

UCH-FC  
MAG-B  
G984  
C1

**CONDUCTA EXPLORATORIA ASOCIADA A LA RESPUESTA  
ADRENOCORTICAL EN LA ESPECIE *Zonotrichia capensis***

Tesis

entregada a la

Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de:



**MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Facultad De Ciencias

Por

**VÍCTOR LENIN GUTIÉRREZ IMIL**

**DICIEMBRE, 2014**

Director de Tesis Dr.

**RODRIGO A. VASQUEZ SALFATE**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION  
TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de Magister  
presentada por el candidato

**VICTOR LENIN GUTIERREZ IMIL**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al  
grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de defensa privada de Tesis  
rendido el día 26 de septiembre del 2014

**Director de Tesis**

Dr. Rodrigo Vásquez



.....

**Comisión de Evaluación de Tesis**

Dr. Pablo Sabat.



.....

Dr. Hugo Torres



.....

Dedicado a mis Padres  
Luis Gutiérrez y Orabia Práxedes  
Por su amor incondicional

## Biografía

Víctor es un joven Biólogo egresado el 2011 de la facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Durante el segundo semestre del 2012 ingreso al programa de Magister en Ciencias Biológicas para especializarse en el



área Ecológica, sin embargo su curiosidad lo llevo a incursionar, de forma paralela, en otras aristas del conocimiento relacionadas al campo de la gestión en Medio Ambiente. Actualmente la visión integrada, producto de su formación académica y de su experiencia laboral, lo han llevado a buscar nuevas oportunidades relacionadas a la investigación y al crecimiento sostenible con un especial enfoque en las ciencias ecológicas.

## Agradecimientos

Agradezco a mi Madre Orabia por enseñarme lo que significa la fraternidad. A mi Padre Luis por regalarme su vida como un verdadero ejemplo de perseverancia. A mi hermana Pamela que por su espontaneidad es capaz de romper con la rutina. A la incondicionalidad y esfuerzo de mis hermanos Marco y Aquiles, quienes día a día enfrentan las dificultades del emprendimiento familiar, fiel símbolo del esfuerzo de nuestros padres por darnos un mejor futuro. A mi pareja Fiorella, por ser una gran compañera, una madre admirable y en el futuro, una excelente profesional.

En General quiero agradecer el esfuerzo realizado por las familias Gutiérrez e Imil, ya que somos reflejo vivo de los valores que nos heredaron nuestros Padres, Tíos y Abuelos. Por otro lado quiero nombrar a la segunda familia, que no siendo consanguíneos, son personajes claves, capaces de impulsar nuestro crecimiento cuando el camino se vuelve cuesta arriba, con esto me refiero a todos mis amigos, de quienes he recibido un consejo, un momento o una simple palabra de aliento.

A mi tutor Rodrigo Vásquez, por sus consejos, buena voluntad y sobre todo por la oportunidad de trabajar en sus proyectos de investigación. Finalmente quiero agradecer a todos los integrantes del laboratorio de Ecología Terrestre ya que no solo encontré a grandes compañeros de trabajo, sino que también a grandes personas que me han ayudado mucho más allá del ámbito académico.

Este seminario fue financiado gracias al Instituto de Ecología y Biodiversidad ICM-P05-002, PFB-23-CONICYT, proyectos FONDECYT 1090794 y 1140548 del Dr, R. Vásquez y conto con el apoyo de la Asociación Parque Cordillera.

## Índice de materias

Lista de tablas.....	VII
Lista de figuras .....	VII
Abstract.....	VIII
Resumen.....	IX
Introducción.....	1
Hipótesis.....	6
Objetivos.....	6
Materiales y métodos.....	8
• Sitio de estudio.....	8
• Capturas.....	9
• Diseño experimental .....	9
• Análisis de corticosterona.....	12
• Análisis conductual.....	13
• Determinación del sexo.....	14
• Análisis estadístico.....	15
Resultados.....	16

• Corticosterona.....	16
• Respuesta conductual en relación a los niveles de corticosterona.....	19
Discusión.....	27
Conclusión.....	36
Bibliografía.....	37

## Lista de figuras

Figura 1. Aviario.....	12
Figura 2. Concentraciones de corticosterona en función del tiempo de captura.....	16
Figura 3. Niveles de corticosterona integrada.....	18
Figura 4. Frecuencia relativa de las conductas.....	21
Figura 5. Tiempo relativo de las conductas.....	24
Figura 6. Diversidad del espacio ocupado.....	26

## Lista de tablas

Tabla 1. Tratamientos experimentales.....	9
Tabla 2. MANOVA de los efectos de la Época, los tratamientos (i.e., Grupo A y B) y su interacción en el estrés y la frecuencia de las conductas.....	19
Tabla 3. MANOVA de los efectos de la Época, los tratamientos (i.e., Grupo A y B) y su interacción en el estrés y el tiempo de las conductas.....	22
Tabla 4. MANOVA de los efectos de la Época, los tratamientos (i.e. Grupo A y B) y su interacción en el estrés y la diversidad.....	25

## Abstract

Animals under stress can produce different adaptive responses allowing the maintenance of homeostasis of essential life functions. This process called “allostasis” has important mediators, such as glucocorticoids. Previous studies have shown that the maintenance cost increases (allostatic load) as a result of predictable (e.g., seasonal changes) or unpredictable (e.g., storms and natural disasters) stressful events, elevating the glucocorticoid concentrations, and hence triggering different emergency states. In the other hand, previous research shows that glucocorticoid metabolic production can regulate the behavioral phenotype, in order to increase survival under stressful conditions. In this thesis, I focused on assessing a behavioral trait and its association with physiological stress, for which I studied the exploratory behavior and the adrenocortical response (blood glucocorticoid concentrations) in a population of *Z. capensis* located in an Andes’ foothill of Santiago’s metropolitan area. There were significant seasonal effects and protocol design on glucocorticoid concentrations. Seasonal differences could be related with behavioral modifications in exploratory tendency. This study also proposes that in integrative research, behavioral assessment should be carried out right after taking samples for stress analysis, and that exploratory behavior should be used as a comparative trait between treatments or populations, in studies with a homogenous protocol.

## Resumen

Cuando los animales son sometidos a eventos de estrés, pueden generar diferentes respuestas adaptativas que permiten mantener la homeostasis de los sistemas esenciales para la vida. Este proceso se conoce como alostasis, y cuenta con algunos mediadores importantes, como por ejemplo, los glucocorticoides. Se ha observado que cuando el costo de mantener la homeostasis (i.e., carga alostática) incrementa como resultado de algún evento de estrés predecible (e.g., cambios estacionales) o impredecible (e.g., tormentas y desastres naturales), los niveles de glucocorticoides también aumentan, impulsando diferentes estados de emergencia en los organismos. Por otro lado, investigaciones previas indican que la producción de glucocorticoides podría regular el fenotipo conductual para aumentar las probabilidades de sobrevivencia del organismo en situaciones de estrés. En el presente estudio caracterizamos la conducta exploratoria y la respuesta adrenocortical de *Z. capensis* de una población precordillerana de la Región Metropolitana de Santiago. El análisis de glucocorticoides reveló que la estacionalidad tiene un efecto significativo en las poblaciones de chincol. Estas diferencias podrían estar relacionadas con los cambios conductuales en exploración. En investigaciones integrativas que incluyen evaluaciones de stress fisiológico de corto plazo, las muestras para estos fines deben ser obtenidas previamente a todas las demás evaluaciones experimentales, y las variables conductuales deben ser utilizadas para comparar entre tratamientos y/o poblaciones, en estudios con un protocolo similar.

## 1. Introducción

Los animales son capaces de generar diferentes tipos de respuestas que incluyen tanto la capacidad de anticipar los cambios ambientales, lo que eventualmente permite asumir de forma anticipada un determinado estado a lo largo de la historia de vida (e.g. cambios estacionales que impulsan la migración y/o la hibernación), como también la capacidad de cambiar en respuesta a un evento impredecible (e.g. conflictos en las jerarquías sociales, la competencia por un recurso, influencia de tormentas y desastres naturales, entre otros) (Creel. S., 2001; Wingfield & Hunt., 2002). Estos dos tipos de respuestas son descritas bajo el proceso denominado “alostasis”, que consiste en mantener la homeostasis de los sistemas esenciales del organismo (e.g., pH, temperatura corporal, niveles de glucosa y tensión de oxígeno) a través de modificaciones en ciertos mediadores (e.g., hormonas adrenales, neurotransmisores, citoquinas del sistema inmune, entre otros) (Koob & LeMoal., 2001). Cuando estos mediadores alostáticos son secretados con demasiada frecuencia o son administrados de forma ineficiente, pueden llevar al desgaste del individuo (McEwen., 1998; McEwen & Wingfield., 2003).

Entre los sistemas fisiológicos que responden al estrés, el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) es uno de los más importantes (Boonstra., 2004; Sapolsky *et al.*, 2000; Wingfield & Romero., 2000). En el eje HPA se produce la secreción de los glucocorticoides (GCs), mediador alostático que regula varios aspectos de la fisiología y del comportamiento de vertebrados. Wingfield en 1998 sugirió que la información del

medio ambiente, que regula los ciclos de vida, podría estar determinada por la secreción hormonal de una vía fisiológica (e.g., GCs), que en términos energéticos, funcionaría igual para todos los organismos. Bajo esta idea aparece el término “carga alostatica”, que hace alusión a la demanda energética del individuo (Wingfield, 2005).

Cuando ocurre una perturbación (e.g., tormentas), la carga alostatica del organismo se eleva por sobre la energía disponible en el medio ambiente, esto provoca un aumento en la secreción de GCs, que puede impulsar estados de emergencia que incluyen supresión de la reproducción, incremento de la gluconeogénesis y la aparición de algunas conductas de escape o de refugio que buscan aumentar la probabilidad de sobrevivencia del organismo (Wingfield & Ramenofsky, 1999; Sapolsky *et al.*, 2000; Dhabhar, 2002; Wingfield, 2003) y en consecuencia disminuir la carga alostática (Goyman & Wingfield, 2004; McEwen & Wingfield, 2003). Sin embargo, cuando los eventos de estrés son permanentes, existe una sobrecarga que se mantiene en el tiempo. En este escenario, bajo condiciones no ideales, la demanda energética permanece muy por encima de la energía disponible en el medio (e.g., escases de alimento). Esto puede iniciar un aumento crónico de las concentraciones de glucocorticoides y provocar la inhibición del sistema reproductivo, distrofia muscular, reducción de la función inmune, reducción de las tasas de crecimiento, degradación de proteínas (pérdida de la musculatura), daños neurológicos, llegando incluso a la muerte del individuo (Sapolsky, 1993; Sapolsky *et al.*, 2000; Wingfield & Romero, 2000; Romero., 2004).

Los estados de emergencia de la historia de vida regulados por los niveles de GCs pueden dividirse en 4 componentes principales que no son excluyentes: a) Combate o

escape, conductas que puede ser desencadenada por un depredador o el ataque de un conoespecifico, b) Estrategias de confrontación, también llamada personalidad animal, las cuales corresponden a un conjunto de conductas correlacionadas entre ellas así como al estrés psicosocial, C) Conductas desencadenadas por enfermedades, componente impulsado en respuesta a lesiones y/o infecciones y d) Conductas facultativas junto con estrategias fisiológicas que permiten enfrentar periodos largos de estrés (Wingfield, 2005). Establecer el vínculo entre estos cambios conductuales, las condiciones ambientales y los sucesos reproductivos es clave para determinar las condiciones en las cuales los individuos son capaces de alterar su comportamiento y saber si en efecto esta plasticidad es adaptativa (Williams, 2013; Artman, Sutherland, & Downhower, 2001).

En respuesta a variaciones ambientales, muchos organismos muestran plasticidad fenotípica (Pligliucci 2005; Hendry, Farrugia, & Kinnison 2008; Chevin & Lande 2011) en el espacio ocupado (e.g., Kolowski & Holekamp 2009) o en el tiempo destinado a explorar (e.g., Rode, Farley, Fortin & Robins 2006; Slabbekoorn & Ripmeester 2008;). Estas modificaciones podrían depender tanto de la demandas internas y externas del organismo (i.e., carga alostática) como también de los mecanismos fisiológicos subyacentes (Réale *et al.*, 2007), que bajo diferentes condiciones ambientales, pueden favorecer ciertos rasgos del fenotipo para aumentar la adecuación biológica (Love & Williams 2008; Angelier & Chastel 2009). Desde esta mirada, cabe preguntarse cómo los niveles de corticosterona pueden estar regulando el compromiso entre los rasgos de la historia de vida, los genes y el medio ambiente. Para esclarecer esta relación, algunas investigaciones han mostrado que los niveles de corticosterona y el fenotipo de un

individuo, rasgos inter-poblacionales e intra-poblacionales, varían en grados de plasticidad dependiendo de la especie y contexto ambiental (e.g., Quispe *et al.* 2009, van Dongen *et al.* 2010, Dingemanse *et al.*, 2002, Koolhaas *et al.* 1999, Korte *et al.* 2005, Lendvai *et al.* 2011). Sin embargo, los métodos de estudio utilizados (e.g., experimentos de campo abierto o de ambientes nuevos, análisis de la inmovilidad tónica, utilizando pruebas de aproximación por humanos y otros que buscan medir las conductas exploratorias; véase e.g., Martins *et al.*, 2007; Dingemanse & Goede., 2004; Jonas 1996; Koolhaas *et al.*, 1999; Cockrem 2007) han sido incapaces de evaluar el grado de plasticidad dentro y entre contextos conductuales (e.g., forrajeo, canto, cuidado parental en diferentes épocas de la historia de vida) ya que no consideran los aspectos multivariados del comportamiento y/o de las respuestas fisiológicas.

Según lo anterior, la mayoría de las investigaciones que se han llevado a cabo en esta área han manipulado las concentraciones de corticosterona en el individuo (e.g., implantes o ingesta de hormonas, Lohmus *et al.* 2006; Breuner *et al.* 1998). Por otro lado, los pocos estudios que han conseguido evaluar la respuesta al estrés y los tipos de conductas lo han hecho con animales en cautiverio (véase Silverin 1998; Lynn *et al.* 2003; Stowe *et al.*, 2010). Esto es un factor relevante si consideramos que el medio ambiente, puede tener efectos en los diferentes niveles del fenotipo de un individuo (i.e., rasgos genéticos, rasgos neuroendocrinos, rasgos morfológicos, rasgos conductuales y rasgos funcionales.) (Henderson, 1990; Wagner, 1996; Reale *et al.*, 2007). Por esta razón, para evitar este sesgo, en el presente trabajo se propone estudiar la conducta y estrés de captura en los individuos de vida libre de la especie *Zonotrichia capensis*, con

el fin de estudiar un protocolo que permita analizar los rasgos conductuales y la respuesta adrenocortical en vida libre, de manera homogénea. Idealmente, un protocolo de campo adecuado debería permitir evaluar la conducta y estrés fisiológico con una mínima influencia sobre los animales, en particular considerando que el protocolo de captura y manipulación desarrollado por Wingfield (véase Wingfield 1994) involucra tomas de muestras de sangre a distintos tiempos en animales silvestres con el fin de evaluar la sensibilidad y respuesta del eje HPA frente a un cuadro de estrés (Wingfield, 1983). Sin embargo, en animales de vida libre, no existe un protocolo estandarizado que involucre evaluaciones de campo de conducta y estrés en un mismo diseño experimental.

En primera instancia, se podría suponer que el procedimiento realizado para medir estrés (i.e., punción de la vena alar; véase metodología) podría afectar la conducta. Sin embargo, debemos recordar que el solo hecho de capturar y manipular al individuo (antes de las extracciones de sangre) constituye un evento estresante (véase e.g., Wingfield, 1994). Por lo tanto, aplicando el mismo diseño experimental para las estaciones reproductivas y no reproductivas, se puede evaluar cómo cambia la conducta exploratoria frente al mismo factor de estrés y observar si existe alguna relación con la respuesta adrenocortical. Un protocolo adecuado para este tipo de investigaciones, sería una contribución relevante en estudios comportamentales, fisiológicos y con fines de conservación y manejo de especies silvestres. En esta tesis se propone comparar dos protocolos con diferenciación temporal de las evaluaciones fisiológicas sobre estrés y comportamentales, con el fin de proponer un protocolo homogéneo para estudios futuros.

## 1.1 *Hipótesis*

En este trabajo se plantean las siguientes hipótesis:

- I. Si la extracción de sangre afecta el comportamiento, se debería observar que las conductas de exploración de los individuos de *Zonotrichia capensis*, mostrarán diferencias según el orden cronológico en el cual se aplican los procedimientos (secuencia (i) protocolo de estrés – conducta exploratoria, en comparación a secuencia (ii) conducta exploratoria – protocolo de estrés).
- II. Los niveles de glucocorticoides en época reproductiva serán más altos que los niveles analizados en la época no reproductiva. Si la conducta exploratoria está relacionada con la respuesta adrenocortical, entonces el fenotipo conductual de los individuos también presentará diferencias significativas entre estaciones.

## 1.2 *Objetivos*

### 1.2.1 *Objetivo general*

Evaluar si el estudio fisiológico del estrés afecta el estudio del comportamiento en un mismo conjunto de animales, y a su vez evaluar como este análisis comportamental interviene en la respuesta adrenocortical.

### 1.2.2 *Objetivos específicos*

- a) Describir cómo cambian los niveles de corticosterona bajo el protocolo de estrés de captura y manipulación cuando este protocolo se realiza (i) antes y (ii) después del experimento conductual.
- b) Describir la conducta exploratoria cuando los experimentos son realizados antes y después del protocolo de estrés.
- c) Comparar la respuesta adrenocortical entre estaciones (reproductivas y no-reproductiva).
- d) Comparar la conducta de exploración entre estaciones (reproductivas y no-reproductiva).

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Sitio de estudio

Los ejemplares fueron capturados dentro de las zonas resguardada por la “Asociación Parque Cordillera”, en las localidades de Cantalao (33°27'45” S; 70° 30'40” O; 978 m s.n.m.), y Aguas de Ramón (33° 26' 00.90” S; 70° 31' 06.76 O; 835 m s.n.m), ambos sitios están separados por 3 km, por lo cual constituyen una única población ecológica.

La pre cordillera de Santiago forman parte de Chile Central, zona con un tipo de clima mediterráneo (di Castri & Hajek, 1976) con una marcada estacionalidad tanto en las temperaturas como en las precipitaciones. De acuerdo a Gajardo (1994), la vegetación del pie de monte de Santiago corresponde a las formaciones denominadas matorral esclerófilo andino y bosque esclerófilo de la precordillera andina. A su vez, estas formaciones pertenecen respectivamente a las regiones ecológicas de la estepa alto andina y del matorral y bosque esclerófilo, respectivamente.

## 2.2 Captura

Cincuenta y seis ejemplares de la especie fueron estudiados durante el año 2011, Veintinueve en época no reproductiva (Abril- Mayo, 20 machos y 9 hembras) y veintiséis en época reproductiva (Agosto- Octubre, 23 machos y 3 hembras). Los chincoles fueron capturados utilizando redes nieblas y atracción con emisión de grabaciones de con-específicos.

## 2.3 Diseño experimental

Luego de las capturas, aleatoriamente los individuos fueron sometidos a dos tratamientos (véase Tabla 1).

**Tabla 1.** Tratamientos experimentales según época reproductiva y no-reproductiva. Grupo A: Individuos sometidos al protocolo de estrés y luego al experimento de exploración (N=29). Grupo B: Individuos sometidos primeramente al experimento de exploración y luego al protocolo de estrés (N= 26).

Época	Grupo A	Grupo B
Reproductiva (Abril-Mayo)	N= 12	N= 14
No Reproductiva (Agosto- Septiembre)	N= 17	N= 12

### 2.3.1 Grupo A

A todos los animales de este grupo se les aplicó la secuencia de evaluación, con la extracción de muestras para evaluación de stress primero (protocolo de estrés), para luego proceder al experimento de evaluación conductual (experimento de exploración).

#### Protocolo de estrés:

Para determinar la sensibilidad adrenocortical, después de la captura, una primera muestra de sangre fue tomada dentro de los 3 primeros minutos puncionando la vena alar con una aguja y colectando entre 40 y 70  $\mu$ l de sangre en microtubos heparinizados para tener una medida del nivel de circulación basal de la hormona. La concentración de corticosterona sanguínea aumenta luego de algunos minutos bajo condiciones de estrés, por lo cual, numerosos estudios hasta la fecha indican que dentro de los 3 primeros minutos después de la captura la concentración es representativa de la concentración basal (véase Wingfield, Smith & Farner, 1982; Kitaysky, Wingfield & Piatt, 1999). Terminada la primera extracción, las aves fueron colocadas en bolsas de género y sacadas nuevamente a los 15 y 30 minutos siguientes para repetir el procedimiento. Finalmente, luego de 5 minutos, el espécimen fue ingresado a la jaula de exploración.

#### Experimento de exploración:

Para caracterizar la conducta exploratoria, se utilizó un aviario experimental (270 cm de longitud x 150 cm de ancho x 150 cm de alto). Al terminar el protocolo de extracción de sangre, los animales ingresaron al aviario y fueron ubicados en una pequeña jaula de aclimatación (20 x 30 cm) ubicada en una esquina del aviario.

Luego de 5 minutos la lona que cubre la jaula de aclimatación, fue retirada para registrar durante otros 10 minutos las conductas del individuo. Las conductas fueron grabadas por el observador. (Grabadora Olympus modelo VN-960PC) (véase figura 1).

### *2.3.2 Grupo B*

Este grupo siguió una secuencia inversa al grupo A, es decir, primero se les realizó el experimento conductual (experimento de exploración), luego del cual, se realizó el protocolo de toma de muestras de sangre para evaluar estrés.

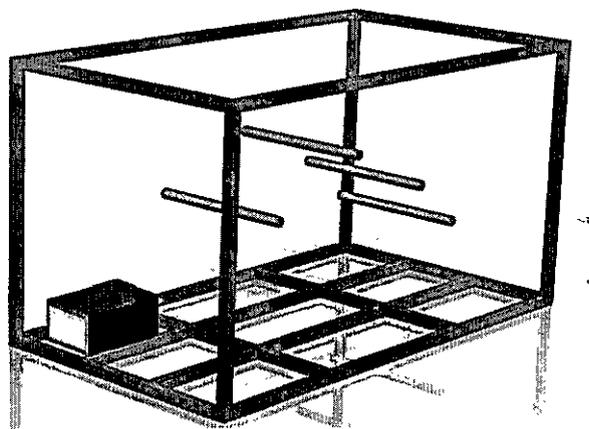
#### Experimento de exploración:

Luego de ser capturadas con redes niebla, las aves inmediatamente fueron trasladadas al aviario (270 cm de longitud x 150 cm de ancho x 150 cm de alto). Todos los animales tuvieron 5 minutos de aclimatación en una jaula cubierta dentro del aviario experimental. Al finalizar la aclimatación, durante 10 minutos, las conductas fueron grabadas por el observador (grabadora Olympus modelo VN-960PC).

#### Protocolo de estrés:

Cinco minutos después del experimento de exploración, utilizando el mismo procedimiento del grupo A, se obtuvieron tres muestras de sangre (i.e., 0-3, 15 y 30 minutos).

Es importante destacar que el protocolo de estrés, en la mayoría de las especies estudiadas hasta la fecha, no ha debilitado a las aves en ningún aspecto, razón por la cual es una herramienta muy eficaz para monitorear y evaluar las respuestas de estrés en poblaciones de vida libre (Wingfield, 1994; Wingfield & Ramenofsky, 1999).



**Figura 1.** Aviario para evaluación de conducta exploratoria. La jaula se encuentra provista de 5 paredes y 4 perchas. Para registrar la posición del individuo, el suelo se dividió en 9 cuadrantes.

#### *2.4 Análisis de corticosterona*

Los micro-tubos con las muestras de sangre fueron centrifugados (9000 g durante 5 min) dentro de las primeras 6 horas de extracción para separar los diferentes componentes sanguíneos. Con una jeringa de 100  $\mu$ l se extrajo el plasma y se almacenó en tubos Eppendorf, los cuales luego de ser etiquetados se refrigeraron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Una vez finalizado el trabajo de campo, las muestras fueron enviadas en un contenedor con hielo seco a la Universidad de California, Davis, Estados Unidos, al laboratorio del Dr. John C. Wingfield, lugar en donde se llevaron a cabo los radioensayos para determinar las concentraciones plasmáticas de la hormona glucocorticosterona.

## 2.5 Análisis conductual

Las grabaciones de audio sobre el registro conductual de los animales obtenidas en el aviario fueron analizadas con el programa JWatcher V.1.0 (Macquarie University and UCLA, Australia), el cual permitió obtener la frecuencia y duración de las conductas registradas. Para el análisis, las siguientes variables dependientes fueron consideradas:

-Latencia: Tiempo que tarda el individuo en entrar al aviario experimental desde el sector de aclimatación.

-Frecuencia relativa: Número de veces que el individuo salta, vuela y utiliza las perchas en relación al total de conductas realizadas.

-Tiempo relativo: Tiempo que el individuo invierte en las conductas de movimiento y observación (i.e., saltar, volar y percharse) en relación al tiempo total del experimento (i.e., 10 minutos). Dado que el salto es una conducta discreta registrada a partir de la frecuencia, para calcular el tiempo se utilizó un factor de conversión estándar, el cual corresponde 301 ms/salto. Esto es el tiempo que invierte el individuo por cada salto realizado

-Diversidad de exploración: Número de veces que visita cada cuadrante, pared o percha, obtenido con el índice de diversidad de Shannon (véase Midermann *et al.* 2009, Van Dongen *et al.* 2010).



## 2.6 Determinación del sexo

Considerando que *Z. capensis* no presenta dimorfismo sexual aparente, y dado que las características asociadas al desarrollo de la cloaca en machos solamente se presenta en época reproductiva, fue necesario complementar el sexado utilizando técnicas moleculares. Este procedimiento se realizó en el laboratorio de Ecología Molecular de la Universidad de Chile a cargo de la tesista de doctorado Yanina Poblete y del Dr. Elie Poulin. Para la extracción de ADN desde las tarjetas FTA, se utilizó un kit de extracción marca QIAGEN (Inc., Valencia, CA). Luego, con cadenas de polimerasa (PCR), se amplificó el gen CHD-W (único en hembras) y CHD-Z (en ambos sexos). Los partidores utilizados fueron P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') y P8 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3') descritos por Griffith (1998). La reacción de PCR consistió en un volumen de 20  $\mu$ l con 20 a 100 ng de ADN, en un mix que contenía 2  $\mu$ l de Buffer - 1,5  $\mu$ l de MgCl - 0,8  $\mu$ l de cada partidador - 0,8  $\mu$ l de Dntps - 10,8  $\mu$ l de agua MILIQ y 0,3  $\mu$ l de Ampli Taq (Invitrogen, Brasil). Los ciclos de reacciones en el termociclador consistieron en una etapa de activación de la polimerasa de 2 minutos a 95°C, 10 ciclos de 94°C por 30 segundos, 61°C por 30 segundos (temperatura de activación), 72°C por 30 segundos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 1 ciclo de 72°C por 4 minutos y 25°C por 5 minutos y una etapa de extensión final de 4°C por 10 segundos. Los fragmentos de ADN obtenidos después de los ensayos de PCR fueron cuantificados por comparación utilizando un marcador de ADN a través de electroforesis en gel de agarosa al 2%.

## *2.7 Análisis estadístico*

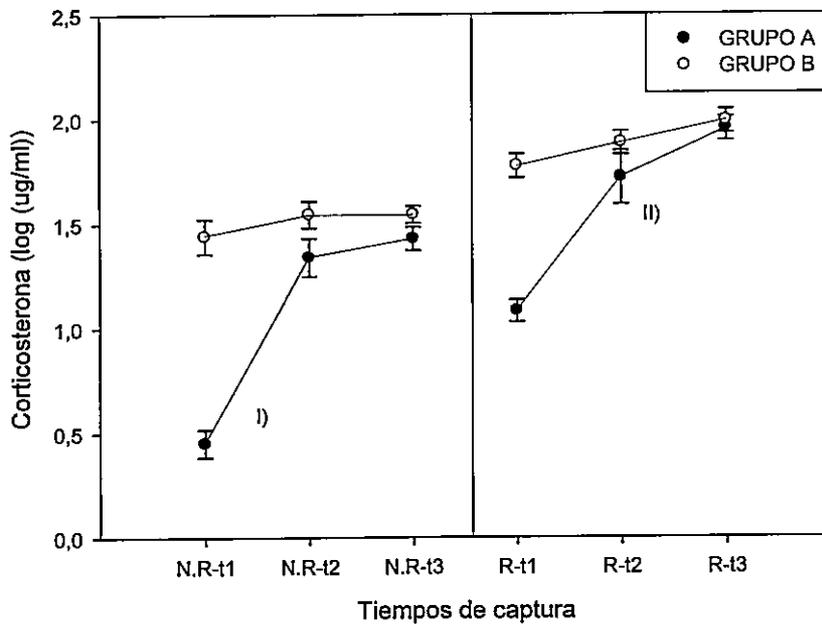
Para realizar los análisis estadísticos se utilizó el software *statistica 7*. A todos los datos se les realizó pruebas de normalidad (i.e., test de Kolmogorov Smirnov & Shapiro-Wilks) y de homogeneidad de varianza (i.e., test de Levene). Cuando una variable no presentaba distribución normal, los datos fueron transformados y normalizados (utilizando transformaciones como,  $\sqrt{X}$  o logaritmo natural) con el fin de seguir utilizando la estadística paramétrica y modelos lineales (GLM). En los casos en que la prueba estadística correspondía a un análisis de varianza de medidas repetidas, los datos además fueron evaluados para el supuesto de esfericidad.

Para evaluar el efecto global entre el comportamiento y los niveles de corticosterona, se utilizaron *Andevs* multivariados (MANOVA). Estos incluyeron las variables conductuales, los niveles basales de corticosterona (i.e., concentración registrada en la primera extracción de sangre, t1) y los niveles integrados de corticosterona, que corresponden al delta entre las concentraciones de estrés inducido (t2 y t3) y las concentraciones basales (t1).

### 3. Resultados

#### 3.1 Corticosterona

Los niveles de corticosterona se vieron afectados significativamente por la estación y los grupos experimentales (véase figura 2). Dentro de este análisis el sexo no tuvo efecto en los tratamientos (Andeva, sexo:  $F=0,0059$ ;  $gl=1$ ;  $p=0,94$ ).



**Figura 2.** Concentraciones de corticosterona (media  $\pm$  E.E; ug/ml) en función del tiempo de captura (t1: 0-3 min, t2: 15 min, t3: 30 min). I) Curva de estrés durante la época no-reproductiva (N.R-), II) Curva de estrés durante la época reproductiva (R-). A y B corresponde al tipo de tratamiento realizado por los individuos.

### Efecto de la estación en la respuesta al estrés

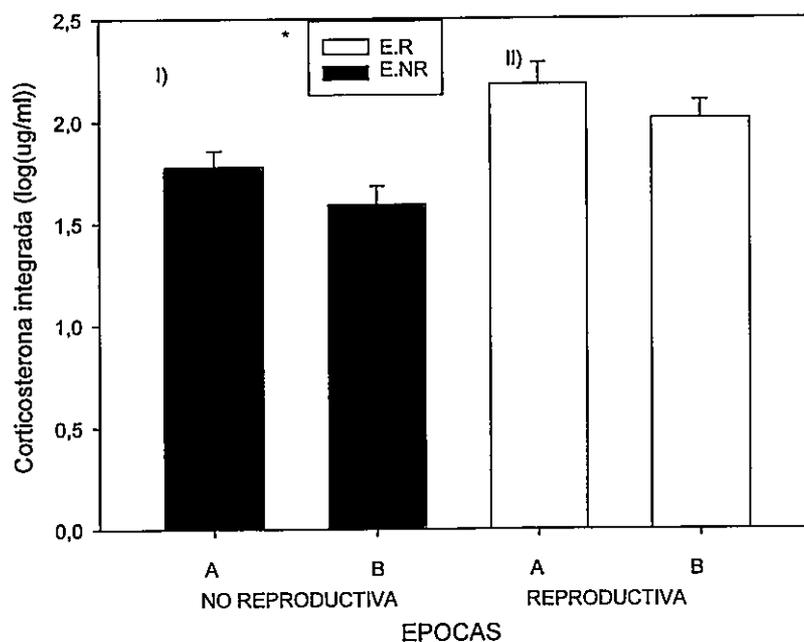
Aunque no hubo diferencias en la respuesta adrenocortical de los individuos (Andeva de medida repetidas; tiempo\*época:  $F=1,23$ ;  $gl=2$ ;  $p>0,296$ ), los niveles de corticosterona fueron significativamente diferentes entre estaciones (Andeva de medidas repetidas; época:  $F=83,64$ ;  $gl=1$ ;  $p<0,00001$ ). El grupo A, sometido al protocolo de estrés y posteriormente al experimento de exploración, presentó mayores concentraciones durante la época reproductiva. Por otro lado, el nivel de corticosterona del grupo B, sometido al experimento de exploración y posteriormente al protocolo de estrés, fue mayor en época reproductiva, solo a los 30 minutos del experimento (test de Tukey,  $p<0,05$ ) ( véase figura. 2).

### Efecto de los tratamientos en la respuesta al estrés

El orden temporal de tratamientos experimentales tuvo un efecto significativo sobre la respuesta adrenocortical al estrés (Andeva de medidas repetidas; tiempo\*grupo;  $F=74,05$ ;  $gl=2$ ;  $p<0,00001$ ). Luego de transcurrir el tiempo de captura, los individuos del grupo A presentaron un aumento significativo de las concentraciones de corticosterona. Por el contrario, el grupo B presentó un nivel de estrés sostenido que estuvo muy por encima de la concentración basal (test de Tukey,  $p<0,001$ ) (véase figura 2).

### Nivel integrado de corticosterona

Al analizar la corticosterona integrada (i.e., nivel de circulación en t2 y t3), es posible observar como los individuos presentaron concentraciones mayores durante la época de apareamiento (Andeva:  $F=20,094$ ;  $gl=1$ ;  $p<0,0001$ ) (véase figura 3). Esta diferencia no se encontró entre los grupos (Andeva:  $F=3,68$ ;  $gl=1$ ;  $p=0,06$ ), ni entre los sexos (Andeva:  $F=0,62$ ;  $gl=1$ ;  $p=0,43$ ).



**Figura 3.** Niveles de corticosterona integrada (media  $\pm$  E.E. ug/ml). El Andeva comparó los niveles de corticosterona integrada entre estaciones (i.e., E.NR= Época No reproductiva, rectángulo negro; E.R = Época reproductiva, rectángulo blanco) y entre grupos (i.e., A y B). Un asterisco (\*) indica diferencias significativas entre épocas. Dos asteriscos (\*\*) indican diferencias significativas entre épocas y grupos

### 3.2 Respuesta conductual en relación a los niveles de corticosterona

#### Análisis multivariado de la frecuencia relativa

Al analizar la frecuencia relativa de las conductas de exploración (i.e., frecuencia de salto, perchado y vuelo) asociada a los niveles basales y lo niveles de estrés integrado, es posible notar un efecto global de las épocas (i.e. Reproductiva y No Reproductiva) y los grupos (véase tabla 2). Dentro de este análisis, el sexo no tuvo efecto significativo (Andeva, sexo: Wilks=0,82; F=1,90; gl=5; p=0,11).

**Tabla 2.** MANOVA de los efectos de la Época, los tratamientos (i.e., Grupo A y B) y su interacción en el estrés y la frecuencia de las conductas.

EFEECTO	Wilks' Lambda	F	gl	P
EPOCA	0,457405	12,75	4	0,000001
GRUPO	0,226230	36,77	4	0,000001
EPOCA*GRUPO	0,788141	2,89	4	0,033241

#### Análisis univariado de la frecuencia relativa de cada conducta

Salto:

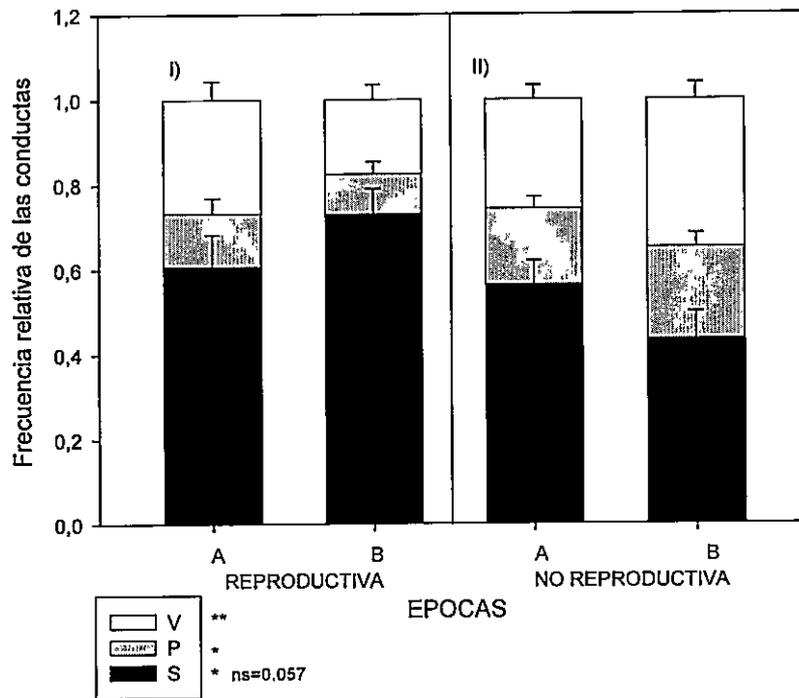
Los individuos capturados en época de apareamiento utilizaron la conducta de salto un 18% más que sus conespecíficos en estación no reproductiva (Andeva, época: F=6,8; gl=1; p<0,05). Por otro lado, aun cuando el efecto es marginal (Andeva, época\*Grupo: F=3,8; gl=1 p= 0,057), es posible notar que los individuos del grupo B presentan menores porcentajes de saltos en la estación no reproductiva, en relación a los individuos del grupo A (véase figura 4).

#### Vuelo:

En época no reproductiva los individuos presentaron mayores frecuencias de vuelo (Andeva, época:  $F=4,6$ ;  $gl= 1$ ;  $p < 0,05$ ). Estas diferencias se generan principalmente por los animales del grupo B, quienes volaron 17% más (Andeva, época\*grupo:  $F= 5,9$ ;  $gl= 1$ ;  $p<0,05$ ; Tukey  $p<0,005$ ) que los individuos capturados en época reproductiva (véase figura 4).

#### Perchado:

Los chincoles utilizaron las perchas 8,8% más en la estación no reproductiva (Andeva, época:  $F=10,33$ ;  $gl=1$ ;  $p<0,005$ ). (véase figura 4)



**Figura 4** Frecuencia relativa de las conductas (Media  $\pm$  E.E). El Andeva comparó las conductas de vuelo (V); Perchado (P) y Salto (S) entre estaciones (i.e. I Época reproductiva; II Época no reproductiva) y entre grupos (i.e. A y B). Un asterisco (\*) indica diferencias significativas entre épocas. Dos asteriscos (\*\*) indican diferencias significativas entre épocas y grupos.

### Análisis multivariado del tiempo relativo

Al analizar el tiempo relativo de las conductas de exploración (i.e., tiempo de salto, perchado y vuelo) asociada a los niveles basales y lo niveles de estrés integrado, es posible notar un efecto global de las épocas (i.e., Reproductiva y No Reproductiva) y los grupos (véase tabla 3). Dentro de este análisis, el sexo no tuvo efecto significativo (Andeva, sexo: Wilks =0,81; F=1,99; gl=5; p=0,09).

**Tabla 3.** MANOVA de los efectos de la Época, los tratamientos (i.e., Grupo A y B) y su interacción en el estrés y el tiempo de las conductas.

EFECTO	Wilks' Lambda	F	df	P
EPOCA	0,413195	15,2668	4	< 0,000001
GRUPO	0,205197	41,6386	4	< 0,000001
EPOCA*GRUPO	0,736009	3,8558	4	< 0,000001

### Análisis univariado del tiempo relativo de cada conducta

#### Salto

En la figura 5 es posible observar diferencias marginalmente significativas (Andeva, época: F=3,8; gl=1; p=0,057). El tiempo de salto utilizado por los individuos capturados en época de apareamiento fue en promedio 3% más que en época no reproductiva. El grupo no tuvo un efecto significativo (Andeva, época: F=3,78; gl=1; p=0,95)

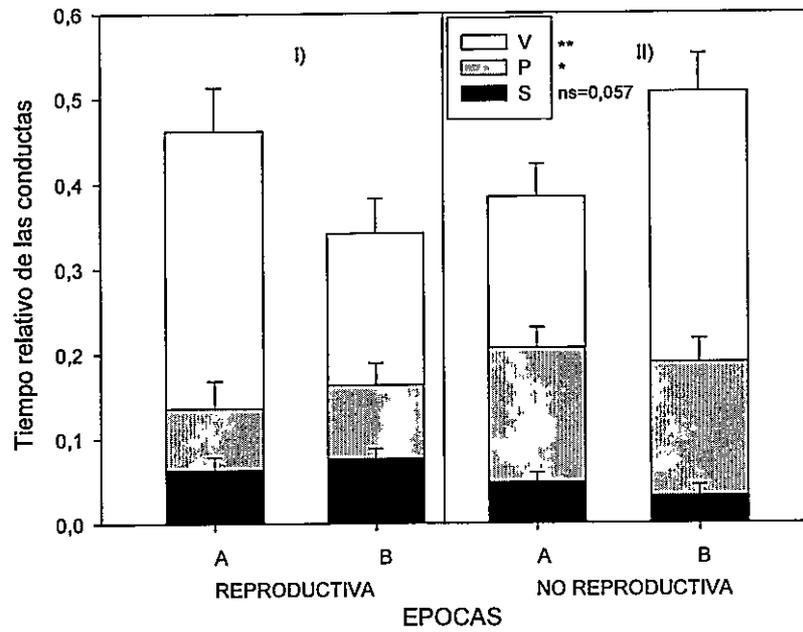


## Vuelo

La época y el grupo tuvieron un efecto significativo en el tiempo de vuelo (Andeva, época\* grupo:  $F=10,5$ ;  $gl=1$   $p<0,005$ ). Los individuos del grupo B, si bien con diferencias marginalmente significativas (Tukey,  $p = 0,07$ ), registraron menores tiempos durante la estación reproductiva.

## Perchado:

Durante la época no reproductiva, los chincoles permanecieron perchados 7,8% veces más que en época reproductiva (Andeva, época:  $F=11,1$ ;  $gl=1$ ;  $p<0,008$ ). El grupo no tuvo un efecto significativo sobre esta conducta (Andeva, grupo:  $F=0,001$ ;  $gl=1$ ;  $p = 0,97$ )



**Figura 5** Tiempo relativo de las conductas (Media  $\pm$  E.E). El Andeva comparó las conductas de vuelo (V); Perchado (P) y Salto (S) entre estaciones (i.e. I = Época reproductiva; II = Época no reproductiva) y entre grupos (i.e., A y B). Un asterisco (\*) indica diferencias significativas entre épocas. Dos asteriscos (\*\*) indican diferencias significativas entre épocas y grupos.

### Análisis multivariado de la diversidad

Al analizar la diversidad en la utilización del espacio de la jaula experimental (i.e, índice de Shannon, véase metodología), asociada a los niveles basales y lo niveles de estrés integrado, es posible notar un efecto global de las épocas (i.e., Reproductiva y No Reproductiva) y los grupos (véase tabla 4). Dentro de este análisis, el sexo no tuvo efecto significativo (Andeva, sexo: Wilks = 0,81; F=1,99; gl= 5; p=0,09).

**Tabla 4.** MANOVA de los efectos de la Época, los tratamientos (i.e. Grupo A y B) y su interacción en el estrés y la diversidad.

EFEECTO	Wilks' Lambda	F	gf	P
EPOCA	0,385635	22,835	3	P<0,00001
GRUPO	0,232110	47,419	3	P<0,00001
EPOCA*GRUPO	0,882237	1,913	3	0,141719

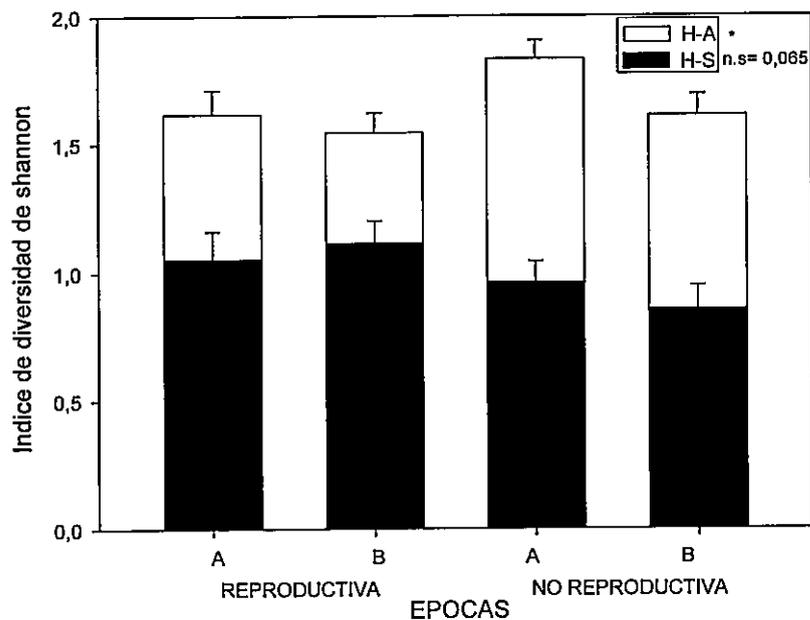
### Análisis univariado de la diversidad

Espacio utilizado sobre el suelo:

Si analizamos el espacio utilizado sobre el suelo, es posible observar que durante la época no reproductiva, ocuparon una mayor cantidad de zonas de perchado (Andeva, época: F=14,8; gl=1, p<0,0005). (véase figura 6, H-A)

Espacio utilizado en el suelo:

Si bien con una diferencia estadística marginal (Andeva, época:  $F=3,55$ ;  $gl=1$ ,  $p=0,065$ ), los individuos de la época de apareamiento visitaron una mayor cantidad de cuadrantes dentro de la arena experimental (véase fig. 6, H-S).



**Figura 6.** Diversidad del espacio ocupado (Media  $\pm$  EE). H-A: Diversidad en la utilización del espacio sobre el suelo del aviario, H-S: Diversidad en la utilización del espacio en el suelo del aviario. El Andeva comparó las conductas entre estaciones (i.e. E.R: Época reproductiva; E.NR: Época no reproductiva) entre grupos (i.e., A y B). Un asterisco (\*) indica diferencias significativas entre épocas. Dos asteriscos (\*\*) indican diferencias significativas entre épocas y grupos.

## 4. Discusión

### 4.1 Efecto de la época en la Respuesta adrenocortical

En nuestro estudio la época tuvo un efecto significativo en los niveles de corticosterona. Tanto los niveles basales de las muestras colectadas inmediatamente después de la captura (i.e., Grupo A, 0-3 min), como los niveles de estrés inducido (i.e., Grupo A, protocolo de estrés-experimento de exploración, 15-30 min; Grupo B, experimento de exploración-protocolo de estrés, 0-30 min) y el nivel integrado de corticosterona (véase figura 3), presentaron mayores concentraciones de la hormona en época reproductiva. Si consideramos que el proceso de apareamiento es un periodo de alta demanda energética, sobre todo por el estrés que producen el cuidado parental (Brock 1991; Wingfield *et al.*, 1995; Bókony *et al* 2009) y los conflictos sociales (Wingfield and Ramenofsky, 1999), es razonable pensar que existan mecanismos de regulación para evitar altos niveles de glucocorticoides, los cuales producen un incremento de la gluconeogenesis, supresión del sistema inmune, pérdida de masa muscular, mal funcionamiento de células neuronales, y aparición de conductas de escape, entre otros, que pueden llegar a interrumpir la reproducción (e.g., Wingfield & Ramenofsky, 1999; Sapolsky *et al.*, 2000; Wingfield & Romero, 2000; Dhabhar, 2002; Wingfield, 2003). Sin embargo, la evidencia indica que no existe un único mecanismo adaptativo para esta vía fisiológica. Por ejemplo, mientras que algunos trabajos entre poblaciones revelarían la existencia de mecanismos de supresión adrenocortical, los cuales estarían presentes en especies que

suelen reproducirse en ambientes extremos de altas latitudes (Silverin, 1997; O'Reilly & Wingfield, 2001; Wilson & Holberton, 2004), otras investigaciones en ambientes alpinos, habrían encontrado que algunas poblaciones de aves como *Zonotrichia capensis* y *Junco hyemalis*, no modificarían su respuesta adrenocortical (Gutiérrez 2012; Bear & Smith, 2003). Incluso, en este tipo de ambientes, existirían paseriformes como *Leucosticte lephrocotis* y *Zonotrichia leucophrys*, que por el contrario, serían capaces de aumentar sus concentraciones en épocas de apareamiento (Richardson & Wingfield, 2001, Unión Americana de Ornólogos, datos no publicados; Addis *et al.* 2011). Estas especies que migran altitudinalmente, durante perturbaciones ambientales (e.g., tormentas y/o eventos de depredación), pueden verse favorecidas con altas concentraciones de glucocorticoides, hormona que puede gatillar conductas de escape a zonas de baja altitud para aumentar las probabilidades de sobrevivencia (Silverin, 1986; Wingfield *et al.*, 1983; Wingfield & Ramenofsky, 1997; Wingfield & Silverin, 1986; Breuner *et al.*, 2003). Por lo tanto las investigaciones sugieren que los mecanismos de regulación adrenocortical se encuentran directamente relacionados tanto con la demanda energética propia del ciclo de vida del individuo, como también con la estabilidad del ambiente (e.g., radiación, velocidad del viento, duración de eventos reproductivos, disponibilidad de comida, temperaturas, precipitaciones entre otros). Estudios previos ya han sugerido que los niveles de corticosterona en la sangre podrían ser una herramienta útil para evaluar las condiciones fisiológicas del organismo y así evaluar la calidad del ambiente para los animales que viven en determinados nichos ecológicos (Marra & Holberton, 1999).

Desde un punto de vista teórico, estos mecanismos que regulan tanto aspectos fisiológicos como conductuales, pueden ser explicados bajo un nuevo concepto de estrés, la “alostasis”, es decir, la estabilidad del organismo a través del cambio (*sensu* Wingfield, 2005; McEwen & Wingfield, 2003). Si consideramos que las especies necesitan una cantidad finita de energía, entonces es posible distinguir ciertos requerimientos que permiten que los organismos funcionen y que a su vez encuentren, procesen y asimilen, el alimento en condiciones ideales. Cuando esta demanda básica de energía (i.e., carga alostatica) no es compensada por el ambiente, entonces se impulsan respuestas de emergencia reguladas por altos niveles de glucocorticoides, que buscan reducir la carga alostática y aumentar las probabilidades de sobrevivencia del organismo (Wingfield, 2005). Bajo este marco conceptual, nuestros resultados (véase figura 2 y 3) podrían estar directamente asociados a la estabilidad ambiental en la que viven las poblaciones precordilleranas de *Z. capensis* (i.e., clima mediterráneo y estaciones reproductivas largas), en donde no se justificaría un mecanismo de supresión adrenocortical que impida desistir del evento reproductivo frente a una perturbación (e.g., abandono del nido; véase Artman, Sutherland & Downhower 2001).

#### *4.2 Protocolo de estrés y experimentos de exploración*

Al observar la respuesta adrenocortical del grupo A (i.e., protocolo de estrés-experimento de exploración), notamos que las poblaciones de chincoles, luego de los 30 minutos de captura, alcanzan concentraciones máximas de corticosterona (véase figura 2), las cuales no difieren significativamente de los niveles sostenidos encontrados en el grupo B (experimento de exploración-protocolo de estrés). De igual forma, los

niveles integrados de corticosterona no presentaron diferencias significativas entre los grupos experimentales (véase figura 3), lo que implicaría que los máximos registrados en esta investigación, corresponden a la respuesta fisiológica real de la población frente a una situación de estrés que se sostiene en el tiempo (i.e., en vida libre). Caracterizar la respuesta adrenocortical es esencial para estudiar correctamente los efectos fisiológicos y conductuales que pueden tener los glucocorticoides en el organismo (McEwen & Wingfield 2003). Si observamos la curva de estrés (véase figura 2), podemos distinguir dos puntos que biológicamente corresponden a estados diferentes del individuo. Por un lado, tenemos las concentraciones basales que registran el estrés en vida libre del individuo (i.e., t1 del grupo A, protocolo de estrés-experimento de exploración en Figura 2), y por otro lado, tenemos niveles de estrés inducido, que dan cuenta de las fluctuaciones que sufren ciertos mediadores alostáticos (e.g., glucocorticoides) cuando el individuo es capturado y manipulado (i.e. t2 y t3 del grupo A, protocolo de estrés-experimento de exploración; t1,t2 y t3 del grupo B, experimento de exploración-protocolo de estrés).

La mayoría de las investigaciones en el área, se han enfocado en manipular artificialmente las concentraciones de corticosterona (Gray *et al* 1990; Pravosudov 2003; Martins *et al* 2007), con el objetivo de evaluar el comportamiento del individuo frente a una situación de estrés (e.g., forrajeo, exploración, respuesta a estímulos depredatorios, entre otros). Dicho procedimiento trae consigo problemas metodológicos a la hora de hacer una correcta interpretación de los resultados, ya que si bien, la implantación no afecta permanentemente al organismo, es posible identificar tres

problemas en el diseño: 1) El solo hecho de manipular al individuo provoca un incremento endógeno en los niveles de corticosterona, 2) Para evaluar el efecto que tiene el implante, es necesario esperar un par de horas, por ende el investigador no puede estudiar el efecto inmediato de la hormona, y 3) los implantes no pueden simular el funcionamiento del sistema endocrino, en otras palabras, los individuos implantados tendrán respuestas adrenocorticales diferentes que los individuos en vida libre (Breuner *et al* 1998; Lohmus *et al* 2006). Breuner *et al.* (1998) propuso un método alternativo y menos invasivo para evaluar el aumento de las concentraciones de corticosterona, el cual consiste en alimentar a los individuos con gusanos (*Tenebrio molitor*) inyectados ya con la hormona. Sin embargo, estudiar a los animales en cautiverio, es un sesgo por sí mismo, ya que los estados de emergencia de la historia de vida de un individuo (véase sección anterior), son complejos y posiblemente llevan consigo componentes fisiológicos (e.g., niveles de glucocorticoides) y conductuales (e.g., rasgos de la personalidad), que dificultan en gran medida el estudio de los organismos en ambientes no naturales (Wingfield *et al.* 2005; Korte *et al.* 2005).

De acuerdo a lo anterior, es posible sugerir que las conductas analizadas del grupo A (i.e., protocolo de estrés-experimento de exploración), pueden dar una señal de cómo los animales actúan en respuesta a una situación de estrés real, y ver si esta respuesta pudiese estar relacionada con los estados de emergencia que se desencadenan cuando la carga alostática se eleva y en consecuencia, los niveles de glucocorticoides aumentan (véase sección anterior). Por otro lado, las diferencias inherentes al ciclo de vida normal de los individuos, que se encuentra fisiológicamente representada por el nivel basal de

los glucocorticoides (i.e., primera medida del grupo A, protocolo de estrés-experimento de exploración), nos permite interpretar los resultados obtenidos del grupo B (i.e., experimento de exploración-protocolo de estrés). Así mismo, los 15 minutos de experimento conductual en el grupo B (i.e. experimento de exploración-protocolo de estrés), podrían dar una señal del comportamiento asociado al fenómeno de exploración de un animal silvestre, sobre todo porque algunos estudios han sugerido que el estrés viene acompañado de cambios conductuales y fisiológicos en tiempos muy acotados (e.g., Orchinik *et al*, 1991; Breuner *et al*, 1998; Lohmus *et al* 2006; Wingfield 2005).

Por lo tanto, investigaciones integrativas que incluyen evaluaciones de estrés fisiológico de corto plazo y análisis conductuales u otros, deberían focalizarse en tomar las muestras de sangre para estrés como primera etapa, y posteriormente realizar otras mediciones, ya sean conductuales o de otro tipo, enfocadas a capturar el comportamiento en situaciones de emergencia. Además, las comparaciones entre variables conductuales deberían ser utilizadas únicamente para comparar entre tratamientos y/o poblaciones, con un mismo diseño experimental, ya que el protocolo de evaluación de estrés podría afectar los resultados.

#### *4.3 Estrés y conducta*

Al igual que los aspectos fisiológicos estudiados (i.e., glucocorticoides), la relación entre las concentraciones de la hormona y las variables conductuales, también mostraron diferencias significativas (i.e., vuelo, salto y perchado, véase tabla 2 y 3). Estas pruebas fueron complementadas con análisis univariados, en donde si bien,

algunos tests *a posteriori* fueron marginalmente significativos. Estas diferencias podrían acentuarse con un tamaño muestral más grande, ya que el diseño en sí, implica subdividir los tratamientos y en consecuencia, disminuir el poder estadístico del análisis (i.e., aumentar error de tipo II). Por otro lado, dado que el salto es una conducta discreta, para calcular el tiempo relativo, los datos fueron transformados, para luego determinar el valor en relación al tiempo en el que transcurre el experimento (i.e., 10 minutos, véase Métodos), por lo cual las diferencias entre el número total de conductas realizadas (i.e., Nº de eventos), que varían entre individuos, y el tiempo estándar en el cual se pueden desarrollar las conductas (i.e., 10 minutos), podrían ser la causa de la discrepancia encontrada en los resultados para la frecuencia relativa (i.e., diferencias significativas, véase figura 3) y el tiempo relativo de la conducta de salto (i.e., diferencias marginalmente significativas, véase Figura 4). Aun así, los ejemplares del grupo B durante la época reproductiva, tuvieron conductas con tendencias al aumento (e.g., en salto) y conductas que decrecieron en tiempo y frecuencia (e.g., en vuelo y perchado).

Algunos estudios sugieren que el tiempo de reacción del individuo, en relación a los niveles de estrés, depende de dos mecanismos de acción, a) la actividad en los receptores neuronales de la membrana celular, los que regulan efectos de acción rápida, luego de unos pocos minutos (8-15 minutos), y b) la actividad en los receptores genómicos intracelulares, los que regulan efectos de acción lenta, luego de 30 minutos (véase Breuner *et al.*, 2003; Lohmus *et al.*, 2006). Por lo tanto, si queremos interpretar correctamente los resultados de exploración, es necesario considerar el fenotipo conductual observado. En trabajos previos, el incremento de glucocorticoides ha



impulsado un aumento en las conductas de salto (e.g., Breuner *et al.*, 1998) y en las conductas de forrajeo (e.g., Lohmus, 2006), actividades que estarían reguladas por receptores intracelulares (Landys *et al.*, 2004). De acuerdo a lo anterior, es posible que los chincoles del grupo B (i.e., experimento de exploración-protocolo de estrés) durante la época reproductiva, inviertan más tiempo en las conductas de salto con el fin de explorar el territorio y conseguir alimento que compense el gasto energético propio de la temporada (Pravosudov 2003). Según Lohmus (2006) las diferencias encontradas entre épocas (i.e., conductuales y fisiológicas) pueden ser explicadas por la relación que existe entre la respuesta adrenocortical y la variable estacional (i.e., época reproductiva).

Es importante mencionar que en otros animales (e.g., ratas y anfibios) las respuestas conductuales (e.g., tiempo de locomoción, incremento en el número de ataques, y la inhibición de conductas reproductivas) fueron modificadas luego de transcurrir 8 minutos del tratamiento de corticosterona (Sandi *et al.*, 1996; Orchinik *et al.*, 1991; Haller *et al.*, 1997). Por lo tanto, para hacer una correcta descripción de las especies, es necesario realizar más investigaciones que determinen los tiempos que transcurren entre el incremento de corticosterona y las modificación del fenotipo conductual.

Con respecto al vuelo, si bien no existen datos asociados al tiempo de reacción frente a un factor de estrés, algunas investigaciones han determinado que dicha conducta representa un gran gasto energético para el organismo, sobre todo si corresponden a vuelos cortos (Pennycuick, 1989; Norberg, 1990, 1996; Nudds & Bryant, 2000). Además, como es sabido, las poblaciones de chincoles en época reproductiva son territoriales (Addis *et al.*, 2013), por lo cual, esta conducta no se vería favorecida

durante dicha temporada. Por otro lado, invertir más tiempo en el vuelo, conlleva disminuir el tiempo asignado a los eventos de forrajeo y aumentar el tiempo de escape frente a un depredador (Moller, 2008), lo que podría explicar porque la especie *Z. capensis* voló y exploró menos durante la época reproductiva (véase figura 5, H-A).

Con respecto a las conductas de locomoción (i.e., salto y vuelo) del grupo A (i.e., protocolo de estrés-experimento de exploración), la ausencia de diferencias significativas entre épocas podría indicar factores conductuales que responden al mismo fenómeno de estrés inducido (i.e., captura y manipulación durante 45 minutos). Sin embargo, se necesitan mayores estudios para dilucidar cómo el estrés fisiológico de un organismo, afecta la conducta normal del individuo, es decir, su ciclo de vida, y por sobre todo, qué tipo de mecanismo biológico utiliza para responder frente a una situación de emergencia.

## 5. Conclusión

Los resultados apoyan la primera hipótesis de esta tesis, ya que la extracción de sangre si afectó los rasgos conductuales de los individuos. Así, la metodología aplicada en este trabajo, permitió evaluar dos tipos de comportamientos: A) conductas que posiblemente se encuentran asociadas a diferentes estados de emergencia, y b) conductas asociadas al ciclo de vida normal de la especie. Con respecto al grupo B (i.e., experimento de exploración-protocolo de estrés), los resultados indican que existe una relación entre la respuesta fisiológica observada (i.e., niveles basales de glucocorticoides, grupo A, protocolo de estrés- experimento de exploración) y la respuesta conductual detectada (i.e., vuelo y salto), lo cual sugiere que las diferencias adaptativas entre épocas, podrían estar reguladas por glucocorticoides, como lo propone la hipótesis II.

## 6. Bibliografía

Addis E A., Clark A D., Vasquez R A., Wingfield J C. 2013. Seasonal modulation of testosterone during breeding of the Rufous- Collared Sparrow (*Zonotrichia capensis australis*). *Physiological and Biochemical Zoology*. 86: 782-790.

Addis E.A., Davis J.E., Miner B.E., Wingfield J.C. 2011 a. Variation in circulating corticosterone levels is associated with altitudinal range expansion in a passerine bird. *Oecologia* 167: 369-378.

Artman, V.L., Sutherland, E.K. & Downhower, J.F. 2001 Prescribed Burning to Restore Mixed-Oak Communities in Southern Ohio: Effects on Breeding-Bird Populations. *Conservation Biology*. 15: 1423–1434.

Angelier F & Chastel O. 2009. Stress, prolactin and parental investment in birds: A review. *General and Comparative Endocrinology*. 163: 142- 148

Bókony V., Lendvai A.Z., Liker A., Angelier F., Wingfield J.C & Chastel O. 2009. Stress response and the value of reproduction: Are Birds Prudent Parents? *The American Naturalist*. 173: 589-598

Clutton-Brock, T. H. 1991. *The Evolution of Parental Care*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press

Bears H., Smith J.N.M., Wingfield J.C. 2003. Adrenocortical sensitivity to stress in dark-eyed juncos (*Junco hyemalis oregonus*) breeding in low and high elevation habitat. *Ecoscience*. 10: 127-133.

Boonstra R. 2004. Coping with Changing Northern Environments: The Role of the Stress Axis in Birds and Mammals. *Integrative and Comparative Biology*. 44: 95-108.

Breuner C.W., Greenberg A.L., Wingfield J.C. 1998. Noninvasive corticosterone treatment rapidly increases activity in Gambel is White Crowned Sparrows. *General and Comparative Endocrinology*. 111: 386-394

Breuner C.W., Orchinik M., Hahn T.P., Meddle S., Moore I.T., Owen-Ashley N., Sperry T.S., Wingfield J.C. 2003. Differential mechanisms for regulation of the stress response across latitudinal gradients. *American Journal of Physiology* . 285: 594- 600.

Chevin LM., Lande R. 2011. Adaptation to marginal habitats by evolution of increased phenotypic plasticity. *Journal of Evolutionary Biology*. 7: 1462-1476

Clutton-Brock, T. H. 1991. *The Evolution of Parental Care*. Princeton: Princeton University Press.

Cockrem J.F. 2005. Conservation and behavioral neuroendocrinology. *Hormones and Behavior*. 48:429-501.

Cockrem, J. F. 2007. Stress, corticosterone responses and avian personalities. *Journal Ornithology*. 148: 169- 178.

Creel S. 2001. Social dominance and stress hormones. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 491-497

Dhabhar F.S. 2002. Stress-induced augmentation of immune function. The role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. *Brain, Behavior, and Immunity*. 16: 785-798.

Dingemanse J.N & Goede P. 2004. The relation between dominance and exploratory behavior is context-dependent in wild great tits. *Behavioral Ecology* 15: 1023-1030.

Dingemanse N.J., Both C., Drent P.J., Van Oers K. & Van Noordwijk A.J. 2002. Repeatability and heritability of exploratory behaviour in great tits from the wild. *Animal Behaviour*. 64:929-938.

Goyman W., Wingfield J.C. 2004. Allostatic load, social status and stress hormones: the costs of social status matter. *Animal Behaviour*. 67: 591-602.

Gray, J. M., Yarian, D. & Ramenofsky, M. 1990. Corticosterone foraging behavior and metabolism in dark-eyed Juncos *Junco hyemalis*. *General and Comparative Endocrinology*. 79: 375\_384.

Gutiérrez, V. 2012. Evaluación de stress en *Zonotrichia capensis* a diferentes altitudes. Tesis para optar al título de Biólogo Ambiental, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Haller, J., Albert, I., & Makara., G. B. 1997. Acute behavioral effects of corticosterone lack specificity but show marked contextdependency. *J. Neuroendocrinology* 9: 515-518.

Henderson N. D. 1990. Quantitative genetic analysis of neurobehavioral phenotypes. In *Developmental Behavior Genetics: Neural, Biometrical, and Evolutionary approaches*. Oxford University Press. 283-397.

Hendry AP., Farrugia TJ., Kinnison MT. 2008. Human influences on rates of phenotypic change in wild animal populations. *Molecular Ecology*. 17: 20-29.

Jones B.R. 1996. Fear and adaptability in poultry: insights, implications and imperatives. *World is Poultry Science Journal*. 52: 130-172

Karyn D R., Farley S D., Fortin J & Robbins CH T. 2007. Nutritional Consequences of experimentally introduced tourism in Brown Bears. *Journal of Wildlife Management*. 71: 929-939.

Kitaysky A.S., Wingfield J.C., Piatt J.F., 1999. Dynamics of food availability, body condition and physiological stress response in breeding black legged Kittiwakes. *Functional Ecology*. 13: 577-584.

Kolowski JM & Kolekamp K E. 2009. Ecological and anthropogenic influences on space use by spotted hyaenas. *Journal of Zoology*. 277: 23-36

Koob GF., LeMoal M. 2001. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology*. 24:97-129.

Koolhaas, J.M., Korte, S.M., De Boer S.F., Van Der Vegt, B.J., Van Reenen, C.G., Hopster, H., De Jong, I.C., Ruis, M.A.W., Blokhuis, J.H. 1999. Coping styles in animals: current status in behaviour and stress physiology. *Neuroscience Biobehavioral Reviews* 23: 925-935.

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

Landys, M. M., Ramenofsky, M., Guglielmo, C. G. & Wingfield, J. C. 2004. The low-affinity glucocorticoid receptor regulates feeding and lipid breakdown in the migratory Gambel's white-crowned sparrow *Zonotrichia leucophrys gambeli*. *Journal*

Experimental Biology. 207: 143-154.

Lendvai A.Z., Bokony V & Chastel O. 2011. Coping with novelty and stress in free living house sparrows. *Journal of Experimental Biology*. 214: 821-828.

Lohmus M., Sundstrom F & Moore F.R. 2006. Non invasive corticosterone treatment changes foraging intensity in red-eyed Vireos *Vireo olivaceus*. *Journal of Avian Biology*. 37: 523-526.

Love O.P & Williams T D. 2008. The adaptative value of stress-induced phenotypes: Effects of maternally derived corticosterone on sex-biased investment, Cost of reproduction, and maternal fitness. *The American Naturalist*. 172

Lynn S.E., Breuner C.W., Wingfield J.C. 2003. Short-term fasting effects locomotor activity, corticosterone, and corticosterone binding globulin in a migratory songbird. *Hormone and Behavior*. 43: 150-157.

Marra P.P & Holberton R.L. 1998. Corticosterone levels as indicators of hábitat quality: effect of hábitat segregation in a migratory bird during the non breeding season. *Oecologia* 116: 284-292.

Martins L.F., Roberts M.L., Giblin I., Huxham R., Evans M.R. 2007. Speed of exploration and risk-taking behavior are linked to corticosterone titres in zebra finches. *Hormones and Behavior*. 52: 445-453.

Martins, T. L., Roberts, M. L., Giblin, I., Huxham, R. & Evans, M. R. 2007: Speed of exploration and risk-taking behavior are linked to corticosterone titres in zebra finches. *Hormones and Behavior*. 52: 445-453.

McEwen B.S. 1998. Protective and damaging effects of stress mediators. *New England Journal of Medicine*. 338: 171-9.

McEwen B.S., Wingfield J.C. 2003. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior*. 43: 2-15.

Moller A.P. 2008. Flight distance of urban birds, predation, and selection for urban life. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 63: 63-75.

Norberg, U. M. 1990. *Vertebrate Flight: Mechanics, Physiology, Morphology, Ecology and Evolution*. Berlin: Springer Verlag.

Norberg, U. M. 1996. Energetics of flight. In *Avian Energetics and Nutritional Ecology* (ed. C. Carey), pp. 199–249. London: Chapman & Hall.

Nudds R.L & Bryant D.M. 2000. The energetic cost of short flights in birds. *The Journal of Experimental Biology*. 203: 1561-1572.

Orchinik, M., Murray, T. F., and Moore, F. L. 1991. A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science* 252: 1848–1851.

O'Reilly K. M., Wingfield J.C. 2001. Ecological factors underlying the adrenocortical response to capture stress in arctic-breeding shorebirds. *General and Comparative Endocrinology*. 124: 1-11.

Pennycook, C. J. 1989. *Bird Flight Performance: A Practical Calculation Manual*. Oxford: Oxford University Press.

Pligliucci M. 2005. Evolution of phenotypic plasticity where are we going now? Trends in ecology and evolution. 20: 481-486

Pravosudov, V. V. 2003. Long-term moderate elevation of corticosterone facilitates avian food-caching behaviour and enhances spatial memory. Proceedings of the Royal Society. B. 270: 2599- 2604.

Quispe R., Camila P. Villavicencio., Cortés A. & Vásquez R.A. 2009. Inter-population variation in hoarding behaviour in degus, *Octodon degus*. Ethology 115: 465-474.

Reale D., Reader S.M., Sol D., McDougal P.T., Dingemanse N.J. 2007. Integrating animal temperament within ecology and evolution. Biology. 82: 291-318.

Richardson M.I., Moore I.T., Soma K.K., Lei F.M., Wingfield J.C. 2003. How similar are high latitude and high altitude habitats? A review and a preliminary study of the adrenocortical response to stress in birds of the Qinghai- Tibetan Plateau. Acta ZOO Sin. 49:1-19.

Romero L.M. 2004. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. Trends Ecology and Evolution. 19: 249-255.

Sandi C., Venero C & Guaza, C. 1996. Novelty-related rapid locomotor effects of corticosterone in rats. European Journal of Neuroscience. 8: 794-800.

Sapolsky R. 1993. Endocrinology alfresco: Psychoendocrine studies of wild baboons. Recent Progress in hormone research. 48-437.

Sapolsky R.M., Romero L.M., Munck A.U. 2000. How do glucocorticosteroids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory and

preparative actions. *Endocrinology*. 21: 55-89.

Silverin B. 1986. Corticosterone-binding proteins and behavioral effects of high plasma levels of corticosterone during the breeding period in the Pied Flycatcher. *General and Comparative Endocrinology*. 64: 67-74.

Silverin B. 1997. The stress response and autumn dispersal behaviour in willow tits. *Animal Behaviour* 53: 451-459.

Silverin B. 1998. Behavioural and hormonal responses of the pied flycatcher to environmental stressors. *Animal Behavior*. 55: 1411-1420.

Slabbekoorn H & Ripmeester E A. 2007. Birdsong and anthropogenic noise: implications and applications for conservation. *Molecular Ecology*. 17: 72-83.

Stowe M., Rosivall B., Drent P.J., Mostl. 2010. Selection for fast and slow exploration effect baseline and stress-induced corticosterone excretion in Great tit nestlings, *Parus major*. *Hormones and Behavior*. 58: 864-871

Van Dongen W.F.D., Maldonado K. Sabat P. & Vasquez R.A. 2010. Geographic variation in the repeatability of a personality trait. *Behavioral Ecology* 21: 1243-1250.

Wagner, G. P. 1996. Homologues, natural kinds and the evolution of modularity. *American Zoologist* 36, 36-43.

Wilson C.M., Holberton R.L. 2004. Individual risk versus immediate reproductive success: a basis for latitudinal differences in the adrenocortical response to stress in Yellow Warblers, *Dendroica petechia*. *Auk* 121: 1238-1249.

Williams K.A. 2013. Behavioral plasticity in hooded Warblers (*Setophaga citrina*): Linking Behavior, Environmental Context and Reproductive Success. Tesis doctoral de la Universidad de Ohio.

Wingfield J. C., Ramenofsky R. 1999. Hormones and the behavioral ecology of stress. En P.H.M. Balm (eds.), Stress physiology in animals. pp 1-51.

Wingfield J.C. 1994. Modulation of the adrenocortical response to stress in birds. En S. Tobe (eds.) Perspective in Comparative Endocrinology. National Research Council of Canada, Ottawa, Ontario. 520-528.

Wingfield J.C., O'Reilly K.M & Astheimer. 1995. Modulation of the adrenocortical responses to acute stress in arctic Birds: A possible ecological basis. American Zoologist. 35: 285-294.

Wingfield J.C. 2003. Control of behavioural strategies for capricious environments. Animal Behavior. 66: 807-816.

Wingfield J.C. 2005. The Concept of Allostasis: Coping With a Capricious Environment. Journal of Mammalogy. 86: 248-254.

Wingfield J.C., Ramenofsky M. 1997. Corticosterone and facultative dispersal in response to unpredictable events. Ardea. 85: 155-166.

Wingfield J.C., Romero L.M. 2000. Adrenocortical responses to stress and their modulation in free-living vertebrates. Oxford University Press, Oxford. 4: 211-236

Wingfield J.C., Silverin B. 1986. Effects of corticosterone on territorial behavior of free-living song sparrows, *Melospiza melodia*. Hormones and Behavior. 20: 405-417.

Wingfield J.C., Smith J.P., Farner D.C. 1982. Endocrine responses of white-crowned sparrows to environmental stress. *Condor*. 84: 399-409.

Wingfield, J. C., & K. E. Hunt. 2002. Arctic spring: hormone-behavior interactions in a severe environment. *Comparative Biochemistry and Physiology* 132: 275–286.

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

Wingfield, J.C. 1983. Environmental and endocrine control of avian reproduction: an ecological approach. In: Mikami, S., Homma, K, and ecological perspective. Springer-Ver lag, New York. 265-288.