O.; LUXON, L.M. 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. *Hear. Res.* 252:15-20.

BASS, A.H. 2007. Steroid-dependent plasticity of vocal motor systems: Novel insights from teleost fish. *Brain. Res. Rev.* 57:299-308.

- BASS, A.H.; REMEAGE-HEALEY, L.** 2008. Central pattern generator for social vocalizations: Androgen-dependent neurophysiological mechanisms. *Horm. Behav.* 59:659-672.
- BOYD, S.K.,** 1994. Arginine vasotocin facilitation of advertisement calling and call phonotaxis in bullfrogs. *Horm. Behav.* 28:232-240.
- BURMEISTER, S.; WILCZYNSKI, W.** 2000. Social signals influence hormones independently of calling behavior in the treefrog (*Hyla cinerea*). *Horm. Behav.* 38:201-209.
- BRADBURY, J.; VEHRENCAMP, S.** 1998. Production, transmission and reception of signals In: Principles of animal communication. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts, Estados Unidos. pp. 15-173.
- CHU, J.; MARLER, C.A.; WILCZYNSKI, W.** 1998. The effects of arginine vasotocin on the calling behavior of male cricket frogs in changing social contexts. *Horm. Behav.* 34:248-261.
- DEVICHE, P; MOORE, F.L.** 1988. Steroidal control of sexual behavior in the rough-skinned newt (*Taricha granulosa*): effect of testosterone, estradiol, and dihydrotestosterone. *Horm. Behav.* 22:26-34.
- 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>
- GIORGIO, M.; GIACOMA, C.; VELLANO, C.; MAZZI, V.** 1982. Prolactin and sexual behaviour in the crested new (*Triturus cristatus carnifex* Laur). *Gen. Comp. Endocrinol.* 47:139-147.
- GREEN, A.** 2001. Mass/length residuals: measures of body condition or generators of spurious results? *Ecology.* 82:1473-1483.
- KELLEY, D. B.** 1980. Auditory and vocal nuclei in the frog brain concentrate sex hormones. *Science* 207:553-555.
- LEARY, C.; GARCIA, A.; KNAPP, R.; HAWKINS, D.** 2008. Relationship among steroid hormone levels, vocal effort and body condition in an explosive-breeding toad. *Anim. Behav.* 76:175-185.
- MARLER, C.A.; CHU, J.; WILCZYNSKI, W.** 1995. Arginine vasotocin injection increases probability of calling in cricket frog, but causes call changes characteristic of less aggressive males. *Horm. Behav.* 29:554-570.
- MENDONÇA, M. T.; LITCH, P. RYAN, M. J.; BARNES, R.** 1985. Changes in hormone levels in relation to breeding behavior in male bullfrog (*Rana catesbeiana*) at the individual and population levels. *Gen. Comp. Endocrinol.* 58:270-279.
- MIRANDA J.; WILCZYNSKI W.** 2009. Sex differences and androgen influences on midbrain auditory thresholds in the green treefrog, *Hyla cinerea*. *Hear. Res.*, 252:79-88.
- MOORE, F.L.** 1978. Differential effects of testosterone plus dihydrotestosterone on male courtship of castrated newts, *Taricha granulosa*. *Horm. Behav.* 11:202-208.
- MOORE, F.L.; BOYD, S.; KELLEY, D.** 2005. Historical perspective: Hormonal regulation of behaviors in amphibians. *Horm. Behav.* 48:373-383.

- PENNA, M.; VELOSO, A.** 1990. Vocal diversity in frogs of the South American template forest. *J. Herpetol.* 24:23-33.
- PENNA, M.; SOLÍS, R.** 1992. Canto nupcial evocado en el sapo de cuatro ojos, *Pleurodema thaul*. **In:** IV Congreso Nacional y I Iberoamericano de Etología, Caceres, España. Septiembre de 1992. Universidad de Chile. Resúmenes pp. 34.
- PENNA, M.; CAPRANICA, R.R.; SOMERS, J.** 1992. Hormone-induced vocal behavior and midbrain auditory sensitivity in the green tree frog *Hyla cinerea*. *J. Comp. Physiol. A.* 170:73-82.
- PENNA, M.; SOLÍS, R.** 1998. Frog call intensities and sound propagation in the South American temperate forest region. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 42:371-381.
- PENNA, M.; VELÁSQUEZ, N.; SOLÍS, R.** 2008. Correspondence between evoked vocal responses and auditory thresholds in *Pleurodema thaul* (Amphibia; Leptodactylidae). *J. Comp. Physiol. A.* 194:361-371.
- PROPPER, C.R.; DIXON, T.B.** 1997. Differential effects of arginine vasotocine and gonadotropin-releasing hormone on sexual behaviors in an anuran and amphibian. *Horm. Behav.* 32:99-104.
- RAND, S.** 1988. An overview of anuran acoustic communication. **In:** Frittsch, B.; Hethington, T.; Ryan, M.; Wilczynski, W.; Walkowiak, W. *The Evolution of the Amphibian Auditory System.* John Wiley & Sons. Nueva York, Estados Unidos. pp. 455-483.
- SOLÍS, R.** 1994. Factores moduladores de las interacciones sociales acústicas de *Pleurodema thaul*. Tesis Doctor en Ciencias. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Ciencias. 76p.
- SOLÍS, R.; PENNA, M.** 1997. Testosterone levels and evoked vocal responses in natural population of the *Batrachyla taeniata*. *Horm. Behav.* 31:101-109.
- TITO, M.V.; HOOVER, M.A.; MINGO, A.M.; BOYD, S.K.** 1999. Vasotocin maintains multiple call types in the gray tree frog, *Hyla versicolor*. *Horm. Behav.* 36:166-175.
- TOWNSEND, D.S.; MOGER, W. H.** 1987. Plasma androgen levels during male parental care in a tropical frog (*Eleutherodactylus*). *Horm. Behav.* 21:92-99.
- TOYODA, F.; MATSUDA, K.; YAMAMATO, K.; KIKUYAMA, S.** 1996. Involvement of endogenous prolactin in the expression of courtship behavior in the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 102:191-196.
- WETZEL, D.; KELLEY D.B.** 1983. Androgen and gonadotropin effects on mate male calls in south african clawed frogs, *Xenopus laevis*. *Horm. Behav.* 17:388-404.
- WELLS, K. D.** 1977. The social behaviour of anuran amphibians. *Anim. Behav.* 25:666-693
- WILCZYNSKI, W.; RESLER, C.; CAPRANICA, R.R.** 1987 Tympanic and extratympanic sound transmission in the leopard frog *J. Comp. Physiol. A* 161:659-669
- WILCZYNSKI, W.; RYAN, M. J.** 1988. The auditory system as a model for neurobiology, behavior and evolution. **In:** *The Evolution of the Amphibian Auditory System.* John Wiley & Sons. Nueva York, Estados Unidos. pp. 3-12.

WILCZYNSKI, W.; LYNCH, K.S.; O'BRYANT, E.L., 2005. Current research in amphibians: Studies integrating endocrinology, behavior, and neurobiology. *Horm. Behav.* 48:440-450.

Anexo 1

Estimación de la superficie corporal a partir del peso de los machos (Canals, 2010¹).

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

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

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

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

$$A^3 = K_1^3 \frac{V^2}{K_2^2} = CV^2 \quad / \sqrt[3]{\quad}$$

$A = CV^{\frac{2}{3}}$ como la densidad de los seres vivos es aproximadamente 1, podemos reemplazar volumen por peso corporal

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

¹ CANALS, M. 2010. [Comunicación Personal]. U. de Chile, Fac. de Ciencias.