



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y**  
**PECUARIAS**  
**ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**“UMBRALES DE RESPUESTAS AUDITIVAS EN SAPOS FOSORIALES DEL GÉNERO  
EUPSOPHUS”**

**María Alicia Plaza Bobadilla**

**Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario**

**Financiamiento  
FONDECYT 1110939**

Profesor Guía  
Dr Mario Penna Varela

**SANTIAGO – CHILE**  
**2012**



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y  
PECUARIAS  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA



**“UMBRALES DE RESPUESTAS AUDITIVAS EN SAPOS FOSORIALES DEL GÉNERO  
EUPSOPHUS”**

**María Alicia Plaza Bobadilla**

**Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario**

**Financiamiento  
FONDECYT 1110939**

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA : DR. MARIO PENNA V.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: DR. RIGOBERTO SOLIS M.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: DR. ENZO BOSCO V.	.....	.....

**SANTIAGO – CHILE**

**2012**

# ÍNDICE

RESUMEN.....	2
ABREVIACIONES.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4-6
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7-11
1. Aspectos generales de la comunicación sonora.....	7
2. Comunicación acústica en anfibios anuros.....	8
3. Ambiente acústico del bosque templado austral.....	9
4. Estudios neurofisiológicos.....	10
OBJETIVO GENERAL.....	12
OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13-18
1. Lugar del estudio.....	13
2. Procedimiento quirúrgico.....	13
3. Elaboración de estímulos y procedimientos de registro.....	15
RESULTADOS.....	19-21
DISCUSIÓN.....	22-25
BIBLIOGRAFÍA.....	26-30
TABLA 1.....	31
FIGURA 1.....	32
FIGURA 2.....	32
FIGURA 3.....	33
FIGURA 4.....	34
FIGURA 5.....	35-36
FIGURA 6.....	37

## RESUMEN

Los sistemas de comunicación animal requieren ser caracterizados en sus diversos componentes: los organismos emisores y las señales que producen, el medio ambiente a través del cual éstas se propagan y las capacidades sensoriales de los organismos receptores. *Eupsophus calcaratus* es un anuro del bosque templado austral que se comunica mediante señales acústicas que resultan considerablemente atenuadas al propagarse en estos ambientes. Con el objeto de determinar de qué manera la sensibilidad auditiva contribuye a una comunicación eficiente durante la actividad reproductiva de este anuro, se midieron los umbrales auditivos de respuestas neuronales del mesencéfalo de *E. calcaratus* a tonos de diferentes frecuencias y a cantos naturales coespecíficos. Los resultados muestran que los umbrales de respuesta a frecuencias en el rango de las vocalizaciones de la especie son de alrededor de 58 dB SPL y los audiogramas están centrados a alrededor de 1700 Hz. En tanto que, los umbrales de respuesta a los cantos de advertencia son de alrededor de 67 dB SPL. Estos umbrales son altos en relación a los encontrados en otros anuros, y analizados en conjunto con mediciones de la intensidad de los cantos y la atenuación que experimentan estas señales al propagarse en condiciones naturales, indican que *E. calcaratus* se comunicaría en un rango limitado a distancias inferiores a 2 m. Diversos mecanismos conductuales permitirían compensar parcialmente las desventajas de un sistema de comunicación con señales de baja intensidad y alta atenuación, que son procesadas por un sistema auditivo de baja sensibilidad.

## **ABREVIATURAS**

- MU Mejor Umbral.
- FC Frecuencia Central.
- FD Frecuencia Dominante.
- SPL Sound Pression Level: Nivel de presión de Sonido.
- SVL Longitud hocico-cloaca.

# INTRODUCCIÓN

La comunicación es un área de gran importancia en el estudio del comportamiento animal. Diversos animales emplean canales de transmisión de información basados en distintos sistemas sensoriales: táctil, químico, visual, eléctrico y acústico (Bradbury y Vehrencamp, 1998).

Los anuros, es decir los sapos y las ranas, constituyen un orden de la Clase Anfibia que cuenta con más de 3200 especies que utilizan extensamente la comunicación por sonido. Estos organismos presentan ventajas considerables con respecto a otros vertebrados para estudios de la comunicación acústica, debido a las características relativamente simples de los sonidos que producen y de su sistema auditivo. Estas cualidades los hacen constituir un modelo apropiado para estudiar las bases de la comunicación por sonido, contribuyendo a la comprensión de mecanismos más complejos de otros vertebrados como los mamíferos, incluyendo los humanos.

La señal acústica más frecuente de los anuros es el denominado canto de advertencia que tiene dos funciones, atraer a las hembras para el apareamiento y anunciar a otros machos la pertenencia de un territorio. Durante las interacciones vocales, los machos pueden además producir cantos agresivos (Gerhardt y Huber, 2002). Las hembras utilizan las características del canto para seleccionar a los machos. En algunas especies por ejemplo, las hembras prefieren los cantos más graves, producidos por sujetos de mayor tamaño (Ryan y Keddy-Hector, 1992) y en algunas pocas especies las hembras cantan en respuesta al canto de los machos (Ryan y Rand, 1990). Otro canto bastante común en anuros es el de rechazo sexual, el cual es emitido por machos y hembras de algunas especies indicando que no son receptivos para la reproducción (Gerhardt y Huber, 2002).

Estas emisiones sonoras son características para cada especie y determinan el reconocimiento especie específico y el aislamiento reproductivo entre los distintos taxa.

Los anuros que se encuentran en Chile corresponden principalmente a las familias Cycloramphidae y Bufonidae. Los sapos del género *Eupsophus* del sur de Chile producen dos vocalizaciones: el canto de advertencia y el de agresividad. Estas especies se reproducen en pantanos con abundantes musgos y helechos, en los que sus cantos son considerablemente atenuados. Sin embargo, las especies de *Eupsophus* emiten sus vocalizaciones desde pequeñas cuevas al interior de las cuales se amplifican los cantos de sus vecinos, lo que contribuiría a hacer más detectables los cantos de sus coespecíficos (Penna y Solís, 1996).

*Eupsophus calcaratus* (Fig.1) es un anuro de la subfamilia Alsodinae, familia Cycloramphidae (Frost *et al.* 2006), que se distribuye en Chile entre la XIV y XII Regiones (Formas, 1989). Durante su periodo reproductivo, entre los meses de Septiembre y Noviembre (Formas y Brieva 1994), los machos cantan desde el interior de cuevas, en agregaciones corales y las hembras acuden atraídas por estos sonidos.

El canto de advertencia de *E. calcaratus* consiste en una nota única de duración promedio de 266 ms, emitida a una tasa promedio de 8,6 cantos/min. El espectro del canto consiste en una serie de armónicas, donde la frecuencia dominante corresponde a la segunda o tercera armónica, que en promedio corresponden a 1305 y 1949 Hz, respectivamente (Penna y Quispe 2007). Este canto es una señal muy débil en comparación con las de otros anuros, ya que la presión de sonido medida a 50 cm del individuo emisor es de 70.8 dB peak SPL (66.0-75.5 dB) (Penna y Solís, 1998).

Para determinar cuan detectables son para los animales que se comunican por sonido las señales acústicas que emiten en condiciones naturales, es necesario conocer la

intensidad de las vocalizaciones, las alteraciones que las afectan en el medio en que se propagan y además la sensibilidad de su sistema auditivo. Estudios previos han determinado las características de las vocalizaciones de *E. calcaratus*, y en un estudio se ha explorado la respuesta de la membrana timpánica a sonidos (Penna *et al.*, 2009). Sin embargo, no se ha explorado la sensibilidad de su sistema auditivo central.

En esta Memoria de Título se determinaron los umbrales de sensibilidad auditiva de respuestas neuronales del mesencéfalo de *E. calcaratus* a tonos de diferentes frecuencias y a cantos naturales de esta especie. Estos resultados, analizados en conjunto con mediciones de la intensidad de los cantos y de la atenuación que experimentan estas señales al propagarse en condiciones naturales, permiten estimar las distancias a las cuales esta especie puede establecer una comunicación efectiva.



# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## 1-Aspectos generales de la comunicación sonora

Se considera que existe comunicación cuando la apariencia o acciones de un individuo influyen la conducta de otro, sin que medie la aplicación directa de fuerza (Bradbury y Vehrencamp, 1998).

En un sistema de comunicación simple, un emisor produce una señal que se propaga a través de un canal hacia un receptor. La información transmitida permite reducir la incertidumbre acerca de la identidad del emisor o de la conducta posterior a la producción de la señal. Por ejemplo la producción de un tipo particular de señal, puede indicar que el animal probablemente atacará a un rival cercano (Gerhardt y Huber, 2002).

Diversas especies animales se comunican a través de distintos canales sensoriales, utilizando señales táctiles, químicas, eléctricas visuales y sonoras. Las señales acústicas presentan diversas ventajas en relación a otras modalidades de comunicación: los sonidos se transmiten a largas distancias, en ausencia de luz y en ambientes estructuralmente complejos. Además, estas ondas se propagan en distintas direcciones, siendo moderadamente fáciles de localizar y pueden ser interrumpidas instantáneamente en caso de peligro para el emisor, por ejemplo, ante la presencia de algún predador. Sin embargo, las propiedades de las señales acústicas pueden constituir desventajas en ciertas circunstancias: no son susceptibles de ser dirigidas exclusivamente a un receptor, pudiendo ser interceptadas por predadores o rivales. Por otra parte, como los sonidos no persisten en el tiempo, estas señales requieren ser producidas en forma repetitiva, lo que conlleva un

importante costo energético total al ser emitidas durante períodos prolongados (Gerhardt y Huber, 2002).

Los animales que se comunican mediante sonido pueden aumentar la efectividad de la propagación y direccionalidad de los sonidos producidos, eligiendo sitios que favorezcan estos procesos. Insectos, aves y anuros se ubican en lugares que amplifican los sonidos emitidos, favoreciendo su propagación (Prozesky-Schulze *et al.*, 1975, Wells y Schwartz, 1982, Penna y Solís, 1999). Una estrategia diferente es utilizada por ranas del sur de Chile, incluida la especie que se estudiará en esta memoria, *E. calcaratus*. Estos animales vocalizan desde cuevas en que los cantos de individuos vecinos coespecíficos resultan amplificados, lo que mejoraría la recepción de estas señales (Penna y Solís, 1998, 1999).

## **2.- Comunicación acústica en anfibios anuros**

Para los anuros las vocalizaciones representan las señales de comunicación más importantes y constituyen un componente principal de las relaciones tanto inter como intraespecíficas (Gerhardt y Huber, 2002). Debido a que los períodos de apareamiento de algunas especies pueden coincidir, se producen agregaciones corales con machos de varias especies cantando al mismo tiempo, por lo que éstas deben utilizar diversas estrategias para superar la interferencia acústica generada. Estos cantos son muy diversos y varían entre especies, sin embargo, una especie también puede producir diferentes tipos de cantos. Estas diferencias de las señales son importantes para prevenir cruzamientos interespecíficos y subsecuentes fecundaciones estériles.

Experimentos de estimulación con sonidos sintéticos han demostrado que las respuestas fonotácticas de las hembras y las respuestas vocales de los machos son selectivas

para determinados componentes espectrales y/o temporales de los sonidos (Capranica, 1965; Gerhardt, 1988).

### **3.- Ambiente acústico del bosque templado austral**

En el sur de Chile, las comunidades de anuros que se congregan en la época de reproducción conforman un ambiente acústico simple en donde el nivel de ruido de fondo es generalmente bajo (Penna y Solís 1998), en comparación a la exuberancia sonora de los ambientes tropicales.

En los bosques templados del sur del país rara vez se encuentran vocalizando simultáneamente más de tres especies. En todos los casos de coexistencia, las llamadas se diferencian en sus parámetros temporales y/o espectrales. Sólo existe algún grado de sobreposición entre especies que cantan desde lugares distintos en un mismo hábitat (Penna y Veloso, 1990).

En recientes estudios sobre efectos de ruidos abióticos naturales, se ha encontrado que los machos de dos anuros del bosque templado austral responden de distinta forma a la interferencia de ruidos abióticos naturales y de ruido sintetizado de composición espectral similar a la de los cantos de estas especies. Los machos de *E. emiliopugini* disminuyen su actividad vocal en presencia de algunos de estos ruidos (Penna y Hamilton-West, 2007) en tanto que los de *E. calcaratus* la incrementan (Penna *et al.*, 2005a). Los machos de esta especie cantan vigorosamente durante exposiciones a ruidos abióticos naturales de lluvia, y arroyo, y un ruido pasa banda que contiene las frecuencias del canto coespecífico.

#### 4.- Estudios neurofisiológicos

La selectividad de respuestas conductuales obedece al procesamiento preferencial de ciertos patrones espectrales y temporales que realiza su sistema auditivo (Feng y Schellart, 1999; Rose y Gooler, 2007). Los anfibios poseen dos órganos sensoriales especializados en la detección del sonido, la papila anfibia y la papila basilar (Wever, 1985). La papila anfibia está inervada por fibras auditivas sintonizadas a frecuencias bajas y medias, sensible a frecuencias inferiores a 900 Hz, en tanto que la papila basilar es más sensible a frecuencias cercanas a los 1500 Hz o más agudas, dependiendo de la especie (Feng y Schellart, 1999; Rose y Gooler, 2007).

La información de estas fibras aferentes converge en una zona del mesencéfalo del sistema auditivo central de los anuros, el *torus semicircularis* (Feng *et al.*, 1990), que es homólogo del colículo inferior de mamíferos y constituye un importante nivel en el procesamiento de señales acústicas. La estructura de este centro es compleja y se compone de 5 núcleos que difieren en su citoarquitectura y en su conectividad con otros núcleos de la vía auditiva y vocal (Rose y Gooler, 2007; Wilczynski y Endepols, 2007). Además, el *torus* posee neuronas especializadas en el procesamiento de características temporales de las señales de comunicación. Los mecanismos que subyacen a esta selectividad para patrones temporales de sonido sólo han comenzado a ser abordados recientemente. Se ha logrado determinar, por ejemplo, que la selectividad a frecuencia de pulsos depende de un proceso de integración que requiere detectar un número mínimo de pulsos separados por intervalos constantes (Edwards y Alder, 2002).

Se han realizado estudios de mediciones de las respuestas auditivas umbrales mediante potenciales evocados en varios anuros y se ha encontrado que para las

frecuencias de las vocalizaciones, los umbrales están entre los 30 y los 50 dB SPL. En un estudio en la especie *Pleurodema thaul*, se encontró además similitud entre los umbrales de respuesta vocal evocada (cantos de advertencia) y los umbrales auditivos neurofisiológicos para esos mismos cantos, lo que indica que se emplea la máxima sensibilidad auditiva para las interacciones acústicas (Penna *et al.* .2008).

## **OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general de esta Memoria de Título es estudiar las respuestas auditivas en un anfibio anuro del género *Eupsophus* y su relevancia para la comunicación por sonido en estos vertebrados.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Determinar umbrales auditivos a tonos puros y a vocalizaciones naturales, mediante registros electrofisiológicos de respuestas multiunitarias en el mesencéfalo de *E. calcaratus*.
2. Relacionar los umbrales de respuestas neurales con las intensidades de las vocalizaciones a que están expuestos los machos de esta especie en condiciones naturales, con el objeto de conocer la amplitud espacial de su comunicación acústica.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Lugar del Estudio

Los animales fueron capturados durante el mes de octubre de 1998, en la localidad de La Picada (Lat. 41°06'S, Long. 72°30'O, 820 msnm), al interior del Parque Nacional Vicente Pérez Rosales, en la X Región. En el sitio de trabajo se han desarrollado anteriormente estudios con ésta y otras especies de anuros. El área en que se encuentra *E. calcaratus* es una zona pantanosa de suelo volcánico, donde los machos cantan desde cuevas ubicadas cerca de los bordes de pequeños arroyos, entre vegetación predominantemente baja, compuesta por abundantes musgos (*Rhacomytrium*), hierbas (*Scyrpus* y *Myrteola*) y helechos (*Blechnum*). Posteriormente, los animales fueron mantenidos en el laboratorio, al interior de una pieza refrigerada a 8°C, temperatura a la que se encuentran frecuentemente en terreno.

## Procedimiento Quirúrgico

Los experimentos fueron realizados con 13 individuos machos de *E. calcaratus* (SVL  $3.5 \pm 0.5$  mm; peso  $4.3 \pm 1.0$  g) que fueron mantenidos en terrarios con vegetación del sitio de captura y alimentados con larvas de tenebrios una vez por semana. Los terrarios fueron mantenidos en una sala con temperatura controlada a 8°C, bajo un régimen 12:12 de luz/oscuridad y con ciclo invertido.

Los sujetos fueron anestesiados por inmersión, que duraba en promedio 7 minutos, en una solución al 0,4% de MS-222 (Etil Ester de Acido 3- Aminobenzoico,

Sigma; pH: 3,5). Bajo anestesia, usando un microscopio quirúrgico PZO, se hizo una incisión en la piel de la zona dorsal de la cabeza y luego se horadó con una broca en la zona subyacente del cráneo. Las membranas dura y pia madre que cubren el cerebro fueron disecadas y removidas para exponer la superficie del tectum óptico. Después de la cirugía los animales fueron devueltos a sus terrarios para que pudieran recuperarse de la anestesia por 12 a 24 horas. Luego de ese período, los individuos fueron inmovilizados con una inyección de d-tubocurarina clorhidrato (9 µg/g peso vivo), y colocados sobre una placa de Peltier (Cambion), cubiertos con una gasa húmeda para facilitar la respiración cutánea.

Los registros fueron realizados en una cámara acústica aislada, con paredes y techo cubierto con 10 cm de espuma en cuñas. La inmovilización fue mantenida durante la sesión de registro con inyecciones periódicas adicionales de clorhidrato de d-tubocurarina.

Una corriente DC de alrededor de 1 A fue suministrada a la placa de Peltier para poder mantener la temperatura corporal de los sujetos a 8°C, temperatura a la cual la especie en estudio normalmente vocaliza en su ambiente natural. La temperatura de los sapos fue monitoreada con una sonda de un termómetro miniatura (Digisense 8528-20) insertada en la cloaca.

El procedimiento de anestesia, quirúrgico y de registro neurofisiológico ha sido exitosamente utilizado previamente (Penna....



## **Elaboración de los Estímulos y Procedimientos de Registro**

Los estímulos utilizados en los experimentos fueron generados con el software SigGen de la compañía Tucker-Davis Technology y controlados por un computador Pentium III (300 Mhz). Los sonidos fueron amplificados por un amplificador Nakamichi modelo PA202 y reproducidos por un parlante Polk modelo MM10a, ubicado a 1 m frente al sujeto en la cámara aislada.

Las descargas fueron registradas con un pre-amplificador Dagan 2400 y adquiridas con el sistema Tucker-Davis, utilizando el software Biosig. Los registros obtenidos fueron almacenados en discos compactos, y posteriormente analizados con el software Biosig y el sistema Tucker-Davis. Dos tipos de estímulos fueron presentados en los experimentos: (a) tonos puros que tenían una duración de 250 ms y un tiempo de ascenso/descenso de 50 ms, con frecuencias entre 100 y 5000 Hz y (b) cantos naturales, que consistían en tres cantos de advertencia denominados de frecuencia baja, media y alta y dos cantos agresivos. La estructura de un tono y de los cantos naturales se muestra en la Figura 3 y los parámetros temporales y espectrales más importantes de los cantos se muestran en la Tabla 1.

La amplitud del estímulo fue controlada por un atenuador programable (PA4, Tucker-Davis Technologies) conectado a un amplificador (NAD C 320 BEE) y a un parlante de dos vías (Dynaudio BM 6, respuesta de frecuencia 38 -20.000 Hz) situado 1 m enfrente del individuo. Los estímulos fueron presentados a un ritmo del 0,5 estímulos /s. Pevio al experimento, la intensidad de los tonos puros de frecuencias de 100-6000 Hz y de los cantos naturales fueron medidos con un micrófono de un sonómetro (Brüel and Kjaer 2238) posicionado a 2-3 mm sobre la cabeza del sujeto.

Las respuestas multiunitarias del *torus semicircularis* fueron registradas con un electrodo de tungsteno recubierto con vidrio (75  $\mu\text{m}$  diámetro) a una profundidad promedio de 886 micrones. El electrodo era manejado con un micromanipulador hidráulico (Narishige MO-8), posicionado en la superficie dorsal del *tectum* óptico, desde donde descendía hacia el *torus semicircularis* (Fig. 2a). El gran tamaño del electrodo en relación al lóbulo óptico facilitaba un posicionamiento regular del electrodo en la superficie del cerebro, en la intersección del límite entre el tercio medio y caudal y el límite entre la mitad medial y lateral del hemisferio (Fig. 2b). Esta posición daba consistentemente las respuestas auditivas más amplias. Las respuestas neurales fueron pasadas a través de un pre-amplificador (Dagan 2400) y filtradas entre 100 y 3000 Hz para registrar respuestas multiunitarias. Estas respuestas fueron monitoreadas por medio de un osciloscopio y un parlante, y los umbrales determinados por criterios audiovisuales. Además de registrar respuestas multiunitarias, se realizaron durante la presentación de algunos estímulos, registros de potenciales evocados auditivos desde la misma posición del electrodo. Para ello las respuestas eran filtradas entre 10 y 1000 Hz. Los potenciales registrados se adquirieron y analizaron mediante el programa Biosig. Las amplitudes de los potenciales evocados fueron medidas (mV) en su máxima deflexión positiva y negativa. Estos registros permitieron validar la determinación de umbrales por medios audiovisuales realizada con los registros multiunitarios.

Un estímulo de búsqueda consistente en un ruido blanco con la misma estructura temporal que los tonos puros usados (250 ms de duración con ascenso y descenso de 50 ms) fue presentado a una intensidad de alrededor de 80 dB SPL mientras el electrodo fue introducido en el cerebro para determinar el lugar en donde se evocaba la mayor respuesta auditiva. Esta metodología ha sido ocupada en otros estudios previos y proporciona

mediciones fiables de los umbrales auditivos en diferentes anuros (Penna *et al.* 1990, 1992, 2009). Para obtener umbrales a un estímulo determinado, se comenzaba a dar el sonido a una intensidad bajo el umbral y después se aumentaba en pasos de 3 dB hasta obtener una respuesta detectable por los criterios audiovisuales empleados.

El umbral más bajo observado en la región de alta frecuencia obtenido en un audiograma individual fue denominado mejor umbral (MU). A partir de este valor se determinó la frecuencia central (FC) para la región de alta frecuencia, calculando el promedio ponderado de los umbrales para frecuencias entre 700 y 5000 Hz que estaban dentro de los 6 dB por sobre el MU. Para calcular la FC de un audiograma individual, cada una de las frecuencias consideradas fue multiplicada por la presión de sonido expresada en (N/m<sup>2</sup>) correspondiente a la diferencia entre la SPL al MU y la SPL a esa misma frecuencia, los productos sumados y divididos por la suma de los SPLs. Este procedimiento fue adoptado en lugar de utilizar la única frecuencia a la cual correspondía el umbral más bajo, con el fin de obtener un valor más representativo de la sensibilidad de un audiograma en la región de alta frecuencia. El procedimiento seguido se ilustra en la Figura 4.

Para obtener los umbrales promedio de las respuestas multiunitarias a cada una de las frecuencias examinadas y los umbrales para los cantos naturales, los valores en dB de los umbrales de los individuos fueron convertidos a escala lineal en N/m<sup>2</sup> y el promedio fue reconvertido a dB SPL.

Los umbrales de respuesta a los distintos estímulos naturales fueron comparados con ANDEVA de Friedman ( $p < 0.05$ ) y comparaciones múltiples, mediante pruebas de Wilcoxon y aplicando correcciones de Bonferroni para el número de comparaciones. La

dependencia de los de la FC respecto al tamaño y peso de los sujetos fue explorada con un análisis de correlación de Spearman ( $P < 0.05$ ).

## RESULTADOS

### Respuestas multiunitarias auditivas

Los animales registrados tenían un peso promedio de 4.3 g (rango 3.3-5.5 g) y una talla promedio de 35 mm (rango 32-38 mm). Los audiogramas muestran que la sensibilidad auditiva de *E. calcaratus* se extiende entre los 0.1 y 5.0 kHz aproximadamente, con regiones de sensibilidad aumentada en el rango de baja frecuencia (0.1-0.5 kHz) y alta frecuencia (1.0-2.5 kHz). Estas regiones se aprecian tanto en los audiogramas individuales como en el promedio obtenido para los 13 individuos analizados, como se muestra en la Figura 5.

El MU para la región de alta frecuencia registró un promedio de 58.39 dB SPL (rango 48.4-62.7 dB), y la FC calculada para la región de alta frecuencia tuvo un promedio de 1.8 kHz (rango 1.3-2.5 kHz). La FC de los audiogramas está correlacionada negativamente con el peso de los individuos depende del peso (correlación de Spearman:  $R_s = -0.560$ ,  $p < 0.05$ ), y tiene una relación similar con el tamaño de los individuos, pero que no alcanza niveles de significación estadística ( $R_s = -0.546$ ,  $p > 0.05$ ).

Las respuestas a los estímulos de cantos naturales mostraron umbrales que en promedio estuvieron entre los 60 y 70 B SPL (Figura 5b). Los valores promedio obtenidos para el canto de advertencia bajo, medio y alto fueron 68.3 dB SPL (rango 55.5-75.0 dB SPL), 66.6 dB SPL (rango 55.8 - 71.1 dB SPL) y 66.9 dB SPL (rango 56.7-73.1 dB SPL), respectivamente. Los valores promedio para el canto agresivo 1 y 2 fueron 73.5 dB SPL (rango 65.4- 78.4 dB SPL) y 68.7 dB SPL (rango 62-72.5 dB SPL), respectivamente. El ANDEVA de Friedman mostró que existen diferencias significativas entre los umbrales a

los 5 cantos presentados ( $\chi^2_4 = 34.5$ ,  $P < 0.00001$ ). Las comparaciones múltiples realizadas con la prueba de Wilcoxon con corrección de Bonferroni ( $p < 0.005$ ) mostraron que los umbrales de respuestas al canto de advertencia bajo eran menores que los umbrales de respuesta al canto agresivo 1 ( $Z = 3.18$ ,  $p < 0.00147$ ) y que los umbrales al canto de advertencia medio eran menores que los umbrales al canto agresivo 1 ( $Z = 3.18$ ,  $p < 0.00147$ ) y al canto agresivo 2 ( $Z = 3.06$ ,  $p < 0.00221$ ). Además, los umbrales al canto de advertencia alto fueron inferiores a los umbrales al canto agresivo 1 ( $Z = 3.18$ ,  $p < 0.00147$ ) y por último, los umbrales al canto agresivo 2 fueron inferiores a los umbrales al canto agresivo 1 ( $Z = 3.18$ ,  $p < 0.00147$ )

### **Potenciales evocados**

Los registros de potenciales evocados realizados en las mismas posiciones de los electrodos y en respuesta a los mismos estímulos que los registros de respuestas multiunitarias, mostraron una concordancia cercana con éstos, lo que permitió validar la metodología de criterios audiovisuales empleados para las respuestas multiunitarias.

Los registros de potenciales mostraron una onda lenta con una deflexión bifásica, cuyo máximo positivo y negativo ocurrían con una latencia de alrededor de 50 y 130 ms, respectivamente y con una amplitud entre ambos máximos de alrededor de 20 mVolt para niveles de sonido de alrededor de 20 dB sobre el umbral (Fig 6). La amplitud en el registro en ausencia de estímulo sonoro fue de alrededor de 2 mVolt para los tiempos señalados, por lo que se adoptó el criterio de considerar que una amplitud de 5 mVolt correspondía al umbral de respuesta auditiva.

Para una muestra de 50 determinaciones de umbrales en diferentes individuos a frecuencias cercanas a la FC de los audiogramas, se compararon los resultados de las mediciones de amplitud de potenciales con el criterio audiovisual utilizado para las respuestas multiunitarias. En 25 casos (50 %) ambas mediciones coincidieron, en tanto que en 22 (44 %) y 3 (6 %) casos los umbrales obtenidos mediante potenciales evocados estuvieron 3 y 6 dB por debajo de los medidos con criterio audiovisual, respectivamente.

## DISCUSIÓN

Los umbrales auditivos medidos con registros multiunitarios indican una capacidad auditiva limitada de *E. calcaratus* para frecuencias bajo los 5 kHz, lo cual es similar a lo encontrado en otros anuros. Los audiogramas muestran dos zonas de sensibilidad aumentada, en el rango de 0.1 a 0.5 kHz y de 1.0 a 2.5 kHz, que corresponderían a la respuesta de los dos órganos auditivos del oído de anfibios, la papila anfibia y la papila basilar, respectivamente (Rose y Gooler 2007). La frecuencia central de los audiogramas, de alrededor de 1.8 kHz, se encuentra en el rango de los principales componentes espectrales del canto de advertencia de la especie, que corresponden a la segunda y tercera armónica, siendo éstas en promedio 1.3 y 1.9 kHz , respectivamente (Penna y Quispe 2007). Esta sobreposición entre señal y sensibilidad auditiva indica que existe una correspondencia entre el emisor y el receptor que favorece la comunicación sonora en esta especie. La mayor proximidad de la frecuencia central de los audiogramas con la frecuencia de la tercera armónica del canto podría favorecer la detección de estos componentes de frecuencias relativamente altas, que experimentan una mayor atenuación respecto a frecuencias más bajas al propagarse los cantos en los ambientes de pantanos en que estas especies habitan (Penna y Solís 1998).

La sensibilidad auditiva de *E. calcaratus* a nivel del mesencéfalo, sin embargo, difiere de la medida a nivel de la membrana timpánica, en la que hay una sensibilidad máxima centrada a los 2.3 kHz (Penna *et al.* 2009). La diferencia en la sensibilidad del sistema nervioso auditivo central respecto a estas mediciones timpánicas, podría deberse a que en anuros existen otras zonas de la superficie corporal que son sensibles a la



estimulación por ondas sonoras (Mason 2007). La respuesta del sistema auditivo dependería de la suma de la información llegada desde distintas zonas de la periferia.

Los umbrales auditivos de *E. calcaratus* en el rango de las frecuencias de las vocalizaciones, con un umbral mínimo promedio de los audiogramas de 58 dB SPL son relativamente altos en relación a otros anuros. Este valor contrasta con los umbrales de alrededor de 40 dB SPL medidos en anuros de Norteamérica (Rose y Gooler 2007) y en una especie de Chile central (Penna *et al.* 2008). Los umbrales auditivos medidos en el presente estudio para las vocalizaciones de *E. calcaratus* de alrededor de 67 dB SPL son también altos en relación a los reportados para otros anuros, que se encuentran en el rango de 40- 50 dB SPL (Penna *et al.* 2008). También los umbrales de respuesta vocal evocada en otros anuros están bajo este valor, en el rango de 40-50 dB SPL (Penna *et al.* 2008). Incluso en *E. emilipugini*, una especie relacionada y que habita en el mismo ambiente de *E. calcaratus*, los umbrales de respuestas vocales evocadas son en promedio de 60 dB SPL (Penna *et al.* 2005b), es decir inferiores a los umbrales auditivos para los cantos encontrados en el presente estudio.

Los altos umbrales auditivos de *E. calcaratus* podrían estar determinados en parte por las bajas temperaturas a las cuales esta especie se reproduce y vocaliza en el bosque templado del sur de Chile, que pueden ser inferiores a 8° C (Penna *et al.* 2005a). Los umbrales auditivos en anuros están inversamente relacionados con esta variable ambiental (e.g. Narins 2001).

La sensibilidad auditiva de *E. calcaratus* le permite detectar de manera similar los tres cantos de advertencia utilizados como estímulos, que representan el rango de variación de la señal en esta especie. La mejor sensibilidad a los cantos de advertencia respecto a los cantos de agresividad resulta adecuada para un mejor reconocimiento de señales que son

transmitidas a distancia. Los cantos de agresividad en cambio, son intercambiados por machos que se encuentran muy próximos al interior de una misma cavidad y son señales de más baja intensidad que los cantos de advertencia (Penna,M., datos no publicados).

El rango de distancia a la cual puede comunicarse un animal puede calcularse conociendo la intensidad de la señal, la atenuación que la afecta al propagarse a través del ambiente natural donde es producida y la sensibilidad auditiva de los receptores. Estudios previos de medición de la intensidad de las vocalizaciones de *E. calcaratus* han mostrado que esta vocalización alcanza 80 dB SPL a una distancia de 25 cm de la entrada de la cueva en la que se encuentra el sujeto vocalizando. El nivel del canto decrece a alrededor de 70 y 60 dB SPL a las distancias de 1 y 2 m de la fuente sonora, respectivamente (Penna,M., datos no publicados). Como los umbrales auditivos de esta especie a los cantos de advertencia encontrados en el presente estudio son de alrededor de 67 dB SPL, el rango de comunicación estaría limitado a distancias inferiores a 2 m. Sin embargo, la baja intensidad del canto de *E. calcaratus* y la importante atenuación que afecta a esta señal en el ambiente natural, puede ser parcialmente compensada por el efecto amplificador de las vocalizaciones de las cuevas desde las cuales cantan los machos de *E. calcaratus*. Al interior de estas cavidades, las vocalizaciones de los vecinos son amplificadas en promedio de 6 dB, llegando hasta un máximo de 18 dB (Penna, 2004).

La condición de *E. calcaratus* se asemeja a la de otros anuros que se comunican en ambientes desfavorables debido a la importante atenuación que experimentan sus señales, a las capacidades relativamente limitadas de sus sistemas auditivos y que además confrontan la interferencia generada en los elevados niveles de ruido presentes en los ambientes en que se comunican (Boistel *et al.* 2011). En el caso de *E. calcaratus*, los niveles de ruido también pueden ser elevados en los ambientes que se reproduce y se comunica esta especie

durante los meses de invierno. Sin embargo, este anuro en presencia de estas interferencias adopta una estrategia de confrontar el ruido aumentando de manera importante su actividad vocal, compensando en alguna medida la dificultad impuesta por el ambiente para la comunicación sonora (Penna *et al.* 2005a).

La limitada capacidad auditiva de *E. calcaratus* encontrada en el presente estudio resulta entonces compensada mediante diferentes mecanismos conductuales que han contribuido a la adaptabilidad de su sistema de comunicación acústica en el tiempo evolutivo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Bradbury, J.W. y Vehrencamp, S.L. (1998)** Principles of Animal Communication. Sinauer, Sunderland.
2. **Boistel, R.; Aubín, T. ; Cloetens, P. ; Langer, M. ; Gillet, B.; Josset, P. ; Pollet, N.; y Herrel, A. (2011)** “Whispering to the deaf: communication by a frog without external vocal sac or tympanum in noisy environments,” PLoS ONE 6, e22080. doi:10.1371/journal.pone.0022080.
3. **Capranica, R. (1965)** The evoked vocal response of the bullfrog: A study of communication in anurans. Research Monographs, 33. MIT Press: Cambridge.
4. **Edwards, C. y Alder, T. (2002)** Auditory midbrain neurons that count. Nature Neuroscience. 5: 934-936.
5. **Feng, A.; Hall, J. y Gooler, D. (1990)** Neural basis of sound pattern recognition in anurans. Progress in Neurobiology 34: 313-329.
6. **Feng, A. y Schellart, N. (1999)** Central auditory processing in fish and amphibians. Pp. 218-268. In R. R. Fay & A. N. Popper (Eds.), Comparative Hearing: Central Auditory Processing in Fish and Amphibians. Springer-Verlag, New York.

7. **Formas, J. (1989)** A new species of *Eupsophus* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) from southern Chile. Proceedings of the Biological Society of Washington 102:568-576.
8. **Formas, J.R. y Brieva, L. (1994)** Advertisement calls and relationships of the Chilean frogs *E. contulmoensis* and *E. insularis* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). Proceedings of the Biological Society of Washington 107: 391-397.
9. **Frost, D.R.; Grant, T.; Faivovich, J.; Bain, R.H.; Haas, A.; Haddad, C.F.B.; de Sá, R.O.; Channing, A.; Wilkinson, M.; Donnellan, S.C.; Raxworthy, C.J.; Campbell, J.A.; Blotto, B.L.; Moler, P.; Drewes, R.C.; Nussbaum, R.A.; Lynch, J.D.; Green, D.M. y Wheeler, W.C. (2006).** The Amphibian Tree of Life. Bulletin of the American Museum of Natural History no. 297: 1-370.
10. **Gerhardt, H. C. (1988)** Acoustic properties used in call recognition by frog and toads. En: The evolution of the amphibian auditory system, Ed. B. Fritsch. John Wiley: New York, pp. 455-483.
11. **Gerhardt, H.C. y Huber, F. (2002)** Acoustic Communication in Insects and Anurans. The University of Chicago Press, Chicago.
12. **Manson, M.J. (2007)** Pathways for Sound Transmission to the inner Ear in Amphibians. En: Narins PM, Feng AS, Fay RR, Popper AN (eds) Hearing and Sound Communication in Amphibians, Springer, New York, pp 147-183.

13. **Narins, P.M. (2001)** Ectothermy's last stand: hearing in the heat and cold. En: Ryan MJ (ed) Anuran communication. Smithsonian Inst Press, Washington, pp 61–70.
14. **Penna, M. (2004)** Amplification and spectral changes of vocalizations inside burrows of the frog *Eupsophus calcaratus* (Leptodactylidae). Journal of Acoustic Society of America 116:1254–1260.
15. **Penna, M. y Veloso, A. (1990)** Vocal diversity in frogs of the south American temperate forest. Journal of Herpetology 24:23-33.
16. **Penna, M.; Capranica, RR y Somers, J. (1992)** Hormone-induced vocal behavior and midbrain auditory sensitivity in the green treefrog, *Hyla cinerea*. Journal of Comparative Physiology. A 170: 73-82.
17. **Penna, M. y Solís, R. (1996)** Influence of burrow acoustics on sound reception by frogs *Eupsophus* (Leptodactylidae). Animal Behaviour, 51, 255e263.
18. **Penna, M.; Lin, W. y Feng, A. (1997)** Temporal selectivity for complex signals by single neurons in the torus semicircularis of *Pleurodema thaul* (Leptodactylidae). Journal of Comparative Physiology. 180: 313-328.
19. **Penna, M. y Solís, R. (1998)** Frog call intensities and sound propagation in the South American temperate forest region. Behaviour Ecology and Sociobiology. 42: 371-381.

20. **Penna, M. y Solís, R. (1999)** Extent and variation of sound enhancement inside burrows of the frog *Eupsophus emiliopugini* (Leptodactylidae). *Behaviour Ecology and Sociobiology*. 47:94-103.
21. **Penna, M.; Pottstock, H. y Velásquez, N. (2005a)** Effect of natural and synthetic noise on evoked vocal responses in a frog of the temperate austral forest. *Animal Behaviour* 70:639–651.
22. **Penna, M.; Narins, P. M. y Feng, A. (2005b)** Thresholds for evoked vocal responses of *Eupsophus emiliopugini* (Amphibia, Leptodactylidae). *Herpetologica*. 61: 1-8.
23. **Penna, M. y Quispe, M. (2007)** Independence of evoked vocal responses from stimulus direction in burrowing frogs *Eupsophus* (Leptodactylidae). *Ethology* 113: 313-323.
24. **Penna, M. y Hamilton-West, C. (2007)** Susceptibility of evoked vocal responses to noise exposure in a frog of the temperate austral forest. *Animal Behaviour* 70: 639-651.
25. **Penna, M.; Velásquez, N. y Solís, R. (2008)** Correspondence between evoked vocal responses and auditory thresholds in *Pleurodema thaul* (Amphibia; Leptodactylidae). *Journal of Comparative Physiology A* 194:361–371.
26. **Penna, M.; Gormaz, J.P. y Narins, P.M. (2009)** When signal meets noise: immunity of the frog ear to interference. *Naturwissenschaften* 96:835–843.

27. **Prozesky-Schulze, L.; Prozesky, O.P.M.; Anderson, F. y Merwe, G.J.J. van der (1975)** Use of a self-made sound baffle by a tree cricket. *Nature* 255: 142-143.
28. **Rose, G. y Gooler, D. (2007)** Function of the Amphibian Central Auditory System. En: Narins PM, Feng AS, Fay RR, Popper AN (eds) *Hearing and Sound Communication in Amphibians*, Springer, New York, pp 250-290.
29. **Ryan, M. y Rand, A. (1990)** The sensory basis of sexual selection for complex calls in the Tungara Frog, *Physalaemus pustulosus* (sexual selection for sensory exploitation) *Evolution* 44 (2): 305-314.
30. **Ryan, M. y Keddy, H. (1992)** Direccional patterns of female mate choice and the role of sensory biases. *American Naturalist* 139: 1370-1383.
31. **Wells, K. y Schwartz, J.J. (1982)** The effect of vegetation on the propagation of calls in the neotropical frog *Centronella fleishmanni*. *Herpetologica* 38: 449-455.
32. **Wever, E.G. (1985)** *The Amphibian ear*. University Press: Princeton, New Jersey.
32. **Wilczynski, W. y Endepols, H. (2007)** Central auditory Pathways in Anurans: The Anatomical Basis of Hearing and Sound Communication. En: Narins PM, Feng AS, Fay RR, Popper AN (eds) *Hearing and Sound Communication in Amphibians*, Springer, New York, pp 221-249.



## ANEXOS

**Tabla 1**

Composición temporal y espectral de los cantos naturales utilizados como estímulos para determinar umbrales auditivos en *E. calcaratus*

Cantos naturales	Duración (ms)	Armónica 2 (Hz)	Armónica 3 (Hz)	Amplitud relativa (Armónica 3-2) (dB)
Advertencia, frecuencia baja	248	1227	1841	3
Advertencia, frecuencia media	251	1271	1917	-1.5
Advertencia, frecuencia alta	242	1400	2100	8.4
Agresivo 1	249			
Agresivo 2	237			

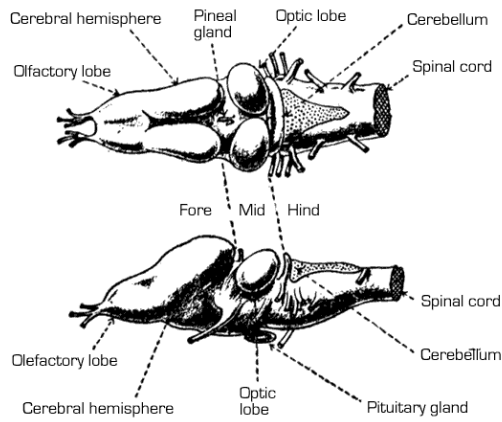
**FIGURA 1**

Ejemplar macho de *E.calcaratus*



**FIGURA 2**

a) Dibujo esquemático del cerebro de anuros. Vista dorsal y lateral.

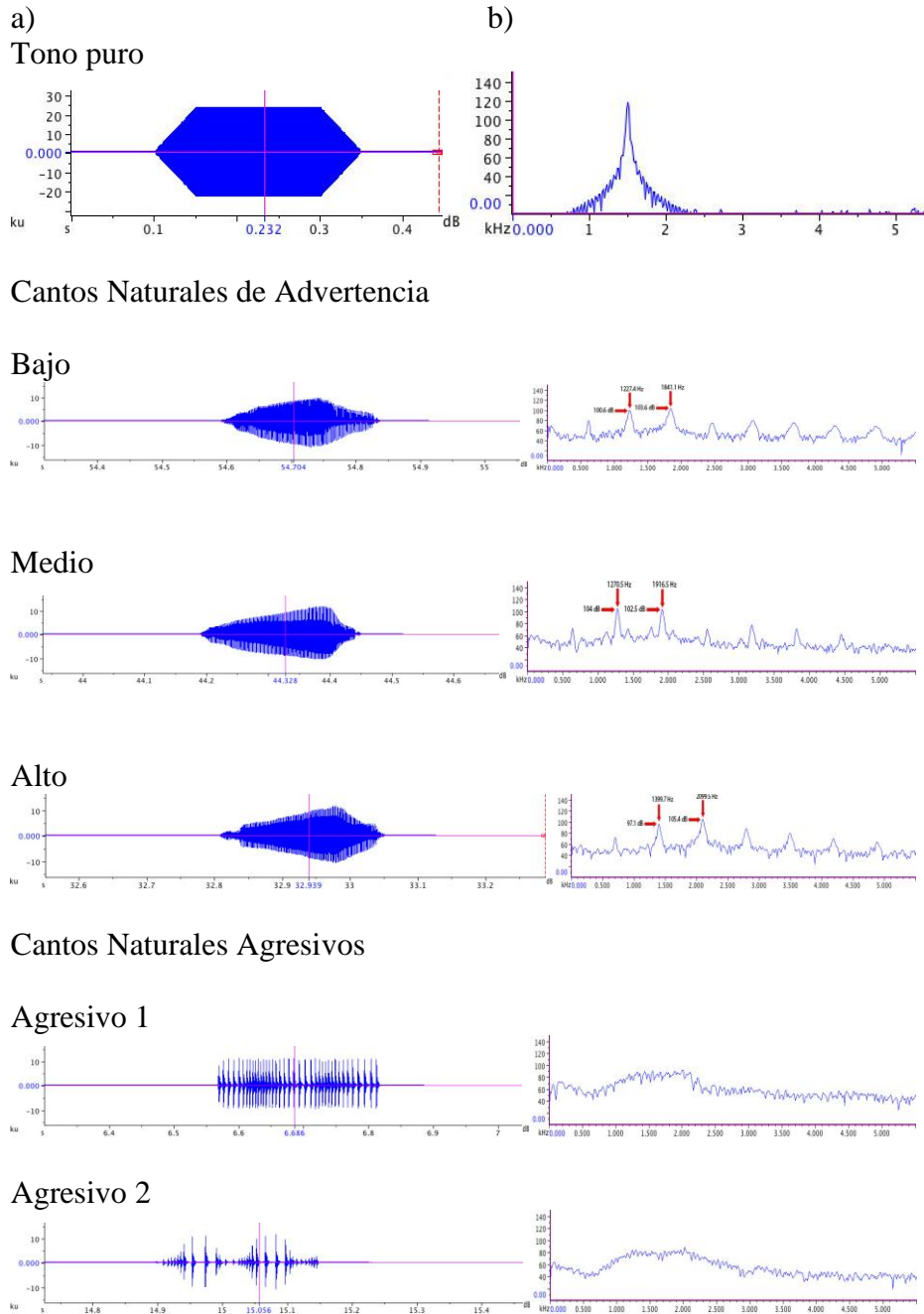


b) Corte frontal del mesencefalo de anuros mostrando la ubicacion del sitio de registro de respuestas multiunitarias y potenciales evocados en el torus semicircularis



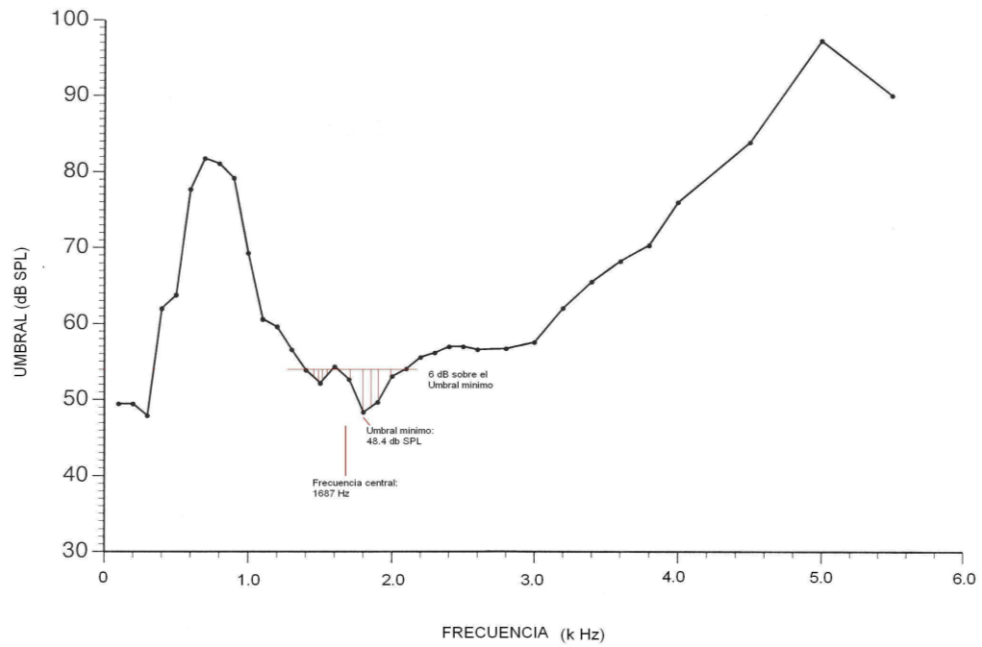
### FIGURA 3

Oscilogramas (a) y espectros (b) de un tono puro de 1.5 kHz y de los estímulos de cantos naturales utilizados para obtener umbrales de las respuestas auditivas multiunitarias en *E.calcaratus*.



## FIGURA 4

Determinación de la frecuencia central (FC) y umbral mínimo (UM) en un audiograma de respuestas multiunitarias del torus semicircularis en un macho de *E. calcaratus*



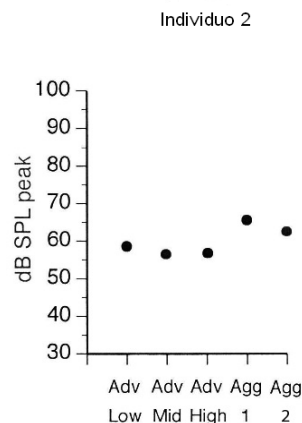
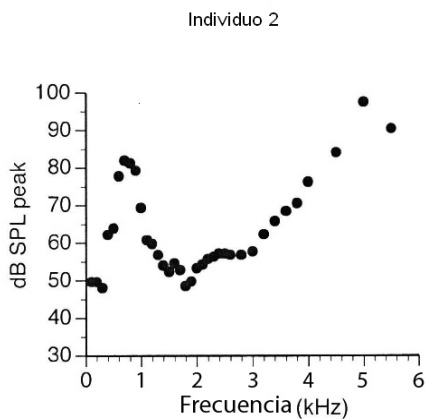
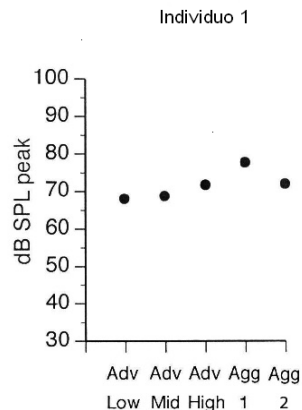
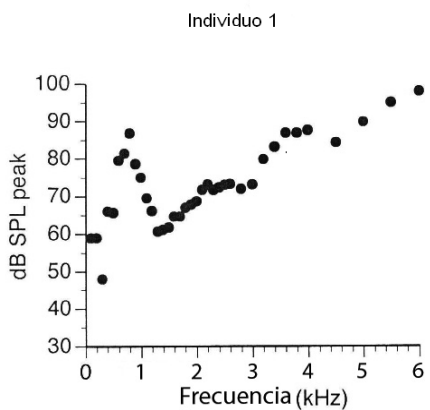
**FIGURA 5**

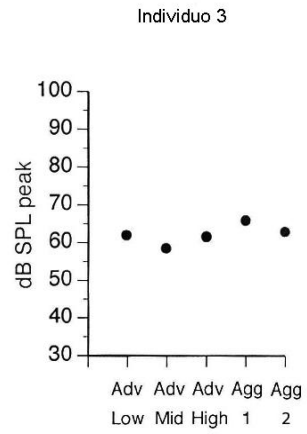
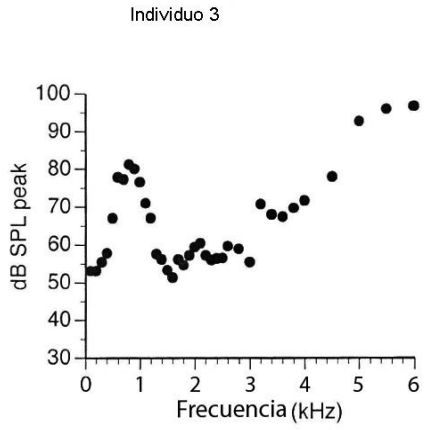
Audiogramas multiunitarios de 3 individuos (a) y el promedio de audiograma multiunitarios para potenciales evocados del cerebro medio de 13 machos de *E. calcaratus* (b). Círculos negros y barras en (b) representan promedios y rangos respectivamente.

(a)

**Respuestas a tonos puros**

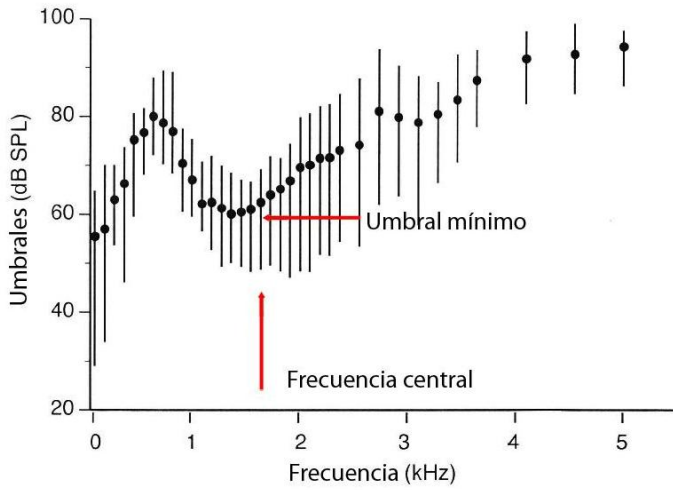
**Respuestas a cantos naturales**



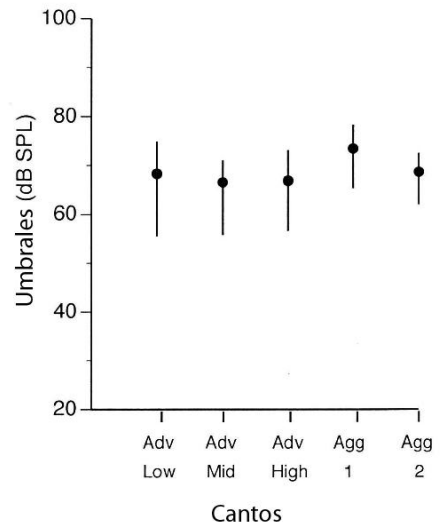


(b)

**Respuesta a tonos puros**



**Respuesta a cantos naturales**



## FIGURA 6

Registros de potenciales evocados en respuesta a tonos puros y cantos naturales de distinta intensidad. Se indican los tiempos a los que fueron medidas las amplitudes de los potenciales evocados para determinar los umbrales de respuesta. Las flechas indican los umbrales en cada serie de registros.

