

*“Regulación ambiental y social de la  
reproducción en hembras del roedor  
subterráneo **Ctenomys talarum**”*

*María Sol Fanjul*

*Tesis para optar por  
el título de Doctor en Ciencias.  
Director: Dra. Busch*

*Mar del Plata, Argentina  
2006*

*La realización de la presente tesis de doctorado ha sido posible gracias a la **Beca Doctoral Interna** concedida a MSF por el Consejo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICET),  
La misma fue dirigida por: **Dra. C. Busch** y **Dra. Roxana R Zenuto**.*

*Este trabajo fue realizado en: **Laboratorio de Ecofisiología**,  
Departamento de Biología, FCEyN, UNMdP, Argentina. Y financiado con subsidios de la UNMdP y ANPCyT a CB y de CONICET a RRZ.*

*Jurados de la presente tesis:*

*Dr. Gabriel Francescoli, Universidad Nacional de la Republica, Uruguay.*

*Dr. Jaime Polop, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.*

*Dr. Eduardo Spivak, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.*

*“It is a miracle that curiosity survives formal education”*  
-- Albert Einstein

## AGRADECIMIENTOS

Diffícilmente un doctorado es el resultado del esfuerzo de una sola persona. Es muy difícil para mí expresar en palabras la enorme gratitud que siento hacia todas las personas que me tendieron una mano en este camino.....

Quiero agradecer a Cristina Busch por abrirme las puertas al grupo de Ecofisiología y aceptar la dirección de este trabajo. Quiero agradecer muy especialmente a Roxana Zenuto, como codirectora de beca, como compañera de laboratorio, como persona, como amiga: por ayudarme cuando las cosas no salían tan bien, por darme aliento y preocuparse de mi bienestar. Como codirectora ella fue más que paciente con mis fallas y mis inseguridades, y su confianza me ayudó a superar muchas dificultades. Ella estaba ahí con su ayuda y apoyo: lo agradezco de todo corazón. A una gran profesional y una excelente amiga y persona: gracias totales.

A mis compañeros de laboratorio (Cristian, Facu, Ro, Dani, Ana, Mati, Marce y Aldo) por sus útiles comentarios, por su amistad y ayuda cada vez que lo necesité, porque por esto resulta un *placer* cada día de trabajo. Quiero mencionar especialmente a Facu y Cris que me llevaron a Mar de Cobo en incontables oportunidades, donde además de la captura de los tucos compartimos largas charlas entre mate, viento y palmeritas.

A mis amigos, los de siempre y los de a veces, los de acá y los de allá (Mariela, Flavia, Laura, Gloria, Lore, Sofí, Carla, Pablo, Mati, Ariel, Daniela, Verónica y los que me olvido: mil perdones!): porque siempre que bancaron en todos mis ‘morfos’: desde neurótica nerd a cansada ama de casa. Por compartir tantos BUENOS e inolvidables momentos.....gracias.

Agradezco a mi familia (a papá Coco, mamá Maricarmen y a mis hermanos: Carmen, José y Eugenia) por apoyarme, subsidiarme y soportarme, tarea difícil si las hay, durante mi carrera en la biología.

Pero sobre todo deseo agradecer muy especialmente a mi esposo, a Ale, que me acompañó, bancó, aguantó, apoyó, soportó, alentó, sufrió, resistió, toleró todo este tiempo.... Muchos podrían pronosticar ‘desastre’ para dos estudiantes de doctorado aprendiendo a convivir bajo un mismo techo...sin embargo fue fantástico. Gracias por su entusiasmo, cariño, consejos y sobre todo por su amor y su amistad. Gracias por estar.

Gracias!

Sol

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	v
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	1
<b>CAPITULO I</b> : Efectos de variables climáticas y disponibilidad de alimento sobre la estación reproductiva	9
<b>CAPITULO II</b> : Efectos del fotoperíodo sobre el inicio de la estación reproductiva	29
<b>CAPITULO III</b> : Efecto de la familiaridad por olor en el comportamiento reproductivo de hembras	49
<b>CAPITULO IV</b> : Condición reproductiva, receptividad comportamental y efecto del macho	79
<b>CAPITULO V</b> : Patrón copulatorio e inducción de la ovulación	98
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	113

## RESUMEN

La presente tesis tiene como objetivo general estudiar la influencia de factores exógenos, tanto ambientales como sociales sobre el comportamiento reproductivo de hembras de *Ctenomys talarum*. Específicamente se tratan las siguientes preguntas particulares: I) ¿Existe asociación entre el patrón reproductivo temporal y las condiciones ambientales tales como en las precipitaciones, temperatura y disponibilidad de alimento?, II) ¿Existe, en cautiverio, relación entre el fotoperíodo y el inicio del período reproductivo? ¿Existe una interacción entre el fotoperíodo y el contacto indirecto con un macho (a través de olores) sobre el inicio del período reproductivo?, III) ¿El reconocimiento previo mediante olores de un macho por la hembra está relacionado con una mayor receptividad de la hembra para con ese macho?, IV) ¿Existe relación entre la condición reproductiva (citología vaginal y composición hormonal) y el comportamiento reproductivo?, y V) ¿El patrón copulatorio coincide con los patrones esperados para ovuladores inducidos?. Las hembras de *C. talarum* emplean el fotoperíodo para sincronizar el inicio del periodo reproductivo (Cap. II) y ajustar su actividad reproductiva de acuerdo a la disponibilidad de alimento de manera que los altos requerimientos energéticos de la lactancia y el posparto puedan ser asegurados. Por otro lado, los nacimientos ocurren cuando la temperatura ambiente es más favorable para crías altriciales, como una estrategia que permite asegurar el crecimiento y por ende la supervivencia (Cap. I). Aunque no fueron hallados efectos de la exposición al olor de un macho (Cap. II), sus efectos indirectos sobre la reproducción a través de la familiarización son discutidos en el Cap. III. El efecto de la familiarización fue especialmente evidenciado por la falta de refuerzos en las cópulas. Contrariamente a lo esperado, las hembras que interactuaron con extraños mostraron mayor actividad reproductiva aunque también mayor incidencia de actos agresivos. En este caso, y a diferencia de las hembras familiarizadas, todas las cópulas obtenidas entre extraños fueron reforzadas en días siguientes. Las hembras de *C. talarum* no presentan un estado continuo de receptividad comportamental y fisiológica durante la estación reproductiva (Cap IV). Este patrón de receptividad variable a lo largo de la estación reproductiva podría ser el resultado del estado fisiológico de la hembra así como de un importante papel en la selección de pareja. La atracción de los machos se halla fuertemente relacionada a la receptividad de la hembra, sugiriendo que las señales conductuales y no conductuales (olor) son suficientes para que el macho detecte el estado de la hembra. La ovulación en hembras de *C. talarum* fue solo inducida por el estímulo copulatorio. De acuerdo a lo observado aquí, al menos el número de períodos copulatorios sería de gran importancia para la inducción de la repuesta ovulatoria en hembras de *C. talarum* (Cap V). La duración de la cópula es variable para *C. talarum* aunque similar a valores reportados para otros roedores, pero no para otros histicomorfos que presentan ovulación espontánea y muestran períodos copulatorios mucho más cortos. En hembras que presentaron comportamientos receptivos, el contacto físico con machos provoco un incremento de la producción de estrógenos relacionados al desarrollo folicular, pero no fue así en aquellas no receptivas. Así, el contacto social constituiría un factor de gran importancia en esta especie solitaria.

# CAPÍTULO I



**EFFECTOS DE VARIABLES CLIMÁTICAS Y DISPONIBILIDAD DE ALIMENTO SOBRE LA ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA**

El presente capítulo será publicado como :  
FANJUL, M. S., R. R. ZENUTO, Y C. BUSCH. 2006. Seasonality of breeding in wild tuco-tucos *Ctenomys talarum* in relation to climate and food availability. *Acta Theriologica*, 51: 00-00, en prensa.

## INTRODUCCIÓN

En ambientes caracterizados por una marcada estacionalidad climática y de disponibilidad de alimento, la reproducción estacional permite a los animales ajustar su reproducción a las condiciones ambientales más favorables y así optimizar la supervivencia de su progenie (Ims 1990, Bronson 1989). La disponibilidad de alimento, fotoperíodo, temperatura, y precipitaciones se encuentran entre los factores ambientales que afectan el inicio y la duración de la estación reproductiva de muchos mamíferos (Lincoln y Short 1980, Bronson 1989, El-Barky *et al.* 1999). Particularmente, dado que ningún hábitat natural muestra un continuo exceso de alimento, la variación de este podría funcionar como señal así como también ser causa de la estacionalidad en la reproducción (Bronson 1989, Wade 1998) a través del contenido energético y/o de micronutrientes o de compuestos secundarios (Wade 1998).

En el caso de los roedores subterráneos, las cuevas constituyen un refugio que amortigua condiciones climáticas adversas, por lo que pocos estudios han evaluado la contribución de diferentes factores ambientales en la regulación del patrón estacional de su reproducción. A pesar de que la temperatura dentro de los túneles es menos variable que sobre el sustrato (Šumbera *et al.* 2004), los roedores subterráneos que habitan ambientes variables (ctenomidos y geomidos) están expuestos regularmente a marcados cambios estacionales en la temperatura. Más aun, muchas especies de roedores subterráneos que concentran sus actividades bajo la superficie se hallarían expuestas a importantes fluctuaciones térmicas diarias y estacionales dentro de los túneles de forrajeo poco profundos o cuevas que permanecen abiertas al exterior (ej. *Spalacopus*, Begall y Gallardo 2000). Eso es más notable en aquellas especies que realizan frecuentes salidas de su sistema de túneles en búsqueda de alimento (ej. ctenomidos, Busch *et al.* 2000).

La estación reproductiva de *C. talarum* ha sido estudiada a través la presencia de embriones en hembras sacrificadas (Busch *et al.* 1989, Malizia y Busch 1991). Sin embargo, el presente estudio describe el patrón temporal de la reproducción en relación con las variables ambientales en hembras sometidas a esquemas de captura viva - silvestres. Las escasas señales externas que proveen información acerca del estado reproductivo de las hembras, sumado a los hábitos ocultos de estos roedores dificultan la evaluación de la biología reproductiva de estos organismos en condiciones naturales. Actualmente, la información existente acerca de la naturaleza del ciclo del estro se

restringe a la mención realizada por Weir (1979), quien sugirió que los tuco-tucos son ovuladores inducidos, ya que solo las hembras que copularon presentaron cuerpos lúteos, aunque este estudio no provee información acerca del origen (ej. hembras silvestres, apareamiento en cautiverio) de dichos resultados. Mientras que la ovulación en roedores es usualmente monitoreada mediante el seguimiento de los niveles hormonales o por la examinación y determinación *posmortem* de cuerpos lúteos el estado reproductivo de las hembras puede también ser evaluado fácilmente y de forma no invasiva a través del monitoreo de cambios morfológicos externos y la citología vaginal (ya que la actividad ovárica y las concentraciones de estrógeno en sangre se hallan en estrecha relación a la composición celular del epitelio vaginal, Cooper *et al.* 1993). Aunque pocas, algunas características externas indicativas del estado reproductivo (e.g. cópula, preñez, parición) pueden ser consideradas junto a la citología vaginal con el objeto de evaluar la actividad reproductiva de hembras de *C. talarum*. Las hembras que han copulado (activas) pueden ser detectadas mediante la presencia de una sutura vaginal (Weir 1974), las hembras en un estadio avanzado de la preñez poseen embriones que pueden ser detectados mediante palpación, mientras que las hembras que amamantan presentan pezones alargados y con menor densidad de pelaje.

Las variables asociadas con la reproducción (principalmente temperatura, precipitaciones y disponibilidad de alimento) no han sido evaluadas para *C. talarum*. La temperatura ambiente podría tener un efecto directo (termorregulación) así como indirecto (crecimiento vegetal) sobre la reproducción. Las precipitaciones tendrían un efecto directo a través del humedecimiento del suelo y consecuentemente facilitando la excavación, pero también podrían afectar indirectamente a la reproducción favoreciendo el desarrollo vegetal. En el presente capítulo se evalúan las relaciones entre las variables ambientales con la estacionalidad reproductiva de hembras silvestres de *C. talarum* mediante el empleo de técnicas no invasivas. Para llevar a cabo esto: 1- se describieron las variaciones mensuales de las características reproductivas externas y de la citología del epitelio vaginal de hembras silvestres durante un año; 2- se evaluó la relación entre el estado reproductivo y la citología del epitelio vaginal, y 3- se evaluaron los efectos directos e indirectos de las variables ambientales sobre el patrón temporal de la actividad reproductiva de las hembras. Se espera que aquellas etapas más costosas del ciclo reproductivo sean resguardadas mediante su sincronización temporal con las condiciones ambientales más benignas. El

estudio de la estacionalidad reproductiva con relación con las variables ambientales proveerá información clave para mejorar nuestra comprensión de la biología reproductiva de los tuco-tucos y contribuirá a la identificación de los factores ambientales ligados a los patrones temporales de reproducción en roedores subterráneos.

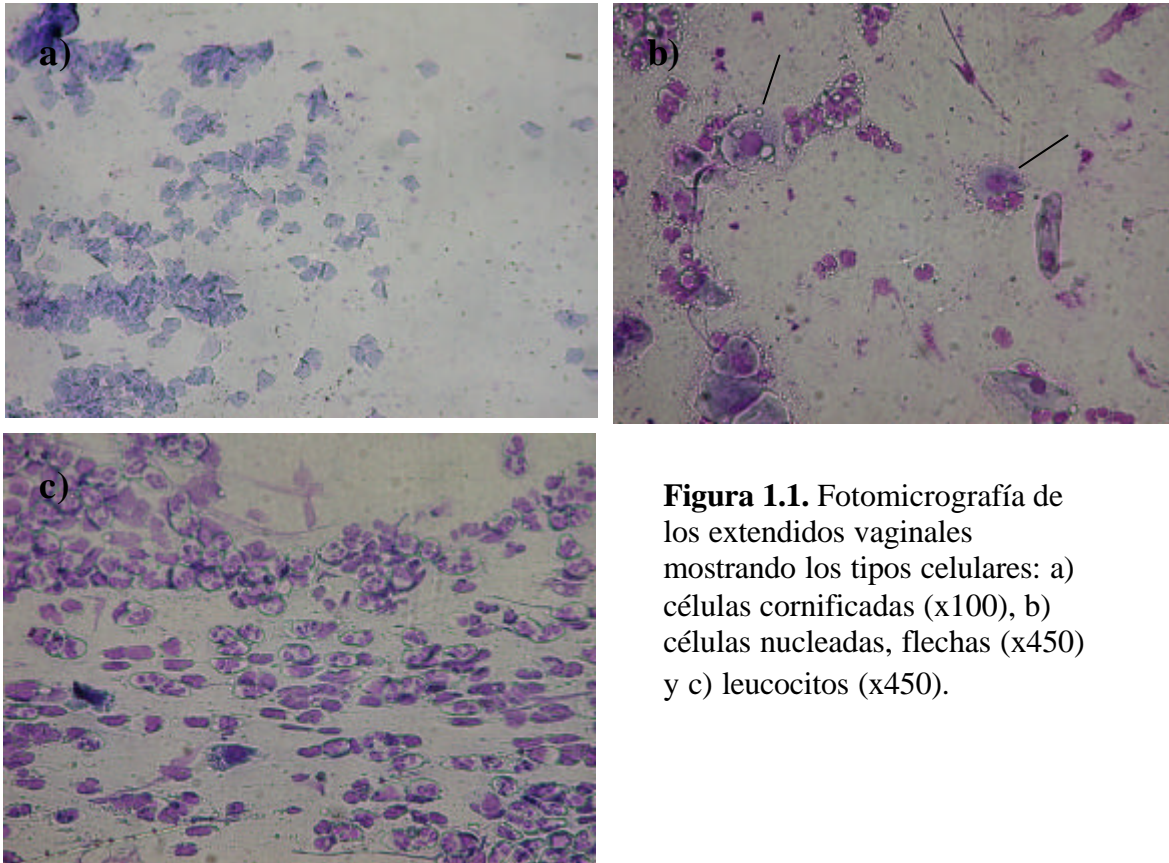
## MATERIALES Y MÉTODOS

*Captura de animales y datos de reproducción.*-Al menos 7 (rango 7-14) hembras maduras fueron capturadas mensualmente desde junio del 2001 a mayo del 2002 usando trampas de piso falso en Mar de Cobo, Argentina (57° 56' O, 37° 45' S). Inmediatamente después de la captura se registraron las características reproductivas externas (no se disponen de los datos para abril/ 2002): condición de la membrana vaginal, embriones palpables, pezones alargados y pelados, y coloración de la mucosidad vaginal (oscuro: amarillo a marrón oscuro; o claro: transparente a blanco). También, una muestra de extendido vaginal fue tomada de cada hembra (como se detalla abajo) en el campo. Los animales fueron liberados en el sitio de captura.

Un grupo adicional de hembras usadas en este estudio constituía parte de otro estudio en desarrollo relacionado a la composición corporal de *C. talarum* (del Valle 2005). Con el objetivo de relacionar características externas indicadoras del estado reproductivo y su citología vaginal, un grupo de hembras capturadas a lo largo del período reproductivo (junio, n: 11; agosto, n: 7; septiembre/ 2001, n: 7; y febrero/ 2002, n: 5) fueron sacrificadas no más de 24 h después de la captura. Los extendidos vaginales fueron tomados dentro de los 3 minutos posteriores a la muerte del animal, como es explicado más adelante en esta sección. Luego, las hembras fueron examinadas, y se registraron signos de actividad reproductiva. Las hembras fueron clasificadas como: inactivas, cuando no se hallaron signos de actividad reproductiva (actividad folicular y membrana vaginal cerrada); activa, cuando mostraban signos de cópula (actividad folicular y membrana vaginal abierta o re-cerrada ('sutura' vaginal), preñada (cuernos uterinos irrigados, embriones visibles, membrana vaginal abierta o re-cerrada), y posparto (membrana vaginal abierta o re-cerrada, cuernos uterinos ensanchados, pezones alargados y sin pelaje).

Las muestras de epitelio vaginal (extendidos) fueron tomadas mediante la inserción de un hisopo humedecido con solución fisiológica estéril dentro de la vagina, el cual fue rotado 360°. Inmediatamente después de esto, la muestra fue extendida a lo largo de un

portaobjetos. Los extendidos fueron fijados con etanol 95° por al menos 5 minutos y teñidos con solución de Giemsa (MacFarlane y Taylor 1982). Para cada extendido, al menos 5 campos fueron observados y 100 células fueron contadas en microscopio (45x, Fig. 11).



**Figura 1.1.** Fotomicrografía de los extendidos vaginales mostrando los tipos celulares: a) células cornificadas (x100), b) células nucleadas, flechas (x450) y c) leucocitos (x450).

En las hembras examinadas *posmortem* se observó que la mucosidad vaginal oscura caracterizó a las hembras preñadas (8/9 hembras preñadas mostraron mucus oscuro mientras que solo 2/17 de hembras no preñadas lo hicieron). Es importante resaltar que la única hembra preñada que no mostró dicha característica se hallaba en un período muy temprano de la preñez (embriones de 1.5 mm diámetro). En consecuencia, se empleó dicha condición, en adición a la palpación de embriones (solo en aquellos estadios avanzados), para estimar preñez en hembras vivas.

La frecuencia de hembras con sutura vaginal, de hembras lactando (con pezones alargados) y de hembras preñadas (con moco oscuro) fueron evaluadas en hembras vivas. Así también, la proporción de células nucleadas (N), leucocitos (L) o células cornificadas (C) fueron calculadas a partir de los extendidos vaginales. El índice de cornificación (CI)

fue estimado para cada hembra no preñada como:  $n^\circ$  de células cornificadas/ ( $n^\circ$  de células nucleadas +  $n^\circ$  de células cornificadas) (Evans y Savage 1970). Para describir la tendencia temporal del patrón reproductivo fue empleado el método de mínimos cuadrados ponderados por la distancia (Distance-Weighted Least-Squares smoothing) del programa Statistica 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). El análisis de tendencia, mediante métodos de suavizado, provee una representación empírica entre dos variables, sin estimar ni modelar formalmente los parámetros (Legendre y Legendre 1998).

*Variables ambientales.* - La temperatura mensual promedio fue obtenida de “The Weather Underground, Inc.” Copyright© 2002 (Daily History para Mar del Plata, <http://www.wunderground.com>). La precipitaciones mensuales fueron obtenidas de U.S. Department of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA), National Environmental Satellite, Data, and Information Service Office, National Climatic Data Center (<http://lwf.ncdc.noaa.gov/oa/climate/climatedata.html>). Ambos datos fueron tomado para el período de estudio para la estación Mar del Plata, a 15 km del sitio de estudio. Para describir su tendencia temporal fue empleado el método de mínimos cuadrados ponderados por la distancia (‘Distance-Weighted Least-Squares smoothing’) (Statistica 6.0).

Dado que *C. talarum* es un herbívoro generalista y oportunista, que consume pastos en la misma proporción en las que estos se hallan en representados en el pastizal (del Valle *et al.* 2001), la disponibilidad de alimento se evaluó mediante la obtención de 20 muestras del pastizal (círculos de 25 cm diámetro y 10 cm profundidad) ubicadas al azar en la misma área en la cual se capturaron las hembras. Las mismas fueron extraídas mensualmente y las especies vegetales fueron separadas por especie y secadas a 70 °C hasta alcanzar peso constante. Para cada muestra se determinaron, para la porción aérea y subterránea, el contenido de agua y la biomasa seca. La constancia ( $C = \text{numero de muestras en la que una especie se halla presente} / \text{numero total de muestras}$ ; Mateucci y Colma 1982) fue calculada para cada especie vegetal. La variación anual en el contenido de agua y biomasa fue analizada mediante una prueba de Kruskal-Wallis para las especies que mostraron mayor constancia promedio anual y particularmente para *Medicago* (incluyendo *M. lupulina* y *M. minima*). La inclusión de este último género se debe a que el mismo fue reportado como portador de compuestos secundarios (principalmente coumestrol), el cual presenta actividad estrogénica (Harborne 1993).

*Variables ambientales y reproducción.*- La frecuencia de hembras amamantando y preñadas fue evaluada en relación a la temperatura, biomasa vegetal, contenido de agua vegetal, precipitaciones, precipitaciones del mes anterior (la que podría hallarse en relación al crecimiento vegetal) para determinar si estos factores ambientales afectan la reproducción. Para dicho análisis, los estimadores de la disponibilidad vegetal solo incluyeron la porción aérea, ya que la dieta de *C. talarum* esta compuesta principalmente por esta fracción (aproximadamente 85 %; del Valle *et al.* 2001).

El análisis de vías, una extensión del análisis de regresión múltiple, permite la descomposición e interpretación de relaciones lineales con cierto número de descriptores (Legendre y Legendre 1998) y fue empleado para identificar efectos directos e indirectos (Bergallo y Magnusson 1999). El módulo de Modelado de Ecuaciones Estructurales (SEPATH; Statistica 6.0, StatSoft) fue empleado para calcular los coeficientes de vía estandarizados ( $\beta_i$ : coeficientes parciales de regresión estandarizados) entre las variables intervinientes. Asimismo, para determinar el grado relativo de ajuste (probabilidad del modelo de generar los datos observados) de cada modelo con los datos observados se utilizo la Prueba  $\chi^2$ , rechazando aquellas estructuras causales cuya probabilidad de generar los datos observados fuera  $< 0,05$ . Para ello se analizó la matriz de correlación usando el método de Máxima Verosimilitud (ML, '*Maximum likelihood*'); los parámetros ( $\beta_i$ ) y sus desvíos estándar fueron estimados y analizados mediante una prueba de t.

## RESULTADOS

*Características reproductivas.*- Las características reproductivas de 108 hembras vivas de *C. talarum* fueron evaluadas durante el año de estudio. El periodo reproductivo comenzó en junio, con un incremento en la frecuencia de hembras con sutura vaginal (Fig. 1.2a), extendiéndose durante el invierno y primavera hasta el primer mes de verano y alcanzando por ultimo su menor valor durante marzo. El patrón de dicha curva fue claramente seguido por un pico de similar forma pero de menor amplitud perteneciente a la frecuencia de hembras preñadas, el cual comenzó a fines del invierno (agosto-septiembre), decreciendo a comienzos del verano. Ambas características, sutura vaginal y preñez, se encontraron positivamente correlacionadas (Correlación de Spearman,  $r_s = 0.631$ ,  $n = 11$ ,  $P = 0.035$ ; Tabla 1.1). Tres meses luego de la mayor incidencia de preñez, se observó un pico de nacimientos (denotado por la frecuencia de hembras amamantando) (Fig. 1.2a).

Los extendidos vaginales de 122 hembras vivas de *C. talarum* se evaluaron durante el año de estudio (Fig. 1.2b). Durante el comienzo de la estación reproductiva (junio) se observó la proporción más alta de células nucleadas, disminuyendo luego durante el resto del invierno y verano, sufriendo nuevamente un incremento durante el verano y el otoño. La frecuencia de células cornificadas en los extendidos fue baja y dispersa durante el período de estudio, mostrando sus menores registros en septiembre y febrero. Asimismo, aquellas hembras que presentaron epitelios con gran proporción de células cornificadas no mostraron señales externas como apertura vaginal, secreción o inflamación vulvar. La presencia de leucocitos fue observada durante la mayor parte del año, sin embargo los mayores niveles fueron alcanzados a partir de finales de invierno hasta el verano, mostrando un pico de 100% durante septiembre. La línea de tendencia para los promedios del índice de cornificación en hembras no preñadas (Distance-Weighted Least-Squares smoothing) exhibió su máximo en agosto y el mínimo en febrero (Fig. 1.2c).

Las hembras examinadas *posmortem* a lo largo del año proporcionaron información acerca de la relación entre el estado reproductivo y la composición citológica del epitelio vaginal. Las hembras inactivas fueron encontradas al comienzo de la estación reproductiva (junio), en proporción del 80 %. Las hembras activas fueron encontradas en junio (20 %), agosto (43 %) y septiembre (14 %), disminuyendo la frecuencia de dicha condición durante los dos últimos meses en favor de la aparición de hembras preñadas en agosto (57 %) y septiembre (86 %). Al final de la estación reproductiva, solo el 20 % de las hembras se hallaban preñadas y el 80 % habían parido. La caracterización citológica de los extendidos vaginales (Fig. 1.2d) de hembras inactivas se encontró compuesta principalmente por células nucleadas acompañadas por una pequeña proporción de células cornificadas y leucocitos. Las hembras activas presentaron un alto grado de cornificación, además de leucocitos y en menor medida células nucleadas. Extendidos exclusivamente compuestos por leucocitos fueron característicos de las hembras preñadas. Por otro lado, las hembras que habrían parido recientemente mostraron proporciones similares de células nucleadas y leucocitos.

Las características externas mostraron un alto grado de asociación positiva con la composición citológica de los extendidos vaginales. Así, el índice de cornificación de las hembras no preñadas se encontró relacionado con la frecuencia de hembras con sutura (Correlación de Spearman,  $r_s = 0.950$ ,  $n = 9$ ,  $p < 0.001$ ). De igual forma la proporción

promedio de leucocitos se encontró asociada a la frecuencia de preñez (Correlación de Spearman,  $r_s = 0.797$ ,  $n = 11$ ,  $p = 0.0014$ ).

*Variables ambientales.* Los datos de variables ambientales, precipitaciones medias mensuales y la temperatura media mensual, para el período de estudio se muestran en la Fig. 1.3. Durante el año de estudio las precipitaciones fueron abundantes (aprox. 1500 mm) y dispersas, mientras que la temperatura mostró un claro patrón de cuatro estaciones, con los menores registros en junio y julio y los máximos en enero y febrero.

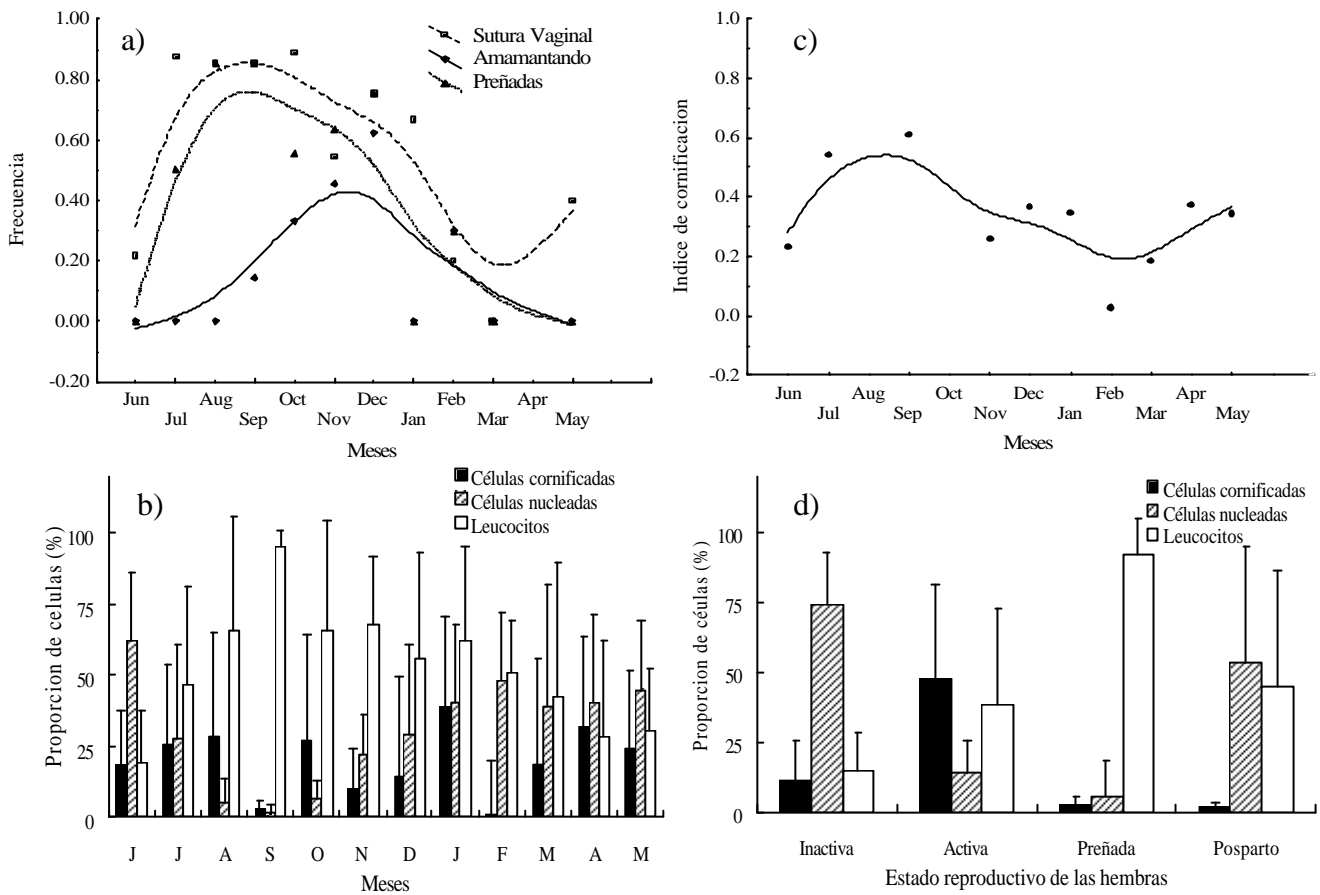
La disponibilidad de alimento mostró diferencias a lo largo del año, tanto en biomasa (Kruskal-Wallis- porción aérea:  $H = 93.1$ ,  $df = 11$ ,  $p < 0.0001$ ; porción subterránea:  $H = 59.1$ ,  $P < 0.0001$ ; Fig. 1.4) como en contenido de agua vegetal (Kruskal-Wallis- porción aérea:  $H = 93.1$ ,  $df = 11$ ,  $df = 11$ ,  $p < 0.0001$ ; porción subterránea:  $H = 90.2$ ,  $df = 11$ ,  $p < 0.0001$ ; Fig. 1.4). Tanto la biomasa como el contenido de agua de la porción aérea alcanzaron sus mínimos valores desde junio a septiembre y luego mostraron un incremento en diciembre. La porción subterránea, aunque mostró un patrón similar para la biomasa y contenido de agua vegetal, este fue menos conspicuo, mostrando un pico de biomasa en noviembre y uno de menos importancia en julio. *Panicum racemosum*, *Lagurus ovatus*, y *Ambrosia tenuifolia* fueron las especies vegetales más abundantes (Apéndice I); datos detallados sobre su biomasa y contenido de agua de la fracción aérea son mostrados en la Fig. 1.5a) y b) respectivamente. Aunque menos abundante, la biomasa correspondiente a *Medicago* varió significativamente a lo largo del año (Kruskal-Wallis,  $H = 63.4$ ,  $df = 11$ ,  $p < 0.0001$ ) mostrando un claro incremento en noviembre.

Además, se estudió la asociación entre diferentes variables ambientales. La biomasa y el contenido de agua vegetal se hallaron fuertemente relacionadas (Correlación de Spearman,  $r_s = 0.939$ ,  $n = 12$ ,  $p < 0.0001$ ), y a su vez positivamente relacionadas con la temperatura (Correlación de Spearman,  $r_s = 0.727$ ,  $n = 12$ ,  $p = 0.006$ ;  $r_s = 0.636$ ,  $n = 12$ ,  $p = 0.024$ ; respectivamente). Las lluvias correspondientes al mes previo se hallaron relacionadas al contenido de agua (Correlación de Spearman,  $r_s = 0.58$ ,  $n = 12$ ,  $p = 0.0446$ ) pero no a la biomasa vegetal (Correlación de Spearman,  $r_s = 0.538$ ,  $n = 12$ ,  $p = 0.0663$ ). Las precipitaciones no se encontraron relacionadas a ninguna de las variables estimadoras de la disponibilidad vegetal ( $p > 0.05$ ).

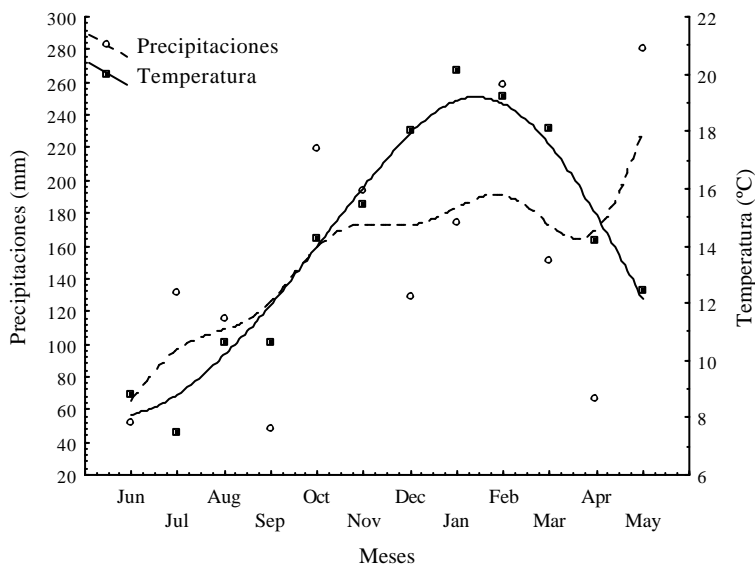
*Efecto de las variables ambientales sobre la reproducción.*- El modelo propuesto para la frecuencia de preñez fue aceptado (Máxima Verosimilitud  $\chi^2 = 12.52$ ,  $gl = 6$ ,  $p =$

0.051) y explicó cerca del 80 % de la varianza en la frecuencia de preñez (Fig. 1.6a). La temperatura mostró un efecto directo pero negativo, mientras que uno indirecto y positivo a través del contenido de agua vegetal, para los cuales ambos coeficientes de vía fueron significativos (Prueba de t,  $p < 0.05$ ; Fig. 1.6a). Asimismo, la biomasa vegetal fue afectada por el contenido de agua, pero no mostró efecto significativo sobre la frecuencia de preñez (Prueba de t,  $p > 0.05$ ; Fig. 1.6a). Por otro lado, las precipitaciones no tuvieron efectos (directos o indirectos) sobre la preñez, ya que sus coeficientes de vía ( $\beta_i$ ) fueron no significativos (Prueba de t,  $p > 0.05$ ; Fig. 1.6a).

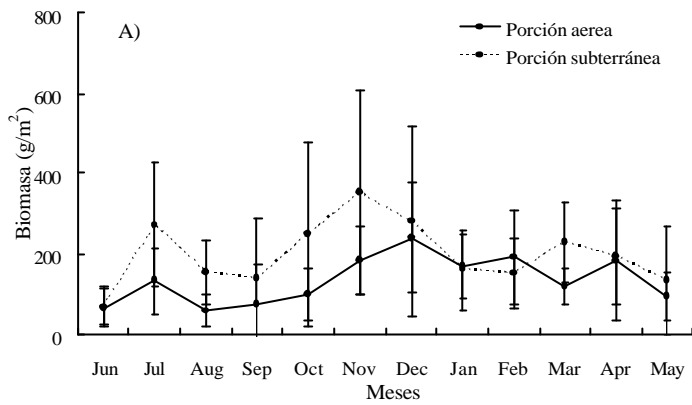
Un modelo similar al empleado para hembras preñadas fue inicialmente probado para la frecuencia de hembras amamantado, pero este rechazado ( $p < 0.05$ ). Dentro de este modelo la variable biomasa se halla involucrada en un alto número de vías, pero ninguna de las contribuye a la capacidad explicativa del modelo. Dada la alta complejidad de modelo y el bajo tamaño muestral, se decidió remover la biomasa ya que el contenido de agua por sí mismo constituye un buen componente de la disponibilidad de alimento (Graham 2003). Subsecuentemente, el mencionado modelo (sin la biomasa vegetal) para la frecuencia de hembras lactando fue aceptado (Máxima Verosimilitud  $\chi^2 = 8.52$ ,  $gl = 4$ ,  $p = 0.074$ ) y explicó cerca del 40 % de la varianza en la frecuencia de las hembras lactando (Fig. 1.5b). La temperatura mostró efectos directos aunque negativos sobre la frecuencia de las hembras lactando, y uno indirecto y positivo a través del contenido de agua vegetal, para los cuales los coeficientes de vía son significativos (Prueba de t,  $p < 0.05$ ; Fig. 1.6b). Sin embargo, las precipitaciones (del mismo y del mes anterior) no tuvieron efectos directos ni indirectos, ya que sus coeficientes de vías ( $\beta_i$ ) fueron no significativos (Pruebas de t,  $p > 0.05$ ; Fig. 1.6b).



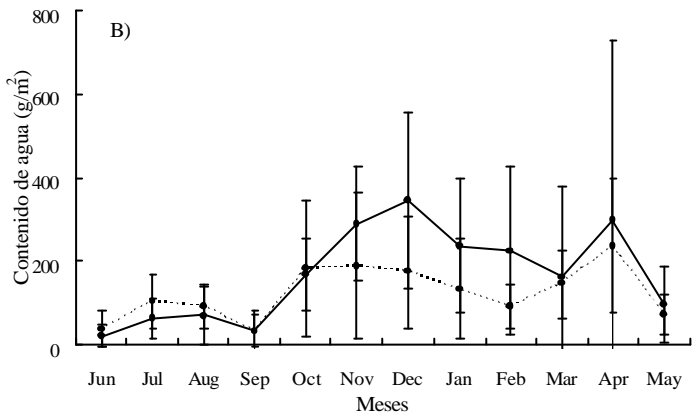
**Fig 1.2.-** Variables reproductivas para hembras de *C. talarum* durante el año de estudio (Junio 2001- Mayo 2002) en Mar de Cobo (57° 56' O, 37° 45' S). (A) Frecuencia de las características reproductivas externas: hembras preñadas (triángulos), hembras con sutura vaginal (cuadrados) y hembras lactando (rombos), a través de los puntos es graficada la línea de tendencia (método mínimos cuadrados ponderados por la distancia). (B) Proporción media mensual ( $\pm$ SD) de tipos celulares presentes en los extendidos vaginales. (C) Promedios mensuales del índice de cornificación (CI= n° de células cornificadas/ n° de células cornificadas + nucleadas), línea de tendencia es graficada a través de los puntos (método mínimos cuadrados ponderados por la distancia). (D) Promedio de la proporción de células de los extendidos vaginales ( $\pm$ SD) para hembras en diferente estado reproductivo (n= 9), activas (n= 6), preñadas (n= 11) y posparto (n= 4) (para más detalles ver la sección Materiales y Métodos).



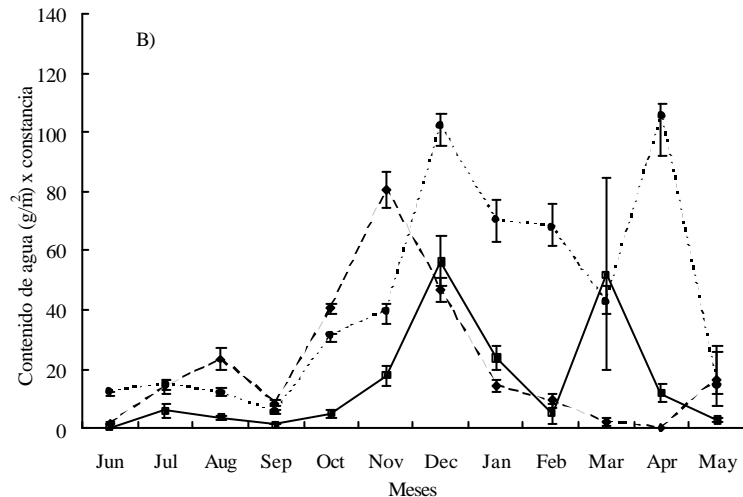
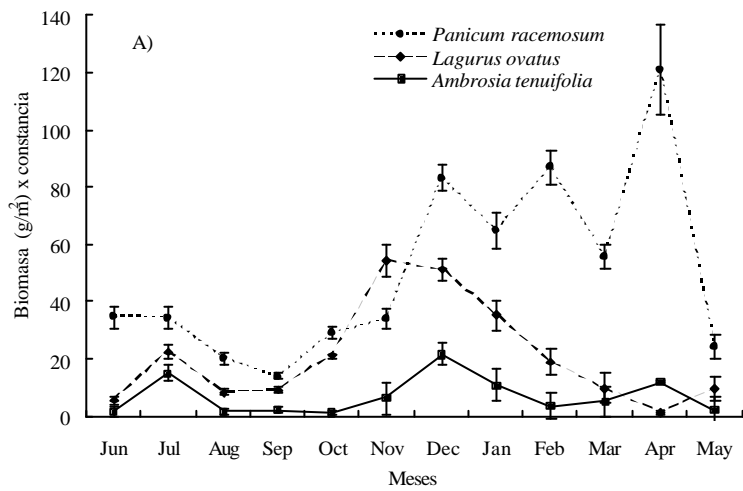
**FIG. 1.3.-** Promedio mensual de temperatura (cuadrados) y precipitaciones mensuales (círculos), se grafican líneas de tendencias (suavizado por mínimos cuadrados ponderados por la distancia). Los datos fueron obtenidos para el año de estudio (Junio 2001- Mayo 2002) en Mar de Cobo (57° 56' O, 37° 45' S).



**FIG. 1.4.-** Promedios ( $\pm$  DE) mensuales de biomasa (A) y contenido de agua (B) de las porciones aérea y subterránea de las especies vegetales presentes en el pastizal durante el año de estudio (Junio 2001- Mayo 2002) en Mar de Cobo ( $57^{\circ} 56' W$ ,  $37^{\circ} 45' S$ ).

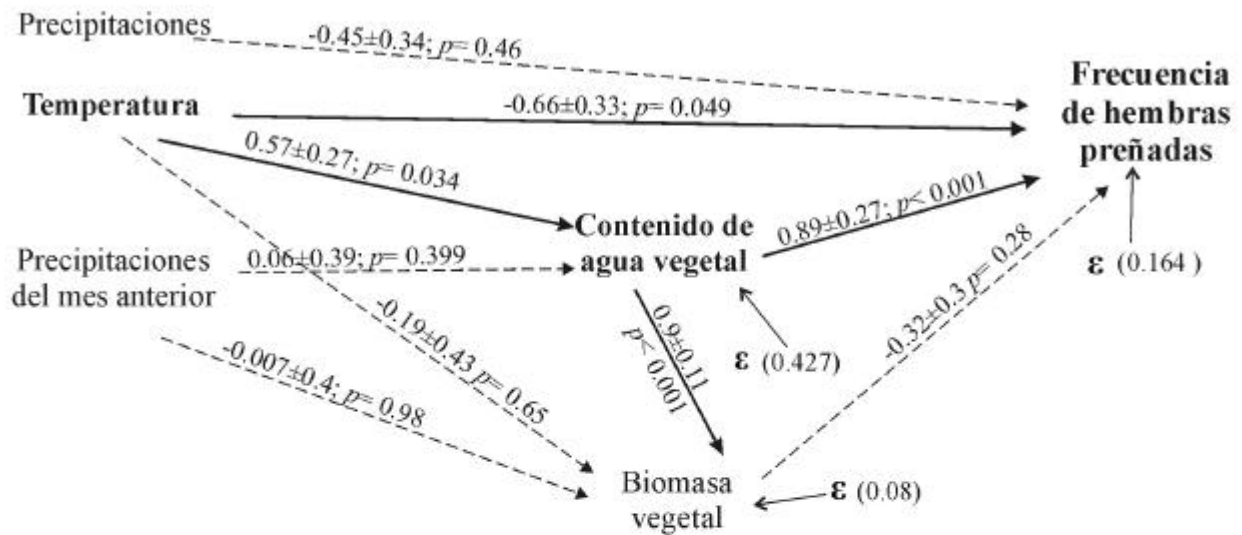


**FIG. 1.5.-** Promedios ( $\pm$  DE) mensuales de biomasa (A) y contenido de agua (B) de la porción aérea de las especies vegetales con mayor constancia durante el año de estudio (Junio 2001- Mayo 2002) en Mar de Cobo ( $57^{\circ} 56' W$ ,  $37^{\circ} 45' S$ ).

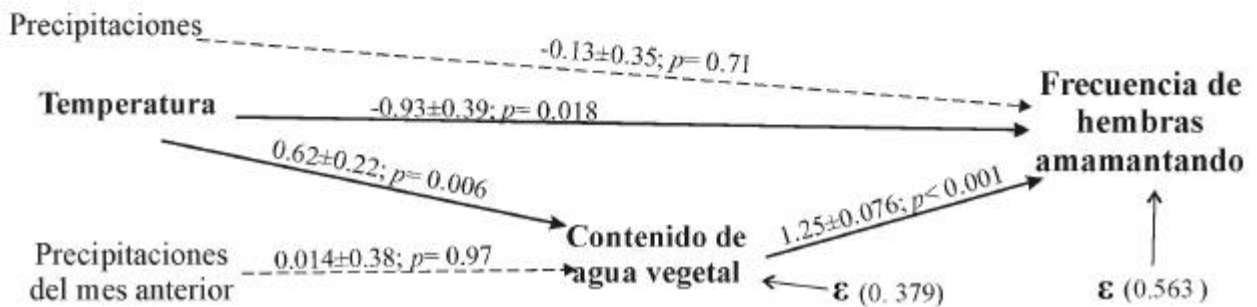


**FIG. 1.6.-** Estructuras causales para la frecuencia de hembras preñadas (A) y frecuencia de hembras lactando (B) mostrando todos los potenciales efectos causales (denotados por flechas; *líneas llenas* denotan relaciones significativas mientras que las *líneas partidas* muestran relaciones no significativas). Los coeficientes de vías ( $\beta \pm DE$ ), y valores de  $p$  son proporcionados para cada relación causal, así como los términos del error ( $\epsilon = 1 - (\beta_1^2 + \dots + \beta_n^2)^{1/2}$ ).

A)  $ML\chi^2 = 12.521$ ,  $gl = 6$ ,  $p = 0.051$



B)  $ML\chi^2 = 8.52$ ,  $gl = 4$ ,  $p = 0.074$



**DISCUSIÓN**

La estación reproductiva observada durante este trabajo fue similar a las obtenidas en trabajos previos para la misma población (Malizia y Busch 1991, Busch *et al.* 1989) y fue adecuadamente descrita por características externas tales como sutura vaginal (actividad reproductiva), pezones alargados (amamantando) y coloración de mucus y embriones

palpables (preñez). La misma comenzó en junio, evidenciada por un incremento en la frecuencia de la sutura vaginal, y seguida por un aumento en las frecuencias de preñez en julio que alcanzara su máximo durante agosto y septiembre. Las líneas de tendencia de sutura y preñez, se comportaron de igual forma pero esta última declinó un mes antes, al mismo tiempo que se observó un claro pico de hembras amamantando en noviembre. Aunque la citología vaginal mostró diversas restricciones para el estudio de hembras en el campo, en los que no se involucra la re-captura y examinación de las mismas hembras silvestres (Shanas *et al.* 1995), se detectaron claras asociaciones entre la caracterización citológica y las características reproductivas externas de las hembras, constituyendo así datos complementarios en el presente estudio. De acuerdo a esto, la estación reproductiva comenzó a finales del otoño y se extendió durante toda la primavera. La predominancia de leucocitos en los extendidos, denotó claramente preñez y mostró su máximo durante septiembre. La presencia de células epiteliales (cornificadas y nucleadas) durante fines de la primavera y verano podría ser atribuida a aquellas hembras que alcanzaron su madurez reproductiva y a aquellas en estro posparto o lactacional (Gilbert 1984). Durante este período, un nuevo pico de leucocitos podría indicar un segundo pulso de preñez. La alta proporción de células nucleadas durante febrero coincidió con una disminución de la biomasa vegetal. La siguiente dominancia de células nucleadas y leucocitos durante otoño podría ser atribuida a hembras posparto e inactivas. También una fase adicional de cornificación durante el mes de marzo, hacia el final del período de estudio, se correspondió con un incremento en la biomasa vegetal en el área, (principalmente representada por *Panicum racemosum* y *Ambrosia tenuifolia*) a comienzos del otoño, representando condiciones favorables para la extensión de la estación reproductiva en *C. talarum*. Este potencial período de receptividad detectado también coincidió con un incremento en la frecuencia de de hembras con sutura vaginal.

A partir de la combinación de información proveniente de las características externas y del análisis de la citología vaginal de hembras de *C. talarum* vivas, así como de las examinadas *posmortem*, se observó que el momento de mayor incidencia de preñez implicaría que las altas demandas energéticas durante la gestación y lactancia (Zenuto *et al.* 2002) fueron privilegiadas, ya que la mayor parte de los nacimientos ocurrieron en el momento que los tejidos vegetales jóvenes (como fue indicado por el porcentaje de contenido de agua vegetal) fueron más abundantes. Los tejidos vegetales jóvenes no solo

proveen una importante fuente de agua sino también un alto contenido proteínico y alta digestibilidad. Además, la mayoría de las preñeces ocurren durante el invierno, tal que los nacimientos se producen en primavera cuando las temperaturas proveen condiciones térmicas favorables para el desarrollo de crías altriciales al nacimiento. Las crías menores de 10 días muestran poca capacidad termorregulatoria y dependen de sus madres en lo que respecta al alimento y provisión de calor a través del contacto materno (Zenuto *et al.* 2002). Diversos estudios han demostrado que un ambiente térmico propicio afecta positivamente la tasa de crecimiento y el desarrollo (ej. comportamental, neural y madurez termorregulatoria, Hill 1992) de crías recién nacidas, favoreciendo así su supervivencia. Esta podría ser la razón por la cual un roedor subterráneo, que habita en latitudes donde las variaciones estacionales térmicas son marcadas (como *C. talarum*), evite los nacimientos en períodos con temperaturas ambiente extremas. Los efectos directos y negativos de la temperatura sobre las frecuencias de hembras amantando y preñadas podría deberse, en parte, a una fuerte influencia de las bajas temperaturas en el comienzo de la estación reproductiva. Por otro lado, las altas temperaturas durante el verano representarían una importante limitante para la regulación térmica de esta especie que requiere de la provisión de alimento en superficie. Se ha observado que el sobrecalentamiento compromete la supervivencia en individuos no reproductivos de esta especie, los cuales poseen muy limitadas capacidades de disipar el calor ya que son incapaces de jadear o sudar (Busch *et al.* 1989).

Las precipitaciones conllevan un incremento en el crecimiento y disponibilidad vegetal (Dennis y Marsh 1997) y por ende estas constituyen una importante factor ambiental que afecta la reproducción en muchas especies de roedores subterráneos. Igualmente, el incremento en la humedad del suelo facilitaría el excavado, y representaría una oportunidad para extender el sistema de túneles así como también incrementar las posibilidades de dispersión de los adultos y subsiguiente apareamiento entre conepecíficos, particularmente para especies de hábitos solitarios (*G. capensis*, *B. suillus*, *B. janetta*, *S. ehrenbergi*; Bennett y Jarvis 1988, Jarvis y Bennett 1990, Rado *et al.* 1992, Herbst *et al.* 2004). Un rol indirecto de las lluvias sobre la reproducción fue sugerido para *H. argentocinereus* mediante la facilitación del acceso a geofitas (Šumbera *et al.* 2003). En el presente estudio, sin embargo no se hallaron efectos de las precipitaciones sobre la estación reproductiva de *C. talarum*. Este resultado no fue inesperado, los suelos ocupados por *C.*

*talarum* son arenosos y blandos (Comparatore *et al.* 1991, Luna *et al.* 2002) y por lo tanto, el incremento de la humedad del mismo no representaría una ventaja para la excavación. Más aún, los sistemas de túneles individuales no se hallan conectados en esta especie (Antinuchi y Busch 1992), por lo que se espera que la búsqueda de parejas sea realizada sobre superficie. Sin embargo tampoco se hallaron efectos indirectos de las lluvias en la reproducción por medio del incremento en la provisión de alimento. Esto podría deberse a que en el área no se verifico déficit hídrico (Burgos y Vidal 1951). Específicamente, las precipitaciones anuales durante el año de estudio fueron particularmente altas (1500 mm), si se considera el promedio anual para los últimos 10 años (809 mm) en el área de estudio.

Entonces, *C. talarum* se comporta como oportunista en lo que respecta a su actividad reproductiva; mientras que los machos no sufren regresión testicular y muestran producción de esperma durante todo el año (Malizia y Busch 1991), las hembras (como es mostrado en el presente trabajo), ajustan su estación reproductiva de acuerdo a las variaciones en las condiciones ambientales. Así las hembras, que constituyen el sexo con mayor inversión energética en la reproducción, serían más sensibles a las condiciones ambientales a las cuales responderían modulando tanto el inicio como la extensión de la estación reproductiva.

La disponibilidad energética para los procesos reproductivos depende de la relación entre los niveles de consumo (componentes calóricos y nutricionales) y la energía demandada por otros procesos como mantenimiento celular, crecimiento y termorregulación. En *C. talarum*, como en pequeños mamíferos donde la proporción superficie/ volumen es grande, dicha característica resulta en altos costos de termorregulación, representando en esta especie aproximadamente el 30 % de su presupuesto energético anual (Antinuchi *et al.* en prensa). El tamaño pequeño, además, representa una limitante en la cantidad de reservas de grasas, resultando en una estrecha dependencia de la disponibilidad de alimento y haciendo de esta la principal restricción en la provisión energética para sustentar la reproducción. Esto es aun más pronunciado cuando las hembras experimentan el parto, lo cual requiere afrontar simultáneamente gastos relacionados con la lactancia y la preñez. Como estrategia complementaria en *C. talarum*, se ha encontrado diferencias en la masa corporal de hembras posparto y no reproductivas probablemente a causa de la acumulación de reservas grasas durante la preñez y como preparación para la lactancia (Zenuto *et al.* 2002). Sin

embargo, una aproximación puramente energética podría resultar insatisfactoria para analizar las limitantes de la reproducción ya que también debería ser considerada la variación temporal en el contenido nutricional de la vegetación (Bronson y Perrigo 1987). En este contexto, sería de interés investigar si el incremento de *Medicago* durante noviembre participa favoreciendo el estro posparto.

Dentro de los determinantes de la reproducción estacional, tres factores son ampliamente reconocidos: las condiciones del ambiente físico, provisión de alimento y ambiente social. La relación entre factores físicos y dietarios son los factores últimos que modelan el esfuerzo reproductivo anual, mientras que los factores sociales tendrían un rol de ajuste fino de la estación reproductiva (Bronson y Perrigo 1987). Para aquellos roedores que dependen estrictamente del hábitat subterráneo, se espera que releguen el uso de las señales proximales más comúnmente empleadas, como fotoperíodo; en cambio, las señales ambientales podrían ser térmicas (cambios en la temperatura de la cueva) o nutricionales (órganos vegetales de almacenamiento; Bennett *et al.* 2000). *Ctenomys talarum* concentra la mayor parte de sus actividades diarias dentro de los túneles subterráneos pero emerge frecuentemente para forrajear, por lo que se encontrarían más expuestos a las variaciones en las horas de luz y temperaturas ambientales, pudiendo ser usadas como pistas indicativas que permitan así concentrar sus actividades de mayor demanda energética cuando las condiciones ambientales sean las más favorables.

En resumen, *C. talarum* ajusta su actividad reproductiva de acuerdo a condiciones ambientales de manera que los altos requerimientos energéticos de la lactancia y el posparto puedan ser asegurados. Por otro lado, los nacimientos ocurren cuando la temperatura ambiente es más favorable para crías altriciales, como una estrategia que permite asegurar el crecimiento y por ende la supervivencia.

**BIBLIOGRAFÍA**

- ANDERSEN, DC Y JA MACMAHON. 1981. Population dynamics and bioenergetics of a fossorial herbivore, *Thomomys talpoides* (Rodentia: Geomyidae), in a spruce-fir sere. *Ecol Monog* 51:179-202.
- ANTINUCHI, CD Y C BUSCH. 1992. Burrow structure in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Z Säugertierk* 57:163-168.
- ANTINUCHI, CD, RR ZENUTO, F LUNA, AP CUTRERA, PP PERISINOTTI Y C. BUSCH. (en prensa). A view from energy budget in the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomidae). En: Essays In honor of Oliver Pearson. (D. Kelt, ed.) University of California Publications in Zoology Series. California.
- BEGALL, S, Y MH GALLARDO. 2000. *Spalacopus cyanus* (Rodentia: Octodontidae): an extremist in tunnel constructing and food storing among subterranean mammals. *J Zool* 251: 53-60
- BENNETT, NC, Y JUMJARVIS. 1988. The reproductive biology of Cape mole-rat *Georychus capensis* (Rodentia: bathiergidae). *J Mamm* 69:293-302.
- BENNETT, NC, CG FAUKLES Y AJ MOLTENO. 2000. Reproduction in subterranean rodents. Pp. 145-182. En *Life underground: the biology of subterranean rodents*. (E. A. Lacey, J. L. Patton y G. N. Cameron, eds). The University of Chicago Press, Chicago, Illinois.
- BERGALLO, HG, Y WE MAGNUSSON. 1999. Effects of climate and food availability on four rodent species in southeastern Brazil. *J Mamm* 80:472-486.
- BRONSON, FH. 1989. *Mammalian reproductive biology*. The University of Chicago Press, Chicago, USA.
- BRONSON, FH, Y G PERRIGO. 1987. Seasonal regulation of reproduction in muroid rodents. *American Zoologist* 27:929-940.
- BURGOS, JJ, Y AL VIDAL. 1951. Los climas de la Republica Argentina, según la nueva clasificación de Thornthwaite. *Meteoros* 1:3-32.
- BUSCH, C. 1989. Metabolic rate and thermoregulation in two species of tuco-tuco, *Ctenomys talarum* and *Ctenomys australis* (Caviomorpha, Octodontidae). *Comparative Biochemistry and Physiology A* 93:345-347.
- BUSCH, C, CD ANTINUCHI, JC DEL VALLE, MJ KITTLEIN, AI MALIZIA, AI VASSALLO Y RR ZENUTO. 2000. Population ecology of subterranean rodents. Pp 183-226 in *Life underground: the biology of subterranean rodents*. (E. A. Lacey, J. L. Patton y G. N. Cameron, eds). The University of Chicago Press, Chicago, Illinois.
- COMPARATORE, VM, NO MACEIRA Y C BUSCH. 1991. Habita relations in *Ctenomys talarum* (Caviomorpha Octodontida) in natural grassland. *Z Säugertierk* 56:112-118
- COOPER, RL, JM GOLDMAN Y JG VANDERBERGH. 1993. Monitoring of the estrous cycle in the laboratory rodent by vaginal lavage. Pp. 45-56 En: *Methods in Reproductive Toxicology* (R. Chapin y J. Heindel, eds.). Academic Press, San Diego, USA.
- CRESPI, BJ, Y FL BOOKSTEIN. 1989. A path-analytic model for measurement of selection of morphology. *Evolution* 43:18-28.
- DENNIS, AJ, Y H MARSH. 1997. Seasonal reproduction in Musky Rat-kangaroos, *Hypsiprymnodon moschatus*: a response to changes in resource availability. *Wildlife Research* 24:561-578.
- DEL VALLE, JC, MI LOHFELT, VM COMPARATORE, MS CID Y C BUSCH. 2001. Feeding selectivity and food preference of *Ctenomys talarum* (tuco-tuco). *Mamm Biol* 66:165-173.
- DEL VALLE, JC. 2005. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Mar del Plata, Marzo 2005.
- EL-BARKY, HA, WM ZAHRAN Y TJ BARTNESS. 1999. Control of reproductive and energetic status by environmental cues in desert rodent, Shaw's Jird. *Physiol Behav* 66:657-666.
- EVANS, JM, Y TJ SAVAGE. 1970. The collection of vaginal smears from bitches. *Veterinary Records* 87:598-599.
- GILBERT, AN. 1984. Postpartum and lactational estrus: A comparative analysis in Rodentia. *J Comp Psychol* 98:232-245
- GRAHAM, MH. 2003. Confronting multicollinearity in ecological multiple regression. *Ecology* 84: 2809-2815. 479

- HARBORNE, JB. 1994. Introduction to Ecological Biochemistry. Fourth Edition. Academic Press, New York, USA.
- HERBST, M, JUM JARVIS Y NC BENNETT. 2004. A field assessment of reproductive seasonality in the threatened wild Namaqua dune mole-rat (*Bathyergus janetta*). *J Zool (London)* 263:259-268.
- HILL, RW. 1992. The altricial/precocial contrast in the thermal relations and energetics of small mammals. Pp. 122-159 En *Mammalian Energetics: Interdisciplinary Views of Metabolism and Reproduction*. (Tomasi, T, y T Horton, Eds.). Cornell University Press, Ithaca, New York.
- IMS, RA. 1990. The ecology and evolution of reproductive synchrony. *Tree* 5:135.
- JARVIS, JUM, Y NC BENNETT. 1990. The evolutionary history, population biology and social structure of African mole-rats: family Bathyergidae. *Prog Clin Biol Res* 335:97-128.
- LEGENDRE, P, Y L LEGENDRE. 1998. Numerical ecology. Segunda Edición. Elsevier science, Amsterdam, Netherlands.
- LINCOLN, GA, Y RV SHORT. 1980. Seasonal breeding: Nature's contraceptive. *Rec Progr Horm Res* 3:1-52.
- LUNA, F, CD ANTINUCHI Y C BUSCH. 2002. Digging energetics in the South American rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia, Ctenomyidae) *Can J Zool* 80:2144-2149.
- MACFARLANE, JD, Y JM TAYLOR. 1982. Nature of estrus and ovulation in *Microtus townsendii* (Bachman). *J Mamm* 63:104-109.
- MALIZIA, AI, Y C BUSCH. 1991. Reproductive parameters and growth in the fossorial rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *Mammalia* 55:293-305.
- MATEUCCI, SD, Y A COLMA. 1982. Metodología para el Estudio de la Vegetación. Secretaría General de la OEA. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Washington.
- RADO, R, G BRONCHTI, Z WOLLBERG Y J TERKEL. 1992. Sensitivity to light of the blind mole rat: behavioral and neuroanatomical study. *Isr J Zool* 38:323-331.
- PLACE, NJ, Y GJ KENAGY. 2000. Seasonal changes in plasma testosterone and glucocorticosteroids in free-living male yellow-pine chipmunks and the response to capture and handling. *J Comp Physiol B* 170:245-251.
- SAWREY, DK, Y DA DEWSBURY. 1985. Control of ovulation, vaginal estrus and behavioral receptivity in voles (*Microtus*). *Neurosci Biobehav Rev* 9:563-571.
- SHANAS, U, G HETH, E NEVO, R SHALGI Y J TERKEL. 1995. Reproductive behaviour in the female blind mole rat (*Spalax ehrenbergi*). *J Zool London* 137:195- 210.
- SMOLEN, MJ, HH GENOWAYS Y RJ BAKER. 1980. Demographic and reproductive parameters of the yellow-cheeked pocket gopher (*Pappogeomys castanops*). *J Mamm* 61:224-236.
- ŠUMBERA, R, H BURDA, Y WN CHITAUKALI. 2003. Reproductive biology of a solitary subterranean bathyergid rodent, the silvery mole-rat (*Heliophobius argenteocinereus*). *J Mamm* 84:278-287.
- ŠUMBERA, R, WN CHITAUKALI, M ELICHOVÁ, J KUDOVÁ Y H BURDA. 2004. Microclimatic stability in burrows of Afrotropical solitary bathyergid rodent, the silvery mole rat (*Heliophobius argenteocinereus*). *J Zool* 263:409-416.
- WADE, GN. 1998. Energy balance, effects on reproduction. En: Encyclopedia of reproduction. (Knobil, ER, y JD Neill, Eds.) Academic Press, New York.
- WEIR, BJ. 1979. Reproductive characteristic of hystricomorph rodents. *Symp Zool Soc London* 34:265-301.
- ZENUTO, RR, AI MALIZIA Y C BUSCH. 1999. Sexual size dimorphism, testes size and mating system in two populations of *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *J Nat Hist* 33:305- 314
- ZENUTO, RR, AI VASSALLO Y C BUSCH. 2001. A method to study social and reproductive behaviour of subterranean rodents in captivity. *Acta Theriol* 46:161- 170.
- ZENUTO, RR, CD ANTINUCHI Y C BUSCH. 2002. Bioenergetics of reproduction and pup development in a subterranean rodent (*Ctenomys talarum*). *Physiol Biochem Zool* 75:469-478.

**APÉNDICE I.-** Principales especies vegetales encontradas en el área de estudio (Mar de Cobo; 57° 56' W, 37° 45' S) y su constancia promedio anual. M: monocotiledoneas, D: dicotiledoneas.

Especies	Constancia promedio anual
<i>Panicum racemosum</i> (M)	0.849
<i>Lagurus ovatus</i> (M)	0.605
<i>Ambrosia tenuifolia</i> (D)	0.451
<i>Hydrocotyle bonaeriensis</i> (D)	0.419
<i>Poacea</i> (M)	0.287
<i>Disticlis spicata</i> (M)	0.189
<i>Baccharis sp.</i> (D)	0.137
<i>Medicago minima</i> (D)	0.066
<i>Melilotus officinalis</i> (D)	0.062
<i>Medicago lupulina</i> (D)	0.037
<i>Magiocrarpus pignatus</i> (D)	-
<i>Senecio sp.</i> (D)	-

## CAPÍTULO II



El presente capítulo ha sido enviado para su publicación como:  
FANJUL, MS, RR ZENUTO Y C BUSCH. Female reproductive responses to photoperiod and male odour in the subterranean rodent tuco- tuco, *Ctenomys talarum*. *Journal of Zoology, The Journal of The Zoological Society of London, UK.*

## INTRODUCCIÓN

La compleja integración de los procesos fisiológicos relacionados con la regulación de la reproducción por señales ambientales específicas tiene profundas consecuencias en la supervivencia y el éxito reproductivo. Una apropiada sincronización de la reproducción favorece la supervivencia de los progenitores a la vez que hace que las condiciones y/ o los recursos sean suficientes para que el cuidado y la crianza de la progenie pueda ser asegurado (Bronson 1989, Ims 1990). La reproducción es controlada finalmente por la fisiología hormonal, que es inducida en primer lugar por factores ambientales tales como fotoperíodo, temperatura, señales químicas, señales visuales y/ o estimulación táctil; los individuos, a su vez, pueden responder principalmente a uno de ellos o bien necesitar la contribución de varios (Lombardi 1998).

La mayoría de las especies de mamíferos que habitan zonas templadas están expuestas a las fluctuaciones de sus ambientes. La regulación de la reproducción estacional involucra por ende un complejo de factores dietarios y ambientales: alimento, precipitaciones, humedad y temperatura (Bronson y Perrigo 1987). Algunas especies de mamíferos responden directamente a condiciones climáticas y/o dietarias, sin embargo otras optan por el empleo de señales ambientales para estimar la época del año donde la probabilidad de éxito sea máxima. La progresión de los cambios en el fotoperíodo es un indicador ambiental preciso del momento de año (Turek y Cambell 1979) y es frecuentemente empleado en áreas templadas (Bronson 1989). Finalmente, los factores sociales podrían ser de importancia en el ajuste fino tanto del inicio como de la duración de la estación reproductiva (Bronson y Perrigo 1987). Las feromonas emitidas por los machos han mostrado en muchas especies tener una participación en de la fisiología reproductiva de la hembra, regulando el comienzo de la pubertad e induciendo la sincronización del estro (Vandenbergh 1994, Dodge *et al.* 2002).

Los roedores subterráneos habitan en cuevas bajo tierra y viven la mayor parte de sus vidas bajo la superficie (Lacey *et al.* 2000). El hábitat subterráneo es considerado más estable que el de superficie, mostrando menores fluctuaciones de temperatura y humedad. Al mismo tiempo, la ausencia de luz, las restricciones en el intercambio gaseoso y los costos energéticos de la excavación representan desafíos ambientales para animales subterráneos (Buffenstein 2000). Estudios reproductivos realizados en especies subterráneas han mostrado que muchas especies solitarias poseen un patrón de reproducción estacional, donde la habilidad de percibir condiciones ambientales es crítica para alcanzar una respuesta eficiente a estímulos externos.

La pista más común empleada por los roedores de superficie –fotoperíodo- sería relegada en los subterráneos, mientras que otras pistas ambientales estarían relacionadas a la reproducción, como temperatura, lluvias o alimento (Bennett *et al.* 2000). Aunque la vida en la oscuridad es asociada con una notable reducción de los ojos (Stein 2000) y la consecuente disminución de la capacidad visual, esto no necesariamente representa una incapacidad de detectar la luz, tal como fue probado en *S. ehrenbergi* (Cooper *et al.* 1993a). Además, la importancia de las actividades en superficie debiera ser considerada en el momento de evaluar las capacidades de empleo del fotoperíodo en roedores subterráneos.

*Ctenomys talarum* es un roedor subterráneo solitario que se reproduce estacionalmente. La estación reproductiva natural de esta especie ha sido estudiada a través del relevamiento por captura muerta y se extiende 9 meses (junio- febrero), comenzando al final del otoño (Busch *et al.* 1989, Malizia y Busch 1991), y debido a que la preñez se desarrolla durante 95 días (Zenuto *et al.* 2001), la mayoría de los nacimientos ocurren durante la primavera. Los machos son capaces de reproducirse a lo largo de todo el año luego de que alcanzan su madurez reproductiva, ya que no sufren regresión testicular y siempre muestran esperma en sus epidídimos (Malizia y Busch 1991). Sin embargo las hembras parecen ajustar su estación reproductiva en relación a consideraciones ambientales (ver Cap I). Los ciclos reproductivos de larga y mediana duración requieren que el apareamiento ocurra en la época del año más rigurosa de manera de sincronizar aquellas fases más sensibles del ciclo (preñez y lactancia) de las hembras con aquellas épocas más benévolas del año (Clarke 1981). El empleo de una señal indicadora precisa permitiría a las hembras de *C. talarum* iniciar su reproducción de forma que los altos requerimientos de este proceso sean asegurados (Zenuto *et al.* 2002).

Dos patrones principales de ovulación han sido encontrados en mamíferos (Sawrey y Dewsbury 1985). Los ovuladores espontáneos muestran un ciclo continuo ovulatorio y hormonal independientemente de la ocurrencia de contacto físico y/o químico con un macho. Por otro lado, en los ovuladores inducidos las variaciones en niveles de hormonas sexuales y la ovulación dependen de la presencia del macho. La activación del estro ovuladores en inducidos estrictos requiere el apareamiento (Cohen-Parsons y Carter 1988) mientras que en otros, esta activación puede darse a través de señales visuales, auditivas y una gran variedad de señales odoríferas (Milligan 1975). La receptividad comportamental es predicha a menudo en los ovuladores inducidos por un predominio de las células cornificadas en los extendidos vaginales (Sawrey y Dewsbury 1985, Cooper *et al.* 1993b). No obstante, la receptividad a la

cópula no se restringe a períodos de cornificación sino que podría ocurrir cuando el epitelio es mayormente nucleado (Breed 1967). Al presente, el conocimiento acerca de la naturaleza del estro en *C. talarum* se restringe a la mención realizada por Weir (1974), quien sugirió que tuco-tucos son ovuladores inducidos ya que solo encontró cuerpos luteos en hembras que habían copulado. Por otro lado, *C. talarum* marca sistemáticamente el sustrato con señales químicas contenidas en la orina y heces conteniendo información acerca de la identidad individual, de género y el estado reproductivo, (Zenuto y Fanjul 2002, Fanjul *et al.* 2003, Zenuto *et al.* 2004) mientras colectan material vegetal en superficie en cercanías de las aperturas de la cuevas. Dichas señales pueden ser percibidas por vecinos durante sus excursiones de forrajeo. El marcado con olores detectado por un conoespecífico del sexo opuesto podría influenciar su comportamiento reproductivo (ver Cap III), i.e. estimular la receptividad en hembras.

Comprender la regulación de la reproducción de los mamíferos es una tarea difícil, debido a que diversos factores ambientales están involucrados y muchos de ellos varían al mismo tiempo y en diferente base temporal (Bronson y Perrigo 1987). La disponibilidad de alimento, así como un ambiente térmico favorable, fue positivamente relacionada con la preñez y la lactancia de *C. talarum* (ver Cap. I). Ciclos reproductivos largos y el forrajeo en superficie contribuirían al empleo del fotoperíodo en la sincronización del inicio de la reproducción y reaseguro de condiciones favorables para las hembras y las crías. Al mismo tiempo, se espera que el olor de un macho incremente la receptividad de las hembras.

El presente capítulo evalúa la influencia inmediata del fotoperíodo y los olores de machos en la sincronización de la reproducción en el roedor subterráneo *C. talarum* a través de la examinación del epitelio vaginal. Específicamente, se determinó: a) si un fotoperíodo de días cortos determina el inicio de la reproducción a través de un incremento en la receptividad de las hembras (evidenciado a través del incremento de células epiteliales y cornificadas en el epitelio) y, b) si los olores de los machos interactúan con el fotoperíodo, produciendo una mayor receptividad en aquellas hembras expuestas a días cortos y olor de machos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

*Captura de los animales y condiciones de cautiverio.* Veintiocho hembras maduras de *C. talarum* fueron capturadas en el campo (Mar de Cobo, Argentina, 37°45'S, 57°56' O) durante la estación no reproductiva (febrero 2003, 14L: 10O). Todos los animales fueron encerrados

individualmente en cajas plásticas de 42 x 34 x 26 cm, con 3 cm de viruta de madera como lecho a temperatura ambiente. El alimento fue provisto *ad libitum* y consistió de zanahorias, batatas, achicoria catalogna (*Cichorium intybus*), choclo, pastos y semillas de girasol. Debido a que los individuos de *C. talarum* no beben agua, vegetales frescos les fueron provistos diariamente para asegurar su provisión de agua.

*Procedimiento experimental.* Durante diez días previos al comienzo del experimento, y mantenidos bajo fotoperíodo de verano (14L: 10O), se permitió que los animales se adaptasen a las condiciones de laboratorio. El experimento se extendió durante 120 días, comenzando el 7 de marzo (días largos-verano, estación no reproductiva en el campo) al 7 de julio (días cortos-invierno, estación reproductiva en el campo). Las hembras fueron asignadas al azar a tres diferentes regímenes de luz. El grupo 1, 'Natural' (NA, n=8), fue expuesto al fotoperíodo natural que fue regularmente ajustado de acuerdo al momento del año hasta alcanzar el fotoperíodo más corto a partir del día 25 del experimento (correspondiente al día de inicio del invierno). El grupo 2, 'Verano constante' (VC, n=9), fue expuesto al fotoperíodo de verano de forma permanente (días largos 14L: 10O). El grupo 3, 'Invierno temprano' (IT, n=10), fue expuesto al fotoperíodo invernal (días cortos 8L: 16O), el cual fue alcanzado a través de cambios regulares durante un período de 25 días desde el inicio del experimento. Las muestras del epitelio vaginal fueron tomadas diariamente para cada hembra, de acuerdo a la metodología en el capítulo I.

*Exposición al olor.* Para verificar si las pistas químicas influyen la receptividad de las hembras, el régimen lumínico fue continuado por 15 días. Durante este periodo se tomó aleatoriamente la mitad de las hembras en cada régimen lumínico la cual fue expuesta al olor de un macho no familiar reproductivo. Las muestras de olor fueron reemplazadas cada 48 hs., fueron obtenidas de la viruta (secreciones corporales + orina + heces) tomada de las cajas de los machos que permanecieron en ellas por al menos 7 días y fueron colocadas en cápsulas de Petri cubiertas por una malla metálica con una abertura donde los animales pudieran oler y tocar la fuente de olor. Dicho método ha probado su resultado en la habituación con olores en trabajos previos con *C. talarum* (Zenuto *et al*, 2004).

*Análisis de los datos.* Para cada muestra de epitelio vaginal tomada se registró el número y la proporción de los tipos celulares: células nucleadas (N), cornificadas (C) y leucocitos (L). Se evaluó la proporción de células epiteliales sumando los porcentajes de células cornificadas y células nucleadas (CN) presentes en cada muestra. Se calculó el promedio de células

epiteliales para cada hembra tomando períodos de 10 días. Además, de acuerdo a observaciones realizadas en cautiverio, las hembras que presentaron epitelios vaginales con un promedio de 20% de células epiteliales se mostraron receptivas, copularon y una de ellas tuvo cría (observación de 5 hembras; ver Cap IV). En consecuencia, se registró un día como CN (episodio CN) cuando el epitelio contenía al menos 25% de células epiteliales (C + N). Con el objeto de evaluar las tendencias de las mencionadas variables se calculó: el 'total de episodios CN' que presentó cada hembra durante todo el período de estudio, el promedio y el error estándar para cada régimen de luz; y también los 'episodios CN' que presentó cada hembra en períodos de 10 días para cada uno de los cuales se calculó, a su vez el promedio y el error estándar para cada régimen de luz. A partir de la proporción celular en los epitelios se calculó el índice de cornificación ( $IC = n^{\circ} \text{ cel. cornificadas} / (n^{\circ} \text{ cel. nucleadas} + n^{\circ} \text{ cel. cornificadas})$ ) (Evans y Savage 1970). Para describir la tendencia de dichas variables se empleó el método de mínimos cuadrados ponderados por la distancia ('Distance-Weighted Least-Squares smoothing') (Statistica 6.0, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Las diferencias entre los tratamientos fueron evaluadas a través de los análisis de la varianza apropiados. Los efectos del fotoperíodo sobre el tiempo fueron evaluados mediante pruebas de ANOVA de medidas repetidas paramétricas o no paramétricas dependiendo si los datos se ajustaban a los supuestos de parametricidad del modelo (normalidad, homocedasticidad). Para evaluar la interacción del fotoperíodo, la exposición a olores de machos y las variaciones temporales en las hembras expuestas, se compararon los promedios individuales de las mismas variables estimadas 15 días antes y 15 después de la exposición a través de un ANOVA de tres vías para medidas repetidas en el tiempo.

## RESULTADOS

Aunque las hembras fueron asignadas a cada tratamiento de forma aleatoria, se probó la homogeneidad de la proporción de células epiteliales (Kruskal Wallis,  $H_2 = 0.647$ ,  $p = 0.724$ ), así como del índice de cornificación (Kruskal Wallis,  $H_2 = 0.093$ ,  $p = 0.954$ ) al momento de la exposición a los tratamientos. Las respuestas de las hembras a los diferentes tratamientos se caracterizaron principalmente por una alta varianza. Las hembras sujetas a 'Invierno temprano' (IT) mostraron un pequeño incremento en el número de episodios CN durante la duración total del experimento (120 días), pero la alta variabilidad en la respuesta individual evitó la detección estadística de estas diferencias entre tratamientos (Kruskal-Wallis;  $H_2 =$

0.081,  $p=0.961$ ). Las hembras mostraron un promedio de  $37.667 \pm 12.23$  (media  $\pm$  EE; rango: 2-96) de episodios CN totales para 'Verano constante' (VC),  $43.10 \pm 11.99$  (rango: 5-101) para 'Invierno temprano' (IT), y  $38.87 \pm 12.71$  (rango: 5-82) para 'Natural' (NA). El mismo patrón fue encontrado para el porcentaje de células epiteliales en los extendidos, no hallándose diferencias entre las hembras expuestas a fotoperíodo VC (media  $\pm$  EE=  $21.10 \pm 4.70$ , rango: 4.64- 42.96), IT ( $23.32 \pm 4.73$ , rango: 7.41- 44.04) y NA ( $21.69 \pm 5.11$ , rango: 7.29- 40.06; Kruskal-Wallis;  $H_2=0.024$ ,  $p=0.988$ ). Tampoco fueron detectadas diferencias para el índice de cornificación entre las hembras expuestas a los tres regímenes de fotoperíodos (ANOVA,  $F_2=0.583$ ,  $p=0.566$ ). Las hembras expuestas al VC mostraron un IC promedio =  $0.279 \pm 0.016$  (EE; rango: 0.205- 0.374), mientras que para aquellas en IT fue de  $0.255 \pm 0.023$  (rango: 0.175- 0.415), y de  $0.252 \pm 0.016$  (rango: 0.186- 0.313) para NA.

El patrón temporal de los episodios CN mostró características interesantes (Figura 2.1). Las hembras bajo el fotoperíodo VC sufrieron un número variable de episodios aunque fluctuaron alrededor de un valor semejante, mientras que aquellas expuestas a fotoperíodos IE y NA, mostraron una clara curva de episodios CN. Las hembras expuestas a fotoperíodo IT presentaron un pico de episodios CN durante el día 20 luego de haber alcanzado el fotoperíodo invernal pero en las hembras sujetas a fotoperíodo NA el pico de episodios CN se mostró unos pocos días después de haberse alcanzado la estación reproductiva natural- 30 días antes del comienzo del fotoperíodo invernal-. Sin embargo, la gran variabilidad interindividual de la respuesta impidió la detección estadística del efecto del fotoperíodo sobre los episodios CN cuando ambos factores, tanto tiempo como fotoperíodo, eran considerados. En consecuencia, no se hallaron efectos sobre episodios CN del tratamiento de regímenes de luz solo, así como su interacción con el tiempo, mientras que se detectó una diferencia significativa marginal para los períodos de tiempo (MR ANOVA de dos vías, Tabla 2.1). Un análisis más detallado sobre el patrón temporal de los episodios CN reveló la respuesta al fotoperíodo de las hembras de *C. talarum*. No se hallaron diferencias entre los periodos de tiempo para las tratamientos VC y NA (Friedman MR ANOVA on ranks:  $\chi^2_{11}=15.119$ ,  $p=0.117$ ;  $\chi^2_{11}=10.598$ ,  $p=0.478$ , respectivamente) mientras que para invierno temprano IT, se hallaron diferencias temporales (MR ANOVA,  $F_{11}=2.509$ ,  $p=0.008$ ), distinguiendo los periodos que comprenden entre el día 30 a 70 del tratamiento que difirieron de los periodos iniciales y subsecuentes (Holm-Sidak método de comparaciones múltiples,  $p<0.05$ ).

Cuando se evaluó la proporción de células epiteliales en los extendidos (Fig 2.2), el patrón

temporal hallado fue similar al obtenido para episodios CN, pero no se hallaron efectos de los tratamientos de fotoperíodo, periodos de tiempo, así como la interacción entre ambos (MR ANOVA de dos vías, Tabla 2.1). Además, no se hallaron diferencias entre los periodos de tiempo cuando cada fotoperíodo fue analizado (Friedman RM ANOVA on ranks:  $\chi^2_{11} = 14.846$ ,  $p = 0.190$ ;  $\chi^2_{11} = 14.692$ ,  $p = 0.197$ ,  $\chi^2_{11} = 16.558$ ,  $p = 0.122$  para VC, IT y NA respectivamente).

El análisis temporal del índice de cornificación (IC, Fig 2.3) mostró algunas diferencias con respecto a los episodios CN y la proporción de células epiteliales. Las hembras expuestas a todos los tratamientos de fotoperíodo mostraron un pico en el IC cercano al día 40 del experimento. Luego de esto, el epitelio vaginal se mostró relativamente constante tanto para el tratamiento VC como IT mientras que pudo observarse un moderado incremento durante el último mes de experimentación (3 últimos periodos) del tratamiento NA. No se detectaron efectos del tratamiento ni su interacción con el tiempo, sin embargo el IC varió a lo largo del período de experimentación independientemente del régimen de luz (MR ANOVA de dos vías, Tabla 2.1). Aunque no se hallaron diferencias entre los periodos de tiempo para VC, una diferencia significativa marginal fue detectada para el fotoperíodo NA (MR ANOVA  $F_{11} = 1.06$ ,  $p = 0.401$  y  $F_{11} = 1.748$ ,  $p = 0.074$ ). Para IT, se detectaron diferencias temporales para la variación en el IC (MR ANOVA  $F_{11} = 2.25$ ,  $p = 0.017$ ): el periodo 4 difirió significativamente del 11 (Tukey *a posteriori* comparación múltiple,  $q = 5.32$ ,  $p = 0.014$ ). Debe ser notado que a pesar que no se halló una completa cornificación durante el presente estudio, casos aislados de cornificación total y espontánea fueron detectados en hembras bajo las mismas condiciones de cautiverio y sin contacto con el macho o estimulación mediante olores. Las hembras en el presente estudio mostraron mayoritariamente una baja proporción de células cornificadas (Fig 2.4) y solo 5 individuos ( $n = 2$ , 1 y 2 hembras para VC, IT y NA, respectivamente) mostraron epitelios vaginales con 60-80 % de células cornificadas durante el periodo de estudio.

**Respuesta al olor.** Los episodios CN, la proporción CN y el IC no fueron afectados por el tratamiento del fotoperíodo (VC, IT y NA regímenes de horas-luz), período de tiempo (15 días antes y después de la exposición al olor) y estímulo químico (con o sin estímulo odorífero del macho). De la misma forma, los parámetros reproductivos de la respuesta de las hembras no se vieron afectados por la interacción entre los tres factores mencionados anteriormente (MR ANOVA de tres vías, Tabla 2.2, Fig. 2.5).

Finalmente, se evaluó la respuesta reproductiva a corto plazo en relación al contacto con

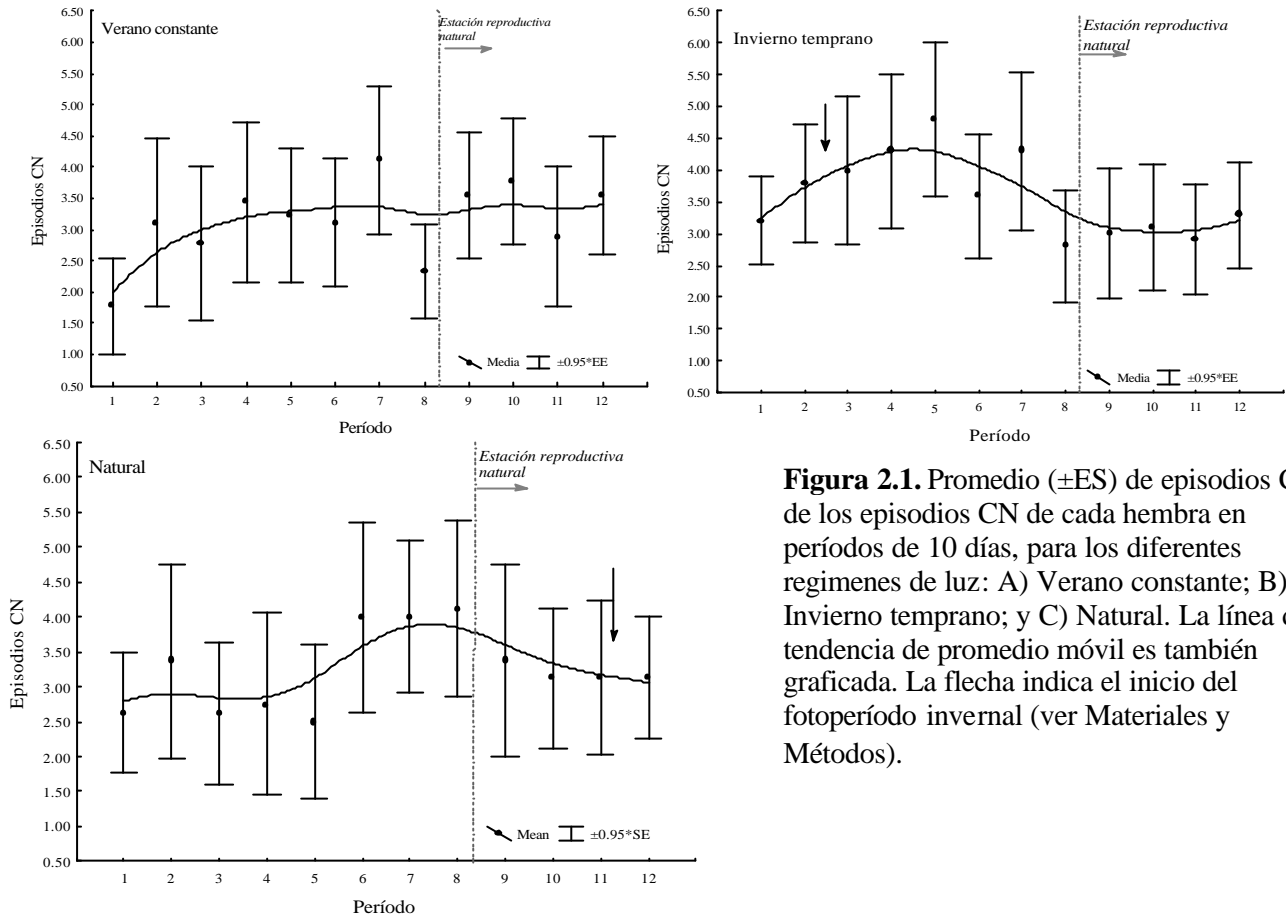
olores del macho (un día antes-un día después de la exposición al olor del macho) mediante MR ANOVA de tres vías. La proporción de células epiteliales no fue afectada tanto por el fotoperíodo ( $F_2= 0.016$ ,  $p= 0.984$ ), tiempo ( $F_1= 0.552$ ,  $p= 0.465$ ) como por la exposición al olor ( $F_1= 0.349$ ,  $p= 0.560$ ). Igualmente, la proporción de células epiteliales no fue afectada por una interacción entre los tres factores considerados (Fotoperíodo\* Exposición por olor\* Tiempo,  $F_2= 2.281$ ,  $p= 0.127$ ). El índice de cornificación no fue afectado por el fotoperíodo ( $F_2= 0.303$ ,  $p=0.742$ ) o la exposición al olor ( $F_1= 0.571$ ,  $p= 0.459$ ), pero una diferencia estadísticamente marginal fue detectada para el tiempo ( $F_1= 3.705$ ,  $p= 0.070$ ). También, el IC no fue afectado por la interacción entre los tres factores considerados (Fotoperíodo\* Exposición por olor\* Tiempo,  $F_2= 1.33$ ,  $p= 0.288$ ).

**Tabla 2.1.** Tabla de ANOVA de 2 Vías Para Medidas Repetidas para cada tratamiento de luz durante todo el experimento. Se analizó el promedio de las proporciones de células epiteliales, ocurrencia de episodios CN e Índice de cornificación (CI) para cada hembra durante períodos de 10 días.

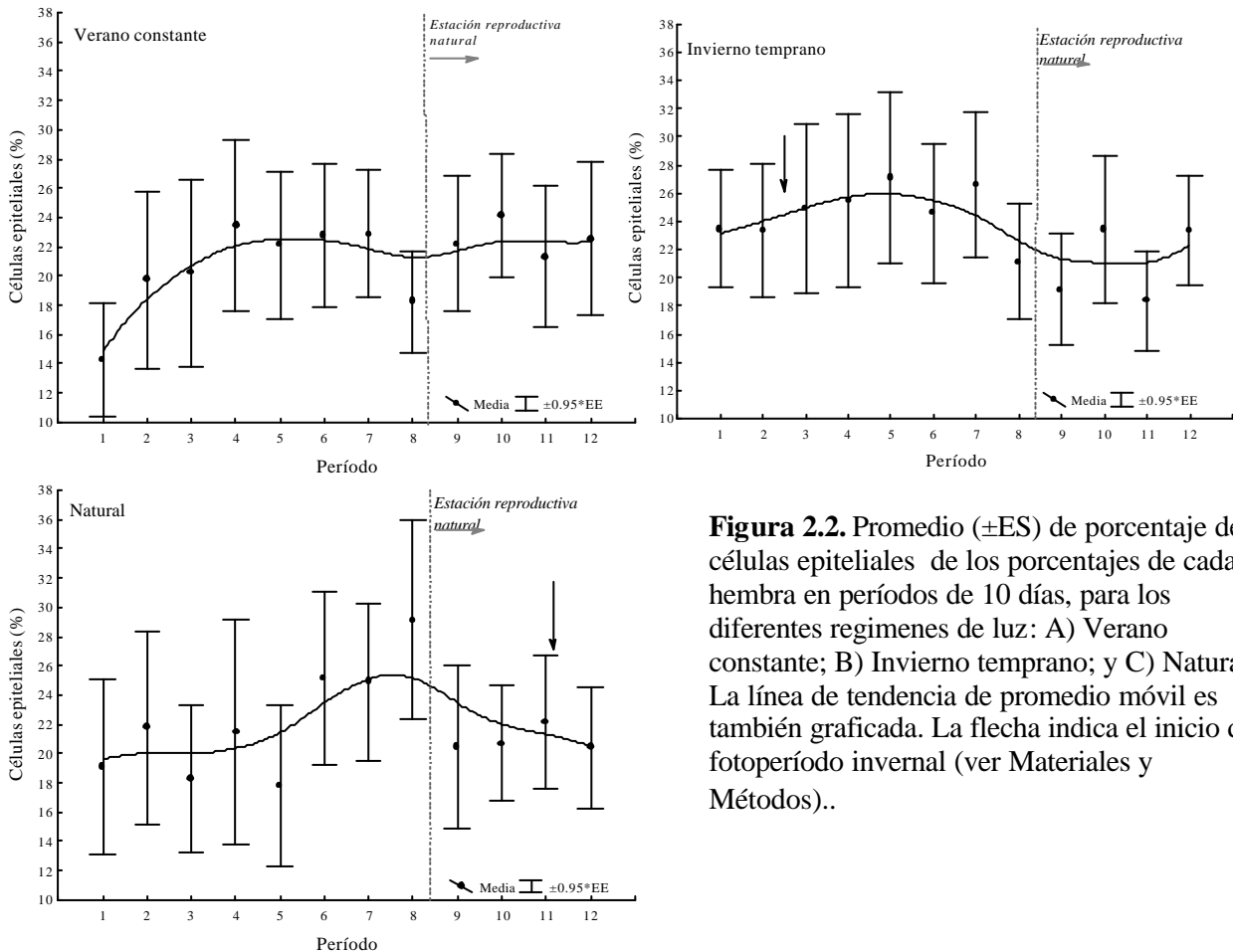
Datos	Efecto	gl	MS Efecto	gl Error	MS Error	F	p
Células epiteliales (%)	Regimen de luz	2	154.8	24	2531.5	0.061	0.94
	Tiempo	11	73.2	264	59.2	1.238	0.261
	Regimen de luz x Tiempo	22	75.8	264	59.2	1.281	0.182
Episodios CN	Regimen de luz	2	6.56	24	114.25	0.057	0.944
	Tiempo	11	3.986	264	2.324	1.714	0.07
	Regimen de luz x Tiempo	22	3.147	264	2.324	1.354	0.13
IC	Regimen de luz	2	0.0278	23	0.04	0.682	0.515
	Tiempo	11	0.0235	253	0.009	2.559	0.004*
	Regimen de luz x Tiempo	22	0.011	253	0.009	1.209	0.239

**Tabla 2.2.** Tabla de ANOVA de 3 Vías de Medidas Repetidas de episodios CN, porcentaje de células epiteliales, e índice de cornificación por hembra para cada régimen de luz, 15 días antes y 15 días después de la exposición al olor para hembras expuestas y no expuestas al olor de un macho.

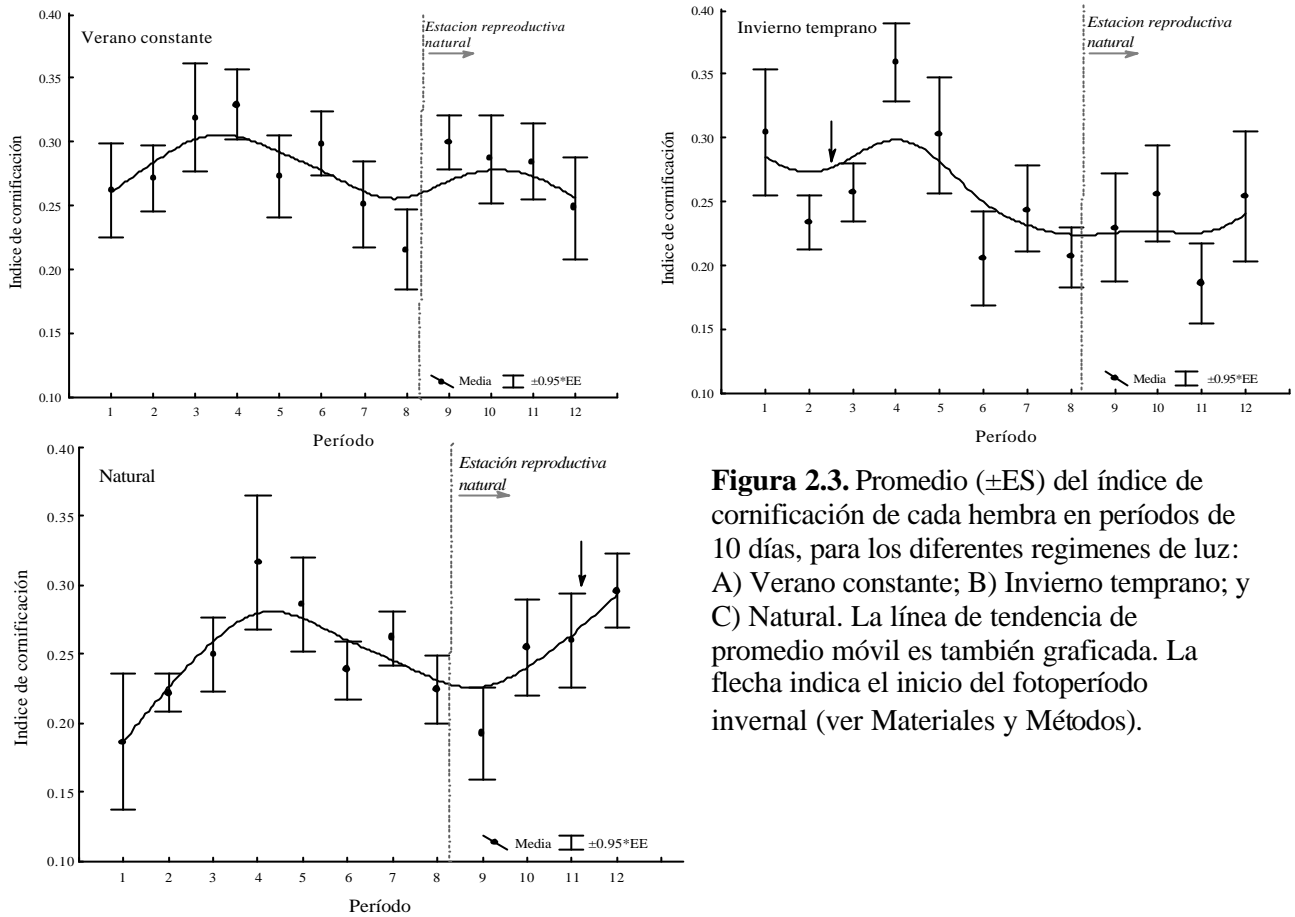
Fuente de datos	Efectos	gl	MS Efecto	gl Error	MS Error	F	p
Episodios CN	Regimen de luz	2	0.003	21	0.205	0.014	0.985
	Olor	1	0.001	21	0.205	0.006	0.936
	Tiempo *	1	0.063	21	0.009	6.340	0.019*
	Regimen de luz x Olor	2	0.028	21	0.205	0.139	0.870
	Regimen de luz x Tiempo	2	0.004	21	0.009	0.479	0.625
	Olor x Tiempo	1	0.004	21	0.009	0.476	0.497
	Regimen de luz x Olor x Tiempo	2	0.0008	21	0.009	0.084	0.919
Células epiteliales (%)	Regimen de luz	2	36.52	21	322.88	0.113	0.893
	Olor	1	9.13	21		0.282	0.868
	Tiempo *	1	33.38	21	51.28	0.65	0.429
	Regimen de luz x Olor	2	8.11	21	322.88	0.025	0.0975
	Regimen de luz x Tiempo	2	15.96	21	51.28	0.311	0.735
	Olor x Tiempo	1	0.96	21	51.28	0.018	0.892
	Regimen de luz x Olor x Tiempo	2	21.03	21	51.28	0.41	0.669
IC	Regimen de luz	2	0.0078	21	0.018	0.427	0.657
	Olor	1	0.034	21	0.0183	1.867	0.186
	Tiempo *	1	0.027	21	0.0002	10.592	0.003
	Regimen de luz x Olor	2	0.0064	21	0.0183	0.3494	0.7088
	Regimen de luz x Tiempo	2	0.0014	21	0.026	0.538	0.591
	Olor x Tiempo	1	0.0006	21	0.026	0.259	0.615
	Regimen de luz x Olor x Tiempo	2	0.0018	21	0.026	0.711	0.502



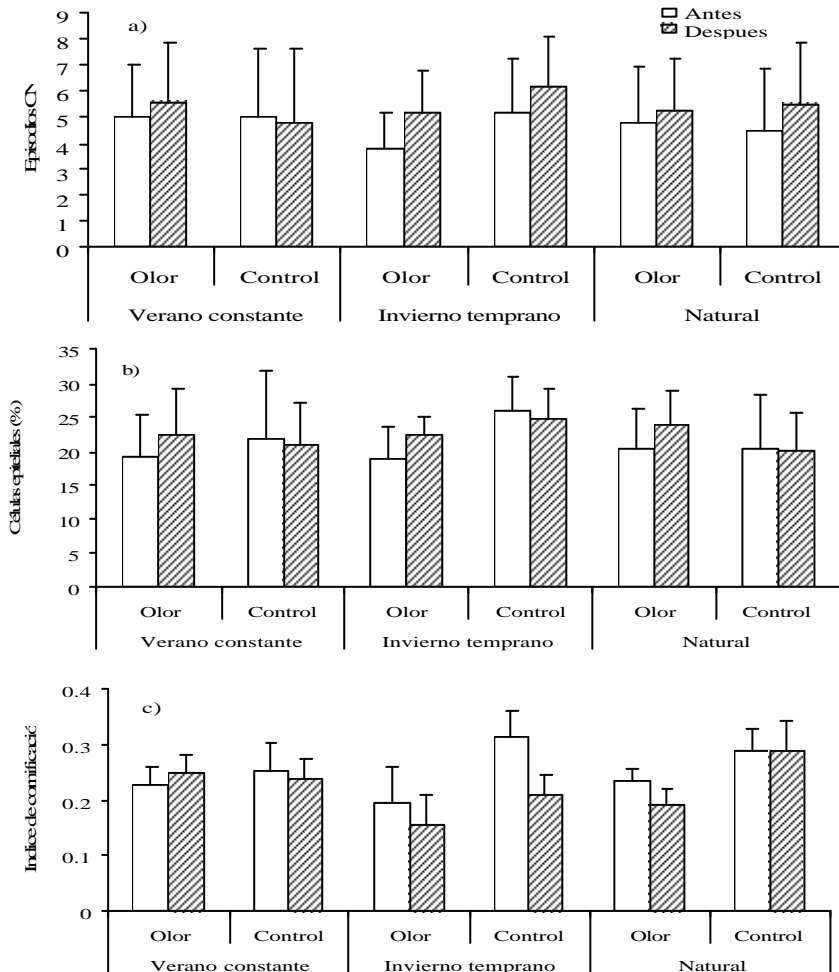
**Figura 2.1.** Promedio ( $\pm$ ES) de episodios CN de los episodios CN de cada hembra en periodos de 10 días, para los diferentes regimenes de luz: A) Verano constante; B) Invierno temprano; y C) Natural. La línea de tendencia de promedio móvil es también graficada. La flecha indica el inicio del fotoperíodo invernal (ver Materiales y Métodos).



**Figura 2.2.** Promedio ( $\pm$ ES) de porcentaje de células epiteliales de los porcentajes de cada hembra en periodos de 10 días, para los diferentes regimenes de luz: A) Verano constante; B) Invierno temprano; y C) Natural. La línea de tendencia de promedio móvil es también graficada. La flecha indica el inicio del fotoperíodo invernal (ver Materiales y Métodos)..



**Figura 2.3.** Promedio ( $\pm$ ES) del índice de cornificación de cada hembra en períodos de 10 días, para los diferentes regímenes de luz: A) Verano constante; B) Invierno temprano; y C) Natural. La línea de tendencia de promedio móvil es también graficada. La flecha indica el inicio del fotoperíodo invernal (ver Materiales y Métodos).



**Figura 2.4.** Promedios ( $\pm$ ES) de los episodios CN (a), porcentaje de células epiteliales (b), e índice de cornificación (c) para cada hembra en cada régimen de luz, 15 días antes y 15 días después de exposición a olor de un macho para las hembras expuestas (Olor) y las no expuestas (Control). \*  $p < 0.05$

## DISCUSIÓN

Las hembras de *C. talarum* mostraron una respuesta reproductiva frente a señales del fotoperíodo. Se distinguió un adelanto del incremento de episodios CN en las hembras expuestas a fotoperíodo invernal (IT) en relación a aquellas mantenidas en un fotoperíodo natural (NA). Un patrón semejante, aunque más atenuado, fue observado al analizar proporción de células epiteliales. Por otro lado, el incremento del índice de cornificación (IC) fue encontrado de forma simultánea en los tres tratamientos: este ciclo independiente del fotoperíodo sería indicativo de la existencia de un ritmo reproductivo endógeno. Sin embargo, para el período equivalente no se observó ocurrencia de actividad reproductiva en hembras silvestres (Cap I, Busch *et al.* 1989, Malizia y Busch 1991). No obstante, al final de nuestro período experimental, el IC disminuyó para aquellas hembras expuestas a un fotoperíodo de verano constante (VC) y de invierno temprano (IT) mientras que se observó un incremento para aquellas expuestas a fotoperíodo natural (NA), el cual se correspondió a pulsos reproductivos observados en el campo (Capítulo I). Como se señaló, las hembras empleadas en este estudio no alcanzaron un estado de completa cornificación; a pesar que este estado fue observado, aunque en baja frecuencia, en hembras mantenidas en las mismas condiciones de cautiverio (Capítulo IV). Tanto la baja proporción de células cornificadas y la baja frecuencia en la que hembras con cornificación completa podrían indicar que las hembras en el presente estudio alcanzaron una fase inicial de receptividad, mientras que otros factores no incluídos en este estudio, podrían contribuir al incremento de los niveles de cornificación. Inclusive hembras que mostraron casi 20 % de células epiteliales se mostraron receptivas al apareamiento y llevaron a cabo una exitosa preñez (Capítulo III), aunque probablemente la estimulación necesaria para alcanzar la ovulación en estas condiciones requiera mayor tiempo y/o complejidad de comportamientos en el cortejo y apareamiento. Consecuentemente, el fotoperíodo pareciera participar en el inicio la receptividad reproductiva mientras que la ovulación se induciría a través de estímulos mecánicos durante la copula. Las espinas peneanas que presentan los machos de *C. talarum* (Balbontin *et al.* 1996) proveerían la estimulación vaginal necesaria para inducir la ovulación. La ovulación inducida es el patrón esperado para mamíferos solitarios (Zarrow y Clark 1968) y representa una clara ventaja energética para roedores subterráneos dada la baja probabilidad de encuentro con potenciales parejas y de aparearse durante la estación reproductiva (Bennett *et al.* 2000).

La reproducción es un proceso energéticamente costoso que pone en juego la supervivencia del individuo reproductor. El empleo de señales ambientales en la regulación de la reproducción lleva a la optimización en el uso de recursos y evita la consecuente reducción de la adecuación ('fitness') si un intento de reproducción falla (Bronson 1989, Kenagy y Barnes 1984). Aunque se supuso que el modo de vida de los roedores subterráneos impediría el empleo del fotoperíodo, la señal proximal más común entre los mamíferos de reproducción estacional (Bennett *et al.* 2000), la sensibilidad a la variación diaria en la cantidad de horas luz fue reportada para *S. ehrenbergi* (Haim *et al.* 1983). Sin embargo, el fotoperíodo no mostró tener efecto sobre la actividad reproductiva de las ratas topo (*S. ehrenbergi*, Shanas *et al.* 1995) mientras si lo hizo la humidificación del suelo por lluvias que determinó condiciones más propicias para la excavación y construcción de nidos de reproducción (Rado *et al.* 1992). Entonces es de esperar un importante efecto del fotoperíodo en roedores subterráneos como *C. talarum*, el cual sale de sus túneles por breves períodos para coleccionar vegetación (del Valle *et al.* 2001) y presuntamente durante el apareamiento para la búsqueda de pareja, ya que no se hallaron conexiones entre sistemas de cuevas individuales (Antinuchi y Busch 1992). En ambientes que presentan estacionalidad, la progresión de cambios en las horas luz, además de señalar de forma precisa la estación actual, indican también el cambio asociado de la temperatura ambiental. *C. talarum* habita en una latitud (aprox. 37° S) que exhibe marcados cambios en las condiciones térmicas, aún dentro de las galerías subterráneas, donde las fluctuaciones térmicas solo difieren entre 2-6 °C de aquellas de superficie (Cutrera y Antinuchi 2004). La temperatura posee un efecto directo y un efecto indirecto, a través de la disponibilidad de pastura fresca, sobre la ocurrencia de hembras preñadas y amamantando (Capítulo I). Las altas temperaturas del verano representarían un desafío para los individuos que no son capaces de jadear y sudar (Busch 1989). Asimismo, los cambios en el pelaje ventral y la poca actividad excavatoria durante la preñez fueron propuestos como estrategias dirigidas hacia la disipación del calor y la disminución del sobrecalentamiento, respectivamente (Cutrera y Antinuchi 2004). La actividad reproductiva en hembras de *C. talarum* ocurre durante el período del año más favorable, cuando la disponibilidad de alimento asegura la cobertura de las crecientes demandas energéticas generadas durante la gestación y la lactancia. También, las temperaturas extremadamente elevadas o bajas para las crías son evitadas. La frecuencia de hembras preñadas alcanza su máxima proporción dentro de la

población durante el final del otoño y el comienzo del invierno, esto junto al largo período de gestación determina que la mayoría de los nacimientos ocurran durante la primavera (Capítulo I, Busch *et al.* 1989, Malizia y Busch 1991), cuando el ambiente térmico es más favorable para las crías recién nacidas que presentan un alto grado de altricialidad durante sus primeros 10 días de vida (Zenuto *et al.* 2002). La estrategia de desarrollo de las crías podría también afectar el grado de respuesta hacia las señales del fotoperíodo; el cuis (*Cavia aperea*), un histicomorfo que habita la misma latitud que *C. talarum*, no presentó respuestas al fotoperíodo bajo condiciones controladas de laboratorio. Los bajos requerimientos energéticos de las camadas extremadamente precoces de los cuis permitirían una reproducción no estacional mientras que la disponibilidad de alimento y la temperatura sean favorables para la reproducción (Trillmich 2000).

Una notable característica de la respuesta de *C. talarum* a los tratamientos con distintos fotoperíodos fue su alta variabilidad. Este resultado contrasta con diversos estudios en relación a los efectos de factores ambientales sobre el proceso reproductivo, en los cuales, colonias de hámsters o ratas de laboratorio con un alto grado de endocruza son sujetas a experimentación (Blank 1992). Por ende, las homogéneas respuestas fisiológicas a la experimentación se deberían a la pérdida de la variación entre individuos que caracteriza a las poblaciones naturales (Lynch *et al.* 1989). Asimismo, Horton y Rowsemit (1992) enfatizaron la importancia de la variación individual en respuesta a la información ambiental. La capacidad de responder a diferentes señales puede ser afectada por la condición del animal (edad, reservas energéticas) así como otros factores del ambiente externo (fotoperíodo, alimento, coespecíficos y temperatura). La capacidad del sistema neuroendocrino para integrar diferentes señales ambientales y las condiciones corporales pondrían también resultar en una variación de las respuestas a un estímulo particular. Como consecuencia, la variabilidad individual en la respuesta fisiológica es un rasgo de esperar en todas las poblaciones naturales y que afectará profundamente sobre la regulación de la dinámica poblacional.

Muchos estudios de laboratorio señalaron una inducción de la maduración sexual o el estro en hembras mediante la exposición a las feromonas del macho (Brown 1985). Sin embargo, las hembras en este estudio no mostraron respuesta hacia los olores de los machos, independientemente del régimen de luz o en interacción con fotoperíodos invernales. Diversas hipótesis pueden ser propuestas con el objeto de explicar dichos

resultados. Si las feromonas de los machos producen un ‘ajuste fino’, no sería de esperar efecto de las mismas bajo condiciones sub-óptimas para la reproducción. Como fue discutido antes, algún factor desconocido y no controlado en el presente diseño experimental podría limitar tanto el grado de cornificación como también las respuestas hacia los olores del macho. Con el objeto de maximizar la adecuación (‘fitness’), la selección natural propiciará que las señales del macho induzcan a las hembras a reproducirse la mayor parte del tiempo, mientras que las hembras lo harán solo en las condiciones ambientales favorables tales que aseguren su éxito reproductivo (Horton y Rowsemitt 1992). Asimismo, la forma en la cual se proveyó a las hembras del olor del macho podría afectar la cantidad de respuesta reproductiva. Se observó que las señales químicas contenidas en la orina de los machos y que actúan sobre el sistema vomeronasal, activan la reproducción en hembras de roedores de las praderas (*M. ochrogaster*), observado a través del crecimiento uterino (Carter *et al.* 1980). Asimismo la inducción del estro por el macho fue probada en hámsters, *Phodopus sungurus sungurus*, cuando las hembras fueron expuestas a olor (viruta) de machos maduros (Dodge *et al.* 2002). Aunque se permitió a las hembras de *C. talarum* entrar en contacto directo con la olores de orina y heces, es posible que para aquellos individuos con baja probabilidad de encontrar parejas potenciales, solo las señales obtenidas por contacto naso-genital podrían llevar la estimulación necesaria para permitir la inducción del estro o receptividad. De hecho, feromonas de macho encontradas en el sustrato por varios días podrían ser tomadas por la hembra como indicadora de la presencia de un macho territorial y una potencial pareja. El empleo de la comunicación química durante el apareamiento podría ser empleado tanto por el macho como por la hembra para evaluar el estado reproductivo (Zenuto *et al.* 2004) y la ‘calidad’ de la pareja potencial. Más aun, las señales químicas de machos podrían causar cambios reproductivos en las hembras que no fuesen detectados en la citología vaginal. En el batyiergido social *Cryptomys hottentotus pretoriae*, la sola estimulación olfativa no fue suficiente para provocar la ovulación, pero el contacto químico promovió el desarrollo folicular. Sin embargo, los niveles de progesterona entre hembras expuestas y no expuestas a un estímulo odorífero del macho no mostraron diferencias (Malherbe *et al.* 2004).

Finalmente, la respuesta reproductiva a múltiples señales ha ganado importancia recientemente. El considerar solo una variable en los análisis en cautiverio ha llevado a sobreestimar o subestimar los efectos de esa variable en poblaciones (Horton y Rowsemitt

1992, Edmonds *et al.* 2003). Cuando una alta calidad dietaria se proveyó tanto a machos como a hembras de *Mesocricetus auratus* se observó una disminución en la respuesta inducida por el fotoperíodo de la tasa de regresión gonadal de ambos sexos (Hoffman *et al.* 1987, Johnson y Hoffman 1985). Además, las bajas temperaturas sumadas a fotoperíodos invernales o estivales no restringe la reproducción en el cuis (*C. aperea*) cuando está disponible una gran abundancia de alimento (Trillmich 2000). Por lo tanto, el grado de respuesta al fotoperíodo sería de mayor importancia como disparador de la reproducción en *C. talarum* en poblaciones naturales donde la calidad de alimento (y posiblemente la cantidad) se ven limitadas, tal como ocurre al comienzo de la estación reproductiva natural de *C. talarum* (Capítulo I).

El rol de las señales ambientales y sociales en la regulación de la reproducción constituye un principio central en la biología de las poblaciones (Ims 1990). La creciente evidencia resalta la importancia tanto de la variación individual así como de la integración de factores múltiples dirigidos a la comprensión del efecto del ambiente en la reproducción. El presente capítulo provee evidencia de la respuesta reproductiva a las señales del fotoperíodo en hembras de *C. talarum*. Sin embargo, la identificación e integración de las señales ambientales y sociales además de las consideradas en este estudio es de gran relevancia para el asegurar una reproducción exitosa; también, la identificación de las condiciones fisiológicas que llevan a las diferencias en la respuesta individual requiere mayor investigación.

En resumen, las hembras de *C. talarum* emplearían el fotoperíodo, y probablemente otras variables ambientales, para sincronizar su reproducción (este capítulo) de forma de privilegiar los procesos energéticamente costosos (preñez y lactancia) durante la estación del año más favorable (Capítulo I). Sin embargo no hallamos efectos directos de la exposición al olor de un macho, lo que podrían tener efectos indirectos sobre la reproducción a través de la familiarización (Capítulo III).

## BIBLIOGRAFÍA

- ANDERSEN, DC, Y JA MACMAHON. 1981. Poulation dynamics and bioenergetics of a fossorial herbivore, *Thomomys talpoides* (Rodentia: Geomyidae) in a spruce-fir sere. *Ecol Monogr* 51: 179-202.
- ANTINUCHI, CD Y C BUSCH. 1992. Burrow structure in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Zeit für Säugetierk.* 57:163-168.
- BALBONTIN, J, S REIG Y S MORENO. 1996. Evolutionary relationships of *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae) from Argentina, based on penis morphology. *Acta Theriol.* 41: 237-253.
- BENNETT, NC, Y JUM JARVIS. 1988. The reproductive biology of Cape mole-rat *Georychus capensis* (Rodentia: bathiergidae). *J Mamm* 69: 293-302.
- BENNETT, NC, FAUKLES, CG Y AJ MOLTENO. 2000. Reproduction in subterranean rodents. In: *Life underground. The biology of subterranean rodents*: 145-182 pp. (Lacey EA., Patton, JL. y Cameron, GN, Eds.). The University Chicago Press, Chicago, USA.
- BERGER, PJ, NC NEGUS, EH SANDERS Y PD GARDNER. 1981. 6- methoxybenzoxazolinone: a plant derivative that stimulates reproduction in *Microtus montanus*. *Science* 214, 67-70.
- BLANK, JL. 1992. Phenotypic variation in physiological response to seasonal environments. En: *Mammalian energetics, interdisciplinary views of metabolism and reproduction*: 186-212. (Tomasi, TE y TH Horton, Eds.) Ithaca y London: Comstock Publishing Associates.
- BREED WG. 1967. Ovulation in the genus *Microtus*. *Nature* 214:826.
- BRONSON, FH. 1989. *Mammalian reproductive biology*. The University of Chicago Press, Chicago, USA.
- BRONSON, FH Y G PERRIGO. 1987. Seasonal regulation of reproduction in muroid rodents. *Am Zool* 27: 929-940.
- BROWN, RE. 1985. The rodents I: effects of odours on reproductive physiology (primer effects). In *Social odours in mammals. Vol. 1*: 245-344. (Brown, RE y DW MacDonald, Eds.). Oxford: Clarendon Press.
- BUFFENSTEIN, R. 2000. Ecophysiological responses of subterranean rodents to underground habitats. En: *Life underground. The biology of subterranean rodents*: 62-110 pp. (Lacey E. A., Patton, J. L. y Cameron, G. N. Eds.). The University Chicago Press, Chicago, USA.
- BUSCH, C. 1989. Metabolic rate and thermoregulation in two species of tuco-tuco, *Ctenomys talarum* and *Ctenomys australis* (Caviomorpha, Octodontidae). *Comp Bioch Physiol A* 93: 345-347.
- BUSCH, C, AI MALIZIA, OA SCAGLIA Y OA REIG. 1989. Spatial distribution and attributes of a population of *Ctenomys talarum* (Rodentia, Octodontidae). *J Mamm* 70: 204-208.
- CARTER, CS, LL GETZ, L GA VISH, JL MCDERMOTT, Y P ARNOLD. 1980. Male-related pheromones and the activation of female reproduction in the prairie vole (*Microtus ochrogaster*). *Biol Reprod* 23:1038-1045.
- CLARKE, JR. 1981. Physiological problems of seasonal breeding in eutherian mammals. Oxford. *Reviews of Reproductive Biology* 3:244-312
- COHEN-PARSONS M, Y CS CARTER. 1988 Males increase progesterin receptor binding in brain of female voles. *Physiol Behav* 42:191-197
- COOPER HM, M HERBIN Y E NEVO. 1993a. Ocular regression conceals adaptative progression of the visual system in a blind subterranean mammal. *Nature* 361: 156-159
- COOPER, RL, JM GOLDMAN Y JG VANDERBERGH. 1993b. Monitoring of the estrous cycle in the laboratory rodent by vaginal lavage. En: *Methods in Reproductive Toxicology*: 45-56. (Chapin, R. y Heindel, J., Eds.). Academic Press, San Diego, USA.
- CUTRERA, AP Y ANTINUCHI, CD 2004. Cambios en el pelaje del roedor subterráneo *Ctenomys talarum*: posible mecanismo térmico compensatorio. *Rev Chil Hist Nat* 77: 235-242.
- DEL VALLE, JC, MI LOHFELT, VM COMPARATORE, MSCID, Y C BUSCH. 2001. Feeding selectivity and food preference of *Ctenomys talarum* (tuco-tuco). *Mamm Biol* 66: 165-173.
- DODGE, JC, KRISTAL, MB Y LL BADURA. 2002. Male-induced estrus synchronization in the female Siberian hamster (*Phodopus sungurus sungurus*). *Physiol Behav* 77: 227-231.
- EDMONDS, KE, L RIGGS, Y MH STETSON. 2003. Food availability and photoperiod affect reproductive

- development and maintenance in the marsh rice rat (*Oryzomys palustris*). *Physiol Behav.* 78: 41-49.
- EVANS, JM Y TJ SAVAGE. 1970. The collection of vaginal smears from bitches. *Veterinary Records* 87: 598-599.
- FANJUL, MS, ZENUTO, RR Y C BUSCH. 2003. Use of olfaction for sexual recognition in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Acta Therio* 48: 35-46.
- GOTTREICH, A, I ZURI, S BAREL, I HAMMER Y J TERKEL. 2000. Urinary testosterone levels in male blind mole rat (*Spalax ehrenbergi*) affect female preference. *Physiol Behav* 69: 309-315.
- HAIM, A., HETH, G., PRATT, H. Y NEVO, E. 1983. Photoperiodic effects on thermoregulation in a "blind" subterranean mammal. *J. exp. Biol.* 107: 59-64.
- HERBST, M, JUM JARVIS Y NC BENNET. 2004. A field assessment of reproductive seasonality in the threatened wild Namaqua dune mole-rat (*Bathyergus janetta*). *J Zool, Lond* 263: 259-268.
- HOFFMAN, RA, LB JOHNSON, MK VAUGHAN, Y RJ REITER. 1987. Influence of diet on photoperiod-induced gonadal regression in female hamsters. *Growth* 51: 385-396.
- HORTON, TH Y CN ROWSEMITT. 1992. Natural selection and variation in reproductive physiology. In *Mammalian energetics, interdisciplinary views of metabolism and reproduction*: 160-185. (Tomasi, TE. y TH Horton, Eds.). Ithaca y London: Comstock Publishing Associates.
- IMS, RA. 1990. The ecology and evolution of reproductive synchrony. *Tree* 5: 135.
- JARVIS, JUM, Y NC BENNETT. 1990. The evolutionary history, population biology and social structure of African mole-rats: Family Bathyergidae. In: *Evolution of Subterranean Mammals at the Organismal and Molecular Levels* (Eds Nevo E y Reig OA), pp. 97-128. Wiley Liss, New York.
- JOHNSON, LB, Y RA HOFFMAN. 1985. Interaction of diet and photoperiod on growth and reproduction in male golden hamsters. *Growth* 49: 380-399.
- KENAGY, GJ, Y BM BARNES, 1984. Environmental and endogenous control of reproductive function in the Great Basin pocket mouse *Perognatus parvus*. *Biol Reprod* 31: 637-645.
- LACEY, EA, JL PATTON Y GN CAMERON. (Eds.) 2000. *Life underground: The Biology of Subterranean Rodents*. University of Chicago Press, Chicago.
- LOMBARDI, J. 1998. *Comparative vertebrate reproduction*. Kluwer Academic Press, Massachusetts, 469 pp..
- LYNCH, GR, CB LYNCH Y RM KLIMAN. 1989. Genetic analyses of photoresponsiveness in the Djungarian hamster, *Phodopus sungurus*. *J Comp Physiol* 164: 475-481.
- MACFARLANE, JD Y JM TAYLOR. 1982. Nature of estrus and ovulation in *Microtus townsendii* (Bachman). *J Mamm* 63: 104-109.
- MALHERBE, GP, AS SCHOEMAN, Y NC BENNETT. 2004. Is the highveld mole-rat *Cryptomys hottentotus pretoriae* (Rodentia: Bathyergidae) an induced or spontaneous ovulator? *J Zool Lond.* 263: 159-165.
- MALIZIA, AI, Y C BUSCH. 1991. Reproductive parameters and growth in the fossorial rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *Mammalia* 55: 293-305.
- MILLIGAN, SR. 1975. Mating, ovulation and corpus luteum function in the vole, *Microtus agrestis*. *J. Reprod Fer.* 42: 35-44.
- NELSON, RJ, LL BARDURA, Y BD GOLDMAN. 1990. Mechanisms of seasonal cycles of behavior. *Annu Rev Psychol* 41: 81-108.
- RADO, R, G BRONCHTI, Z WOLLBERG, Y J TERKEL. 1992. Sensitivity to light of the blind mole rat: behavioral and neuroanatomical study. *Isr J Zoo.* 38: 323-331.
- RADO, R, Z WOLLBERG Y J TERKEL. 1992. Dispersal of young mole-rats (*Spalax ehrenbergi*) from the natal burrow. *J Mammal* 74: 885-890.
- SAWREY, DK, Y DA DEWSBURY. 1985. Control of ovulation, vaginal estrus and behavioral receptivity in voles (*Microtus*). *Neurosci Biobehav Rev* 9: 563-571.
- SHANAS, U, G HETH, E NEVO, R SHALGI Y J TERKEL. 1995. Reproductive behaviour in the female blind mole rat (*Spalax ehrenbergi*). *J Zool, Lond* 137: 195-210.
- SMOLEN, MJ, HH GENOWAYS Y RJ BAKER. 1980. Demographic. and reproductive parameters of the pocket gopher (*Pappogeomys castanops*). *J Mammal* 61: 224-236.

- STEIN, B. 2000. Morphology of subterranean rodents. En: Life underground. The biology of subterranean rodents: 19-61 pp. Lacey E. A., Patton, J. L. y Cameron, G. N. (Eds.). The University Chicago Press, Chicago, USA.
- ŠUMBERA, R, H BURDA. Y WN CHITAUKALI. 2003. Reproductive biology of a solitary subterranean batherygid rodent, the silvery mole-rat (*Heliophobius argenteocinereus*). *J Mamm* 84: 278-287.
- TEMELES, EJ. 1994. The role of neighbors in territorial systems: when are they “dear enemies”? *Anim Behav* 47: 339-350.
- TRILLMICH, F. 2000. Effects of low temperature and photoperiod on reproduction in the female wild guinea pig (*Cavia aperea*). *J Mammal* 81: 586-594.
- TUREK, FW, Y CS CABELL. 1979 Photoperiodic regulation of neuroendocrine-gonadal activity. *Biol Reprod* 20: 32- 50.
- VAN DER HORST, G. 1972. Seasonal effects on the Anatomy and Histology of the Reproductive Tract of the Male Rodent Mole *Bathyergus suillus suillus* (Schreber). *Zool Africana* 7:491-520.
- VANDENBERGH, JG. 1994. Pheromones and mammalian reproduction. En: Physiology of Reproduction, Vol. 2. (Knobil, E. y JD Neill, Eds) Raven Press, New York.
- VAUGHAN, TA 1962. Reproduction in the plains pocket gopher in Colorado. *J Mammal* 43:1-13
- VERTS, BJ Y CARRAWAY, LN 1987. *Thomomys bulbivorus*. *Mammalian Species*. 273:1-4.
- WEIR, BJ. 1974. Reproductive characteristic of hystricomorph rodents. *Symp Zool Soc Lond* 34:265-301.
- ZARROW, MX Y JH CLARK. 1968. Ovulation following vaginal stimulation in a spontaneous ovulator and its implications. *J Endocrinol* 40:343- 352.
- ZENUTO, RR, A VASALLO Y C BUSCH. 2001. A method for studying social and reproductive behavior of subterranean rodents in captivity with preliminary data from *Ctenomys talarum*. *Acta Theriologica* 46: 161-170.
- ZENUTO, RR, Y MS FANJUL. 2002. Olfactory discrimination of individual scents in the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (tuco-tuco). *Ethology* 108: 629-641.
- ZENUTO, RR, MS FANJUL Y C BUSCH. 2004a. Subterranean rodent *Ctenomys talarum* (tuco-tuco) use chemical communication during breeding season. *J Chem Ecol* 30: 2111-2126.
- ZENUTO, RR, AI VASALLO Y C BUSCH. 2002b. Comportamiento social y reproductivo del roedor subterráneo *Ctenomys talarum* (Rodentia, Ctenomyidae) en condiciones de semicautiverio. *Rev Chil Hist Nat* 75: 165-177.
- ZENUTO, RR, AD VITULLO Y C BUSCH. 2003. Sperm characteristics in two populations of the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *J Mamm* 84: 877- 885.
- ZENUTO, RR, CD ANTINUCCI Y C BUSCH. 2002a. Bioenergetics of reproduction and pup development in a subterranean rodent (*Ctenomys talarum*). *Physiol Biochem Zool* 75: 469-478.

## **CAPÍTULO III**



El presente capítulo fue realizado en colaboración y será enviado para su publicación en coautoría con la alumna Candelaria Estavillo y Dra. Zenuto,

## **INTRODUCCIÓN**

Las vías primarias de comunicación en mamíferos, responsables de la organización e integración de patrones comportamentales, son la vista, el oído y el olfato; a este último se le reconoce un rol preponderante sobre todos estos (Eisenberg y Kleiman 1972, Doty 1986). Las secreciones glandulares, así como los productos del metabolismo diario (orina, heces) son los principales portadores de información química (Harborne 1994). Las señales químicas proveen información crítica acerca del emisor concerniente a identificación de especies, género, identidad, estatus social, condición reproductiva, condición fisiológica (stress, nivel nutricional) pertenencia a grupos y parentesco (Eisenberg y Kleiman 1972, Doty 1986). En roedores, se reconoce a estas señales como mediadoras de la atracción de parejas, interacciones de dominancia y uso de espacio, desencadenando además, respuestas fisiológicas relacionadas a la inducción de la reproducción y comportamiento parental (Brown y Macdonald 1985, Halpin 1986). La habilidad para reconocer individuos constituye un elemento clave en gran parte de las interacciones sociales, tales como jerarquías de dominancia, reconocimiento de parejas y reconocimiento de miembros de un grupo. Así, el reconocimiento individual permite evitar encuentros agresivos dirigidos hacia parejas o hijos, gasto de energía en actos agresivos que involucren individuos que ya se reconocen como más fuertes (Brown 1979, Temeles 1994) e identificar al dueño de un territorio comparando su olor con el predominante en el ambiente (Gosling 1982).

Darwin (1871) sugirió que los despliegues exagerados de los machos, incluyendo las glándulas productoras de olores, evolucionan por selección sexual (en Blaustein 1981). Trivers (1972) argumentó basándose en los aportes de Bateman (1948) y Williams (1966), que las diferencias en la inversión parental entre los sexos moldean sus roles, de tal manera que las hembras ejercen una fuerte elección por los machos, mientras que éstos maximizan su éxito reproductivo logrando de una manera menos selectiva la mayor cantidad de apareamientos posible. Esta diferenciación de roles se reconoce en una amplia variedad de organismos, pero se hace particularmente notoria en los mamíferos dada la alta dependencia materna de la progenie asociada al desarrollo interno de las crías y al amamantamiento (Andersson 1994).

En el caso particular de los roedores, el grupo no posee caracteres sexualmente seleccionados tales como ornamentos o armas, por lo que las glándulas productoras de olores, el comportamiento de marcación y las feromonas incluidas en las señales químicas

constituyen su principal herramienta en la obtención de parejas (Blaustein 1981, Penn y Potts 1998). Así, estos organismos obtienen información acerca de la calidad de potenciales parejas a partir de la calidad de sus olores, discriminando entre individuos de bajo rango social, mala salud o genotipo incompatible (Brown y Macdonald 1985). Mediante la evaluación de pistas químicas, principalmente las contenidas en orina y heces, los individuos son capaces de evitar apareamientos con parientes cercanos, con aquellos que comparten el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), parasitados o alimentados con dietas de baja calidad (Barnard *et al.* 1991, Potts *et al.* 1991, Kavalliers y Colwell 1995a, b, Ferkin *et al.* 1997). Las marcas de olor depositadas en el ambiente proveen información adicional que los animales pueden utilizar para reconocer al dueño de un territorio, comparando el olor del individuo encontrado con el olor predominante en ese espacio (Gosling 1982, 1990). Ésta debe ser una señal confiable de posesión del territorio ya que solamente los animales que defienden y ocupan exitosamente un espacio pueden asegurar la predominancia de sus marcas (Hurst 1993). Las parejas potenciales también pueden utilizar esta información como medida honesta de evaluación (Rich y Hurst 1998), resultando una medida indicativa de alta calidad y capacidad competitiva (Gosling 1982, Engel 1990).

En especies solitarias donde los individuos defienden territorios adyacentes, la familiaridad resulta un mecanismo de importancia en el reconocimiento de vecinos y selección de parejas. Daly (1977) propone que las marcas de olor de los machos pueden servir para familiarizar a las hembras con su olor, de manera que cuando ambos se encuentren, la hembra actuará de modo menos agresivo hacia el macho y la cópula se verá facilitada. Este comportamiento ha sido reportado en distintas especies de roedores (*Lemus trimucornatus*, Coopersmith y Banks 1983; *Dipodomys spectabilis*, Randall 1991; *Dipodomys ingens*, Randall *et al.* 2002; *Microtus ochrogaster*, Shapiro *et al.* 1986; *Mesocricetus auratus*, Tang-Martinez *et al.* 1993). Más aún, la familiarización no solo favorece el comportamiento de apareamiento sino que permite la producción de camadas más numerosas. El stress generado como consecuencia de la agresión que caracteriza los encuentros entre individuos no familiares probablemente sea responsable tanto de fallas en la implantación como la reabsorción de embriones en hembras preñadas (Tang-Martinez *et al.* 1993), por lo que la familiaridad posee una importante influencia sobre el éxito reproductivo.

El ambiente conjuntamente con las restricciones derivadas de las capacidades neurológicas de los organismos son consideradas las principales fuerzas modeladoras de la evolución señal-

receptor (Endler 1992). La forma en la que los individuos se comunican está influenciada por el “umwelt” de la especie (el ambiente alrededor del sujeto) que implica la relación entre el animal, su medio ambiente y la habilidad para extraer información del mismo. El ambiente subterráneo afecta los canales de comunicación que sus ocupantes utilizan (Franchescoli 2000). En este medio la visión carece de utilidad ya que la mayor actividad interactiva ocurre en galerías oscuras. Las señales táctiles, por otro lado, están limitadas a encuentros de estrecho contacto entre individuos, lo cual ocurre con baja frecuencia en especies solitarias. Las señales acústicas son particularmente efectivas tanto en la transmisión de información a larga y corta distancia, mientras que las señales químicas están confinadas a los túneles dentro de las galerías (Franchescoli 2000). Aunque las señales auditivas pueden viajar más lejos que las señales químicas, las pistas olfativas pueden persistir por más tiempo en el hábitat en ausencia del emisor, sin requerir además la actividad sincrónica entre el emisor y el receptor (Bradbury y Vehrencamp 1998) por lo que resulta un medio eficiente de comunicación en especies solitarias de roedores subterráneos.

En aquellas especies con baja frecuencia de interacción directa entre coespecíficos se espera que la comunicación química cumpla un rol fundamental en la coordinación de sus comportamientos sociales y reproductivos. Más aún, cuando el comportamiento agresivo constituye una barrera en la obtención de apareamientos (Shanas *et al.* 1995), las señales químicas podrían contribuir en la reducción de la agresión entre miembros de una pareja potencial.

El roedor subterráneo *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae) provee un excelente modelo para examinar el rol de la familiarización previa por medio de pistas químicas en el comportamiento reproductivo. Estos roedores, cuya distribución ocupa la costa de la provincia de Buenos Aires, Argentina (Redford y Eisenberg 1992), poseen hábitos solitarios y son altamente territoriales (Busch *et al.* 1989). La población ubicada en la localidad de Mar de Cobo, se caracteriza por un sistema reproductivo poligínico (Zenuto *et al.* 1999), los machos son más agresivos que las hembras y presentan un elaborado patrón copulatorio que incluye contacto corporal, vocalización y olfateo (Zenuto *et al.* 2002). El patrón de distribución espacial se encuentra formado por un macho dominante rodeado de sistemas de galerías ocupados individualmente por hembras. También pueden encontrarse otros machos en la periferia de este arreglo espacial (Malizia 1994). Tanto en condiciones naturales (Zenuto obs. personal), como en cautiverio (Zenuto *et al.* 2001, 2002), marcan sus túneles con orina, heces

y frotación ano-genital. Los individuos de esta especie utilizan la comunicación química dentro del contexto de comportamientos territoriales y reproductivos, siendo capaces de reconocer individuos luego de la exposición por 4 días a un olor de un coespecífico de su mismo sexo u opuesto (Zenuto y Fanjul 2002). La distinción del sexo (Fanjul *et al.* 2003) y condición reproductiva (Zenuto *et al.* 2004) a través de pistas químicas también fueron verificadas en esta especie. En todos los casos, las hembras se distinguieron como el sexo que destina mayor tiempo de exploración sobre las fuentes de olor, comportamiento que podría ser atribuido al ejercicio de elección que este sexo ejerce en muchos mamíferos poligínicos.

Dada la capacidad de *C. talarum* para reconocer individuos, la deposición de pistas químicas en el ambiente podría funcionar como un modo de otorgar a las hembras información acerca del dueño del territorio y familiarizarlas a su olor. Este comportamiento podría constituir una ventaja para ambos sexos si durante los encuentros reproductivos las hembras actúan de forma menos agresiva, presentándose más receptivas hacia el macho, y reduciendo así los costos del cortejo (tiempo y stress) provocado por encuentros agresivos.

En el presente trabajo se evalúa el efecto de la familiaridad, resultante de la exposición previa a señales químicas de un macho, en el comportamiento de apareamiento de hembras de *C. talarum*. Específicamente, se pone a prueba si la familiarización de las hembras mediada por pistas químicas de un macho facilita los apareamientos como consecuencia de la disminución en el comportamiento agresivo y el aumento en el comportamiento sexual.

## MATERIALES Y MÉTODOS

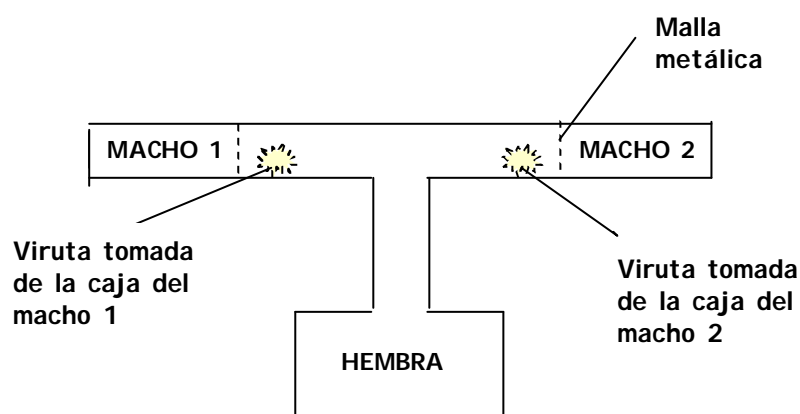
### ***Animales: captura y mantenimiento en cautiverio***

Individuos adultos de *C. talarum* fueron capturados en la localidad de Mar de Cobo (37° 45' S, 57° 56' O) utilizando trampas de captura viva tipo tubo ubicadas en las bocas de las cuevas donde se registró actividad excavatoria reciente. Las hembras fueron capturadas antes de la época reproductiva (marzo-mayo) a fin de evitar toda posible actividad sexual previa a los experimentos y los machos fueron capturados durante la estación reproductiva (junio-enero). Los animales fueron luego transferidos a un bioterio donde se alojaron individualmente en cajas plásticas (42x 34x 26 cm) con 3 cm de cama de virutas de madera. La habitación se mantuvo en condiciones de termoneutralidad a 23±1°C y bajo condiciones naturales de fotoperíodo. Los individuos fueron alimentados *ad libitum* con zanahorias, batatas, alfalfa, pastos mixtos y semillas de girasol. Los machos fueron mantenidos en un período de adaptación al bioterio por al menos 4 días antes de participar en los ensayos.

### *Test de preferencia*

Ensayos preliminares de apareamiento realizados sobre 12 parejas de *C. talarum* conformadas por asignación al azar mostraron como resultado predominancia en los comportamientos de indiferencia y evitación, sin obtenerse en ningún caso comportamiento reproductivo. En base en estos resultados, y a los obtenidos con el roedor subterráneo solitario *Spalax ehrenbergi* (Shanas *et al.* 1995), se permitió a la hembra seleccionar - entre dos posibles parejas - al macho con el cual interactuará en los ensayos posteriores. Si bien la asociación (medida como el tiempo de permanencia en cercanía, interés por sus señales químicas, búsqueda de contacto físico) de una hembra hacia un macho constituye una medida de preferencia de apareamiento, en muchos casos esto no implica que se concrete realmente en selección de apareamiento (“mate choice”). Aún así, la manifestación de preferencia de una hembra hacia un macho permite obtener mayor probabilidad de apareamiento que mediante una asignación completamente aleatoria, evitando barreras tales como las incompatibilidades genéticas o la falta de interés por genotipos de histocompatibilidad (Penn y Potts 1998).

Con el propósito de permitir a la hembra elegir entre dos posibles parejas, se diseñó un sistema en forma de T con tubos de acrílico (Fig 3.1). En cada uno de los extremos se colocó un macho al que se mantuvo confinado a este sector mediante una malla metálica que le impidió acceder al sistema en T, y del lado interno del sistema se colocó una muestra de la cama de viruta del macho correspondiente para proveer a la hembra el acceso directo a su fuente de olor. En el extremo restante se colocó una caja acrílica que contiene a la hembra.



**Figura 3.1-** Esquema del sistema utilizado durante el Test de Preferencia

El test de preferencia comenzó cuando la hembra fue liberada en el sistema, extendiéndose por 20 minutos. De esta manera la hembra pudo obtener diferente información a partir del macho y su viruta; la malla metálica permitió un limitado contacto físico directo y visualización entre ambos, mientras que la comunicación auditiva fue posible.

Se registraron los siguientes comportamientos de la hembra: olfateo de la viruta, olfateo del macho, contacto naso-nasal, autoacicalamiento, marcación con orina y fecas, frotado de zona anogenital y vocalización, además del tiempo transcurrido en cercanía de cada macho. Se determinó el macho elegido por la hembra (macho preferido) como aquel al que fueron dirigidos la mayor frecuencia de comportamientos y tiempo en cercanía. Este macho fue entonces asignado a la hembra como pareja para el test de interacción social, luego de que ésta cumpliera con el correspondiente tratamiento designado al azar.

La posibilidad de elección de pareja brindada a la hembra resultó en un importante aumento de los encuentros exitosos (demostración de comportamiento reproductivo) en comparación al resultado de estos encuentros cuando el macho fue designado al azar. De las 52 parejas conformadas por la hembra y el macho preferido, 38 (73%) desplegaron comportamientos reproductivos y 17 parejas (32%) alcanzaron la cópula.

**Test de Interacción.** Este experimento consistió en dos fases: 1) fase de exposición a olor, las hembras fueron sometidas a distintos tratamientos de exposición a olor y 2) fase de interacción, las hembras interactuaron con el macho preferido en el Test de Preferencia. Se utilizaron en total 71 individuos adultos de *C. talarum* (38 hembras y 33 machos). Si en un test de interacción no se verificó comportamiento reproductivo (14/52 casos), el mismo fue descartado y los individuos reutilizados. Ninguno de estos individuos fue empleado en el mismo tratamiento ni testeado con individuos previamente conocidos (vía olor u interacción). La reutilización de los animales ocurrió con un intervalo entre tests de al menos 30 días para las hembras y 15 días para los machos.

### **1) Exposición a olor**

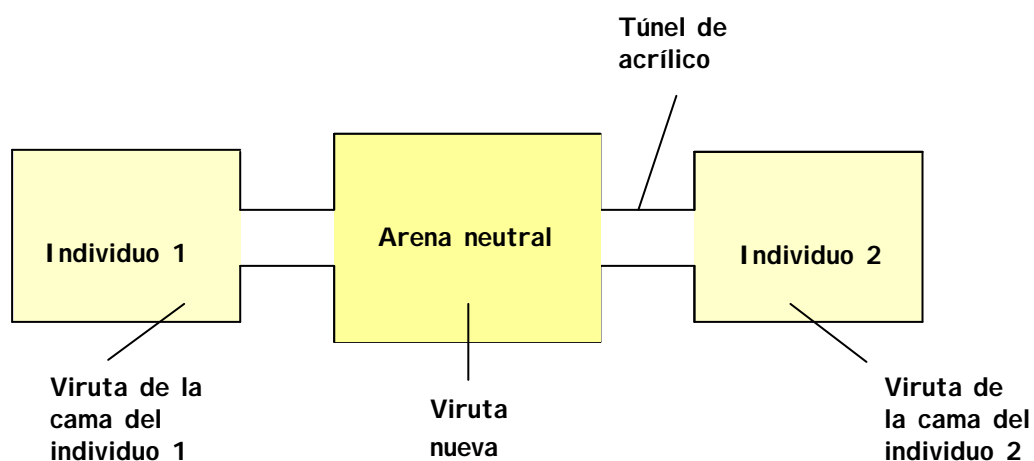
**Recolección de olores.** Las muestras de olor fueron recolectadas de las camas de viruta de los machos donantes, conteniendo una mezcla de orina, heces, y secreciones corporales. La elección de la viruta como fuente de olor se debe a que ésta es la que mejor permite la discriminación de individuos (Zenuto y Fanjul 2002) siendo también la fuente sobre la cual los tucos demostraron mayor interés en experimentos que involucraron distinción de condición reproductiva (Zenuto *et al.* 2004). Estas muestras de olor fueron presentadas en una

cápsula de Petri (10 cm de diámetro) cubierta por una malla metálica en forma de anillo, de tal manera que la hembra pueda oler y tocar la muestra. Cada cápsula de Petri conteniendo el olor de un macho se colocó en la caja donde reside la hembra por un lapso de 8 días (período de habituación), renovándose cada 48 hs. Este período garantiza ampliamente la familiarización a través del contacto con el olor, la cual es ya alcanzada al cuarto día de exposición (Zenuto y Fanjul 2002).

**Exposición.** Se realizaron cuatro tratamientos: tres de exposición al olor del macho según lo detallado más arriba, y un tratamiento sin exposición a olor. Las hembras del tratamiento C fueron habituadas al olor del macho preferido de acuerdo a la selección cada hembra (“Conocidos”, n=11). Las hembras del tratamiento H1 fueron habituadas al olor de un macho escogido al azar (Habitados 1, n=9). El tratamiento H4 consistió en la habituación de la hembra a diferentes machos: cada olor permaneció disponible durante dos días, reemplazándose cada vez con un olor distinto (“Habitados 4”, n=9). Las hembras del tratamiento E no fueron expuestas a ningún olor (“Extraños, n=9).

## 2) Interacción social

Luego de que las hembras cumplieran con la fase de exposición a olor, fueron testeadas en interacción con el macho preferido (ver Test de selección). El sistema utilizado en este test consistió en tres cajas de acrílico dispuestas una a continuación de la otra y unidas por tubos de acrílico que funcionaron como túneles (Figura 3.2). La caja central representa la arena neutral; en las cajas de los lados se colocaron los individuos, un macho y una hembra, cuyas posiciones fueron designadas al azar. Antes del comienzo del test los individuos fueron confinados durante un período adaptación de aproximadamente 1 hora en su caja experimental provista de un fondo de viruta extraída de su propia caja. Una vez finalizada la adaptación, el sistema fue abierto para permitir la entrada de los animales.



**Figura 3.2-** Esquema del sistema utilizado en los Tests de Interacción

El Test de Interacción consistió en tres ensayos de 30 minutos cada uno, y fue realizado durante tres días consecutivos. A lo largo de los tres días de estudio cada encuentro fue registrado en filmaciones de video. Luego de cada test las cajas fueron cuidadosamente lavadas con detergente y secadas con alcohol para asegurar que no queden rastros de olor en el sistema.

**Registro y análisis de las variables comportamentales.** Los comportamientos observados durante las interacciones se detallan en la Tabla 3.1. Las variables comportamentales fueron agrupadas dentro de tres tipos de comportamiento de acuerdo al siguiente criterio de clasificación, siguiendo la descripción del comportamiento social y reproductivo reportado para *C. talarum* (Zenuto *et al.* 2002):

- a) Reconocimiento: comportamientos que involucran el reconocimiento del otro individuo por medio de diferentes canales de comunicación (químicos, visuales, táctiles)
- b) Agresión: comportamientos que comprenden desde la evitación del otro individuo hasta acciones que pueden involucrar perjuicio físico para ambos individuos
- c) Reproductivos: comportamientos de cortejo y cópula.

Con el fin de responder a los objetivos de este trabajo y evaluar el comportamiento reproductivo de las hembras de *C. talarum* bajo distintos contextos olfativos, en el presente trabajo sólo se reportan los comportamientos realizados por la hembra y aquellos comportamientos mutuos (monta, cópula).

El análisis de datos se realizó dentro de tres categorías: para los tres tipos de comportamientos, para los niveles definidos dentro de estos y para cada uno de los comportamientos particulares. Para cada comportamiento fueron registradas las siguientes medidas: latencia (tiempo transcurrido hasta la primera ocurrencia de un comportamiento dado), frecuencia (número de veces que ocurre un comportamiento durante la interacción), duración (tiempo total dedicado a un comportamiento durante la interacción) y ocurrencia (verificación de un comportamiento dado dentro del repertorio de comportamientos identificados). El análisis se realizó para cada uno de los días y para el total de la interacción.

Debido a fallas en las grabaciones de video, fueron perdidos los registros de 4 individuos del día 3 bajo el tratamiento Conocidos, por lo que esos individuos no fueron incluidos en la evaluación de los totales.

Se realizó un análisis de la ocurrencia de los comportamientos reproductivos agrupándolos en 6 fases: Cortejo 1, 2, 3 y 4 (según se definen en Tabla 3.1) más fase 5 (monta) y fase 6

(cópula). Se realizó una correlación entre el número de comportamientos reproductivos verificados durante el cortejo y el Cmax (nivel máximo de cortejo) alcanzado en el encuentro.

Se utilizó test de ANOVA o su equivalente no paramétrico (Kruskal-Wallis) en el análisis de cada variable comportamental entre tratamientos. En todos los casos el nivel de significancia fue fijado en 0.05. Los datos se expresan en media  $\pm$  DE. Cuando existieron diferencias significativas entre tratamientos estas fueron analizadas con pruebas de comparaciones múltiples (Holm- Sidak o Método de Dunn, según el caso). Se usó el coeficiente de correlación de Spearman para analizar la relación entre el número de comportamientos reproductivos y el alcance del cortejo. Para el análisis de la interacción de las variables tiempo y tratamiento se usó ANOVA de dos vías de Medidas Repetidas (Tiempo).

Tipo de Comportamiento	Nivel	Comportamientos Particulares (descripción)
Reconocimiento	Demarcación Involucra todas aquellas conductas en la cual un individuo deposita una señal química.	Orina y/o heces: individuo marca una zona mediante la deposición de fecas u orina. Frota zona genital: el individuo frota su zona anogenital contra una superficie.
	Olfación. Involucra todas aquellas conductas de olfateo de una señal química y/o individuo.	Olfateo del territorio: olfacción de áreas puntuales que contienen olores depositados por el individuo durante el período de habituación
		Olfateo de marca: un individuo olfatea la marca dejada recientemente por otro.
		Olfateo de individuo: olfateo de la cabeza o flancos del otro individuo
	Visual + táctil Comportamientos de reconocimiento a partir de la vista y tacto.	Encuentro y retroceso: retroceso rápido luego del encuentro con el otro individuo. Contacto naso-nasal: los dos individuos ponen sus narices en contacto
Agresión	Baja Involucra todas aquellas conductas rechazo del otro individuo.	Evitación: un individuo se mueve en función de evitar al otro. Grupa de rechazo: un individuo le muestra al otro la grupa
	Media Involucra comportamientos agonísticos directos sin perjuicio físico para los individuos	Muestra dientes: un individuo muestra los dientes incisivos levantando la cabeza. Amenaza: un individuo advierte al otro su rechazo, agazapado en una esquina y haciendo aprontes.
	Alta Aquellos comportamientos agonísticos que pueden causar perjuicio físico sobre los individuos.	Tarascón: individuo lanza una mordida al otro en señal de amenaza
		Muerde: un individuo muerde al otro
		Pelea: incluye boxeo, muestra de dientes y mordidas; involucra ambos individuos.
Reproducción	Cortejo 1 Involucra el olfateo hacia el otro individuo	Olfateo zona posterior: un individuo olfatea la zona posterior del otro.
		Olfateo genital: olfateo de la zona genital del otro individuo
	Cortejo 2  Aquellos comportamientos donde un individuo se aproxima al otro en la búsqueda de contacto.	Persecución: un individuo persigue al otro.
		Topetazo: un individuo embiste suavemente al otro.
		Mordiscos: mordiscos suaves sobre el otro individuo.
		Enganche de dientes: dos individuos enganchan sus dientes incisivos entre sí.
		Aloacicalamiento: un individuo acicala parte posterior del otro.
		Abraza: individuo abraza el posterior del otro.
		Empuja: los individuos, generalmente enfrentados, se empujan forzándose a retroceder con las manos apoyadas sobre el otro.
		Hembra monta al macho
	Olfateo posterior mutuo: olfateo mutuo de la zona posterior.	
	Cortejo 3  Involucra aquellos comportamientos de un individuo que señalan su receptividad.	Expone cuello: individuo expone su cuello al otro.
		Grupa receptiva: hembra muestra al macho su grupa en señal receptiva.
		Levanta cola: la hembra levanta la cola en proximidad del macho, exponiendo la zona genital.
		Olfateo anogenital mutuo: olfateo mutuo de la zona anogenital, generalmente acompañado de giros.
		Hembra muerde cuello al macho
Cortejo 4 Involucra comportamientos de precópula y cópula.	Muerde cuello: macho muerde cuello que la hembra expone durante el cortejo, ocurre generalmente antes y durante la monta.	
	Monta parcial: macho sube a la hembra sin completar la monta	
	Monta: macho monta a la hembra	
	Cópula	

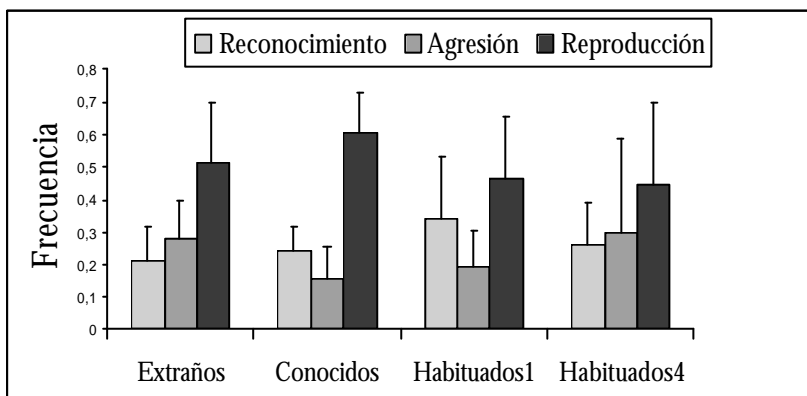
**Tabla 3. 1.-** Clasificación de las variables comportamentales registradas durante los encuentros

## RESULTADOS

### Comportamiento de las hembras de *C. talarum*

Durante los encuentros, los individuos primeramente exploraron el sistema, detectando la presencia del otro individuo. Siguió entonces comportamientos de reconocimiento tanto visuales y táctiles como de olfacción del otro individuo y su territorio. Posteriormente, se verificaron los primeros comportamientos agresivos y reproductivos. El despliegue de comportamientos mostrado por las parejas fue muy variable dentro de cada tratamiento, lo cual dificultó la detección de patrones en la respuesta a los mismos.

La distribución relativa de la actividad total a lo largo del estudio (3 encuentros de 30 minutos en días consecutivos) difiere para las categorías comportamentales consideradas. Los individuos mostraron con mayor frecuencia comportamientos reproductivos, independientemente del tratamiento de familiarización asignado. Le siguieron, aunque variando en su orden de importancia según el tratamiento, los comportamientos agresivos y de reconocimiento (Figura 3). Las hembras de los tratamientos E y H4 emplearon mayormente comportamientos de agresión que de reconocimiento, mientras que en las hembras de los tratamientos C y H1 ocurrió la relación inversa.



**Figura 3:** Frecuencia ( $\pm$  DE) relativa a la actividad total invertida en cada categoría de comportamiento bajo cada tratamiento de familiarización

De la totalidad de las parejas analizadas (N=38), 17 (45%) copularon a lo largo del estudio. Dado que la mayoría de las cópulas se verificaron en la primera interacción (día 1), la obtención de las mismas pueden atribuirse al efecto de la familiarización por olores más que a la posterior interacción en días sucesivos. Solo una pareja en el tratamiento E y dos en el C copularon en primera instancia en el día 2 mientras que una pareja del H1 lo hizo en el día 3 de interacción. Aunque el porcentaje de parejas que copularon fue algo mayor en las parejas de Extraños y Conocidos, no se detectaron diferencias entre tratamientos (Kruskal Wallis,  $H=4.22$ ,  $gl=3$ ,  $P=0.239$ ). Resulta interesante destacar que las cópulas de E fueron reforzadas

en la totalidad de los casos, mientras que los C no repitieron cópulas en días sucesivos (Tabla 3.2). Como resultado de estas cópulas, solo dos hembras completaron preñeces exitosas, una del tratamiento E y otra de C, cuyos tamaños de camada fueron 4 y 2 crías respectivamente.

<i>Tratamiento</i>	<i>Total de parejas que copularon</i>	<i>Parejas que refuerzan la primera cópula</i>	<i>Parejas que refuerzan la segunda cópula</i>
<b>Extraños (N=9)</b>	5/9 (55%)	5/5	1/5
<b>Conocidos (N=11)</b>	7/11 (63%)	0/7	0/7
<b>Habitados1 (N=9)</b>	3/9(33%)	1/3	0/3
<b>Habitados4 (N=9)</b>	2/9 (22%)	0/2	0/2

**Tabla 3.2.** Frecuencia absoluta de parejas que copularon a lo largo del estudio y que refuerzan (repiten) la cópula en los encuentros siguientes. N corresponde al número de individuos por tratamiento.

No se detectaron diferencias en la ocurrencia y duración de comportamientos agresivos y reproductivos en relación al tratamiento de familiarización de las hembras (ANOVA dos vías, Tabla 3.3). Tampoco se verificó interacción entre el efecto del tratamiento en relación al tiempo. Sí se verificó un efecto del tiempo en la ocurrencia y duración tanto de la agresión como de los comportamientos reproductivos a lo largo de los tres días de encuentro, dada la disminución en el despliegue de ambos tipos de comportamientos en los días 2 y 3 de interacción.

	Ocurriencia						Duración					
	Agresión			Reproducción			Agresión			Reproducción		
	gl	F	P	gl	F	P	gl	F	P	gl	F	P
<b>Tratamiento</b>	3	2.374	0.083	2	0.239	0.869	3	0.575	0.635	3	0.199	0.896
<b>Día</b>	2	6.305	0.005	3	4.654	0.014	2	17.172	<0.001	2	18.531	<0.001
<b>Tratamiento x Tiempo</b>	6	0.615	0.717	6	0.405	0.873	6	2.053	0.071	6	1.016	0.423

**Tabla 3.3.** Tabla de ANOVA de 2 vías de medidas repetidas (Tiempo) para la Ocurriencia y Duración de los comportamientos agresivos y reproductivos. Los datos de agresión para Duración fueron transformados con  $1/x$ .

**Latencia**

**Día 1.** Las latencias de los comportamientos no arrojaron diferencias significativas entre tratamientos durante el primer día de ensayo. Sin embargo, las hembras E tardaron más tiempo en desplegar comportamientos de reconocimiento que las hembras de los demás tratamientos (Tabla 3.4). La latencia a la agresión para los diferentes niveles y para el total fue similar entre tratamientos (Tabla 3.4).

COMPORTAMIENTO				TRATAMIENTO			
Tipo	Nivel	H/F	P	Extraños	Conocidos	Habitados 1	Habitados 4
Reconocimiento	Total	H=2.066	0.559	108.44±156.44	24.72±16.95	47±66.62	50.33±50.65
Agresión	Baja	F=1.691	0.344	140.67±206.96	330.83±297.73	386.71±399.93	219.33±190.87
	Media	H=1.034	0.793	207±200,4	349,5±397,25	186±85,64	227,56±202,39
	Alta	H=3.728	0.292	620,12±553,82	296,3±94,18	252,86±200,51	409,5±202,1
	Total	H=1.181	0.758	121.11±157.46	168.5±148.77	145±109.11	146.89±177.07
Reproductivo	Cortejo 1	H=1.301	0.729	143,6±216,2	205,6±255,3	330,8±392,5	305±430,6
	Cortejo 2	H=0.288	0.962	325,25±341,91	312,4±247,6	277,1±269,5	270,7±277,9
	Cortejo 3	F=2.083	0.121	287,4±154,3	316,11±218,2	250,5±202,9	507,2±346
	Cortejo 4	F=2.887	0.061	384,4±229,8	297,8±247,6	627±380,8	166,4±123,2
	Cópula	H=2.423	0.489	846±689,35	491,8±100,87	506,5±292,03	332±140
	Total	H=2.000	0.572	114.67±154.23	119.8±93.07	84.77±86.53	202.78±262.14

**Tabla 3.4.** Latencia (en segundos) a la ocurrencia de distintos comportamientos durante el primer día de encuentro. Los datos se expresan como media ± DE. Valores de p correspondientes a H de Kruskal-Wallis o F de ANOVA. gl=3 en todos los casos.

En los cuatro niveles del cortejo, así como en el total de los comportamientos reproductivos, los tratamientos no presentaron diferencias significativas. Sin embargo, algunos comportamientos particulares (Levanta cola, Aloacicalamiento, Monta parcial) presentaron diferencias entre tratamientos (Comparación Múltiple de Dunn  $p > 0.05$ , ver Apéndice, Tabla I). Es importante destacar que la latencia hasta la cópula fue mayor en las hembras E, en especial comparándolas con las hembras H4, aunque estas diferencias no resultaron significativas. Las hembras H1 mostraron una menor latencia en comportamientos de cortejo según lo indican los valores de latencia para el total del comportamiento reproductivo, aunque tampoco se hallaron diferencias significativas (Tabla 3.4).

**Total.** Los valores de latencia para el tiempo total del estudio no mostraron diferencias significativas entre tratamientos para los tres tipos de comportamientos analizados.

COMPORTAMIENTO				TRATAMIENTO			
Tipo	Nivel	H / F	P	Extraños	Conocidos	Habitados 1	Habitados 4
Reconocimiento	Total	H=1.91	0.951	89,56±139,70	24,72±16,95	46,89±66,68	50,33±50,65
Agresión	Baja	H=4.026	0.259	140,67±206,96	873,86±1462,19	927,00±1572,37	710,86±1312,07
	Media	H=0.619	0.892	463,78±803,94	349,5±397,25	189±85,64	227,56±202,38
	Alta	H=6.702	0.082	1027,67±1326,04	296,3±294,18	252,86±200,51	973,78±1178,57
	Total	H=1.415	0.702	121,11±157,46	158,81±150,11	652,11±1524,75	146,89±177,06
Reproducción	Cortejo 1	H=0.634	0.888	681,33±1083,42	205,63±255,31	658,78±1050,33	553,5±808,04
	Cortejo 2	H=0.192	0.979	518,78±662,84	311,72±247,27	277,14±269,47	887,12±1762,35
	Cortejo 3	F=2.365	0.089	315,44±217,65	289,2±154,20	249,89±203,53	518,33±333,83
	Cortejo 4	H=3.978	0.264	618±876,73	916,2±1248,97	1075±830,11	631,67±1144,98
	Cópula	F=0.597	0.628	1188,2±970,52	1079,71±1021,01	1871,00±2372,39	332,00±140,00
	Total	H=2.441	0.524	114,67±152,63	119,82±93,07	84,78±85,53	214,44±260,62

**Tabla 3.5.** Latencia promedio (en segundos) a la primera ocurrencia de distintos comportamientos durante los tres días de encuentro (tiempo total 90 min= 5400s). Los datos se expresan como media ± DE. p correspondiente a los valores de H de Kruskal-Wallis o F de ANOVA. gl=3 en todos los casos

La similitud entre los valores de latencia de reconocimiento para el primer día (Tabla 3.4) de estudio y para el total del ensayo (Tabla 3.5) indica que casi la totalidad de las hembras manifestaron la mayor parte del reconocimiento durante el primer encuentro, por lo que los valores de latencia total fueron similares a aquellos encontrados durante el primer día de encuentro (Tabla 3.4).

Por otro lado, los valores de latencia de los comportamientos agresivos muestran una gran variabilidad entre tratamientos. Si bien no se encontraron diferencias significativas, los comportamientos de evasión y rechazo (Agresión Baja) ocurren antes en las hembras E que en las hembras restantes. Los comportamientos agresivos de Alta intensidad, como mordeduras y peleas, ocurrieron antes en los tratamientos C y H1 que en E y H4, aunque tampoco resultaron en diferencias significativas (Tabla 3.5).

Los comportamientos reproductivos no presentaron latencias diferentes entre los tratamientos (Tabla 3.5). Sin embargo, es destacable que solo en los C las latencias fueron algo menores para la fase de cortejo 1, al que luego siguieron los comportamientos de cortejo 2 y 3 y con posterioridad la fase 4. En los otros tratamientos, los primeros comportamientos de cortejo fueron correspondientes a la fase 3 y luego fueron seguidos por los de fase 1 o 2 según el tratamiento. La latencia a la cópula no difirió entre tratamientos; notoriamente las dos únicas cópulas obtenidas en H4 ocurrieron a los pocos minutos del primer encuentro de los individuos.

## Frecuencia

**Día 1.** La actividad total de las hembras durante el primer día de interacción no fue diferente entre tratamientos (Tabla 3.6).

Las hembras de los distintos tratamientos desplegaron comportamientos de reconocimiento con frecuencia similar durante el primer día de encuentro (Tabla 3.6). La frecuencia de actos agresivos en el nivel de intensidad Baja fue significativamente distinta entre tratamientos: las hembras E dirigieron a su compañero mayor número de actos agresivos que las hembras C y H1 (Comparación Múltiple de Holm-Sidak:  $t=2.910$  y  $p=0.006$ ,  $t=2.635$  y  $p=0.013$ , respectivamente), pero no que H4 ( $t=1.990$  y  $p=0.055$ ). La frecuencia con la que fueron realizados actos agonísticos en el nivel de agresión Alta y para el total de agresión no fue diferente entre tratamientos, pero comparativamente se encontró que las hembras de los tratamientos con exposición a olor realizaron estos comportamientos con menor frecuencia que las hembras E. Por otro lado, dentro del nivel de agresión Media el valor de frecuencia promedio fue muy similar para los cuatro tratamientos (Tabla 3.6).

Para los comportamientos reproductivos las diferencias entre tratamientos no resultaron significativas. En general, se observa para las hembras de los cuatro tratamientos mayor frecuencia de los comportamientos incluidos en Cortejo 2 (C2). Los comportamientos incluidos dentro Cortejo 1 (C1) y Cortejo 3 (C3) fueron realizados por las hembras con similar frecuencia entre los distintos tratamientos. Sin embargo, en el nivel de Cortejo 4 (C4) las hembras E presentaron alta frecuencia, particularmente en el comportamiento de monta (Ver Apéndice, Tabla II). En este mismo tratamiento fue donde se verificó la mayor frecuencia de cópulas, si bien las diferencias no resultaron significativas.

COMPORTAMIENTO				TRATAMIENTO			
Tipo	Nivel	H/F	P	Extraños	Conocidos	Habitados 1	Habitados 4
Reconocimiento	Total	F=1.271	0.300	20.22±10.39	28.81±13.24	19.67±12.21	20.22±14.04
Agresión	Baja	F=3.395	0.029	15.56±12.95 <sup>a</sup>	4.09±5.15 <sup>b</sup>	4.67±6.14 <sup>b</sup>	7.33±9.38 <sup>a,b</sup>
	Media	F=0.030	0.993	5.11±3.55	5.82±6.91	5.67±6.59	5.33±4.52
	Alta	F=1.222	0.317	14.89±19.05	8.09±6.93	5.89±7.50	6.11±8.81
	Total	F=1.216	0.115	35.56±27.18	18±12.08	16.22±14.18	18.78±18.94
Reproductivo	Cortejo 1	F=0.545	0.655	9.89±11.44	13.45±9.13	8.11±8.52	12.55±11.98
	Cortejo 2	F=0.432	0.732	22.67±43.49	23.2±26.26	18.78±35.15	38.11±51.54
	Cortejo 3	H=1.664	0.645	14.55±10.10	11.27±7.96	14±15.27	8.67±8.05
	Cortejo 4	H=1.664	0.645	20.89±22.33	12.72±11.60	8.78±13.45	6.89±11.37
	Cópula	F=1.005	0.403	2.55±3.71	1.54±2.16	1.11±2.42	0.55±1.33
	Total	H=1.965	0.580	68±55.66	60.64±35	49.67±63.46	66.22±75.44
Actividad	Total	F=0.428	0.734	123.78±67.2	107.45±42.7	85.56±85.87	105.22±88.0

**Tabla 3.6.** Frecuencia promedio de actos de cada comportamiento ocurridos durante el primer día de encuentro. Los datos se expresan como media  $\pm$  DE. Valores de p correspondientes a H de Kruskal-Wallis o F de ANOVA. Letras distintas indican diferencias significativas (Prueba de comparaciones Múltiples  $p<0.05$ ).  $g_l=3$  en todos los casos

**Frecuencia total.** El total de actividad desarrollado por las hembras a lo largo del estudio no presentó diferencias significativas entre los tratamientos. Cuando se analizaron en conjunto los tres encuentros, las frecuencias de los distintos tipos de comportamientos mostraron proporciones similares a las encontradas mediante el análisis por separado de cada encuentro (Tabla 3.7).

COMPORTAMIENTO		TRATAMIENTO					
Tipo	Nivel	H/F	P	Extraños	Conocidos	Habitados 1	Habitados 4
Reconocimiento	Total	F=0.414	0.744	42,5±19,96	54±19,55	49,33±35,81	40±28,37
Agresión	Baja	F=3.323	0.034	22±14,52 a	5,28±5,43b	8±10,59 b	9,5±12,42 b
	Media	H=1.661	0.646	10,87±5,25	13,57±9,43	9,56±10,55	8,25±5,67
	Alta	H=2.587	0.460	22,75±17,88	13,28±8,67	16±13,33	12,37±11,60
	Total	F=1.495	0.237	51,89±25,37	32,14±15,81	33,55±29,19	30,12±23,03
Reproductivo	Cortejo 1	F=0.523	0.670	23±20,55	35,87±17,17	24,44±22,50	25,75±25,52
	Cortejo 2	H=0.457	0.457	39,25±59,47	36,28±16,37	37,56±58,61	55,37±93,50
	Cortejo 3	H=2.974	0.396	25,25±20,02	24,85±19,04	33,55±36,75	11,5±11,90
	Cortejo 4	H=3.914	0.271	45,62±39,90	13,57±10,13	18,89±27,46	9,5±15,38
	Cópula	F=2.980	0.048	4,75±4,65 a	1,43±2,15 b	1,67±3,04 b	0,56±1,33 b
	Total	H=2.817	0.421	133,12±100,04	110,57±28,69	114,44±123,60	101,88±131,78
Actividad	Total	F=0.245	0.864	231,21±118,63	196,71±42,13	197,33±183,44	172,12±151,56

**Tabla 3.7-** Frecuencia promedio de actos de cada tipo y nivel de comportamiento ocurridos durante el tiempo total de ensayo. Los datos se expresan como media  $\pm$  DE. Valor de p correspondiente a H de Kruskal-Wallis o F de ANOVA. Letras distintas indican diferencias significativas (Prueba de Comparaciones Múltiples.  $p < 0.05$ ).  $gl=3$  en todos los casos.

La frecuencia con la que a lo largo del estudio las hembras realizaron distintos comportamientos de reconocimiento fue similar entre los tratamientos (Tabla 3.7). Las hembras E escaparon, evitaron y rechazaron al macho más frecuentemente que las hembras de los tratamientos restantes (Agresión Baja Comparaciones Múltiples de Holm-Sidak: hembras C:  $t=2.836$  y  $p=0.008$ , H1:  $t=2.530$  y  $p=0.017$  y H4:  $t=2.195$  y  $p=0.037$ ). Las hembras incluidas en este tratamiento también se involucraron más frecuentemente en comportamientos de mayor agresividad (agresión Alta), aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Los comportamientos de agresión Media no mostraron diferencias entre los tratamientos (Tabla 3.7).

La frecuencia de comportamientos reproductivos realizados por las hembras no fue diferente entre tratamientos (Tabla 3.7). En el análisis de la frecuencia total se encontró nuevamente la predominancia de actos C2, especialmente en el cortejo de H4. Las hembras E desarrollaron mayor número de actos reproductivos de precópula y cópula (C4), alcanzando un número significativamente mayor de cópulas que las hembras de los tratamientos restantes (Comparaciones Múltiples de Holm-Sidak  $p < 0.05$ ).

### Duración

**Día 1.** Las hembras C dedicaron más tiempo al reconocimiento que las hembras de los restantes tratamientos, sin que se encuentren diferencias significativas (Tabla 3.8). El reconocimiento táctil de los individuos (contacto Naso-nasal) fue significativamente menor en las hembras E que en demás tratamientos (Ver Apéndice, Tabla III).

COMPORTAMIENTO		TRATAMIENTO					
Tipo	Nivel	H/F	P	Extraño	Conocido	Habituosos 1	Habituosos 4
Reconocimiento	Total	F=2.335	0.091	43,4±36,7	76,13±55,4	35,2±31,4	35,2±31,4
Agresión	Baja	H=5.381	0.146	116±173	22,3±28,3	7,79±12,9	43,8±70,4
	Media	F=0.924	0.442	15,5±13,7	26,5±25,4	15,6±11,95	15,12±10,8
	Alta	F=0.580	0.901	12,9±15,8	7,65±5,98	7,86±6,61	6,36±6,28
	Total	H=3.747	0.290	141,55±180,40	43,27±31,5	25,37±23,05	53,5±63,37
Reproducción	Cortejo 1	H=3.856	0.277	37,2±33,6	44,5±40,3	23,5±32,3	65,4±48,9
	Cortejo 2	H=3.010	0.390	242,56±536,32	179,95±227	140,5±240	341,43±514,24
	Cortejo 3	H=1.564	0.668	45,1±41,5	40,5±29,3	65,8±72,4	25,7±19,9
	Cortejo 4	F=1.085	0.379	558,7±449,1	359,4±320,3	289,4±363,6	167,1±252,2
	Cópula	F=1.014	0.431	206,3±161,0	104±43,6	129,5±82,7	73±73,5
	Total	H=4.159	0.245	662,05±698,52	523,04±507,33	356,77±606,09	434,94±644,15

**Tabla 3.8.-** Duración promedio de cada tipo y nivel de comportamiento ocurridos durante el primer día de ensayo. Los datos se expresan como media ± DE. Valores de P correspondientes a H de Kruskal-Wallis o F de ANOVA. gl=3 en todos los casos

En el primer día de encuentro la duración de los comportamientos agresivos fue mayor en las hembras pertenecientes al tratamiento E que en las hembras tratadas con exposición a olor, y si bien las diferencias no resultaron estadísticamente significativas, estas hembras dedicaron un tiempo comparativamente mayor a la huida y rechazo del macho (agresión Baja). Las hembras E también dedicaron más tiempo a los comportamientos reproductivos junto con las hembras C, manteniéndose por encima de las hembras Habituosas (H1 y H4). Las hembras E, por otro lado, dedicaron más tiempo a aquellos comportamientos de precópula y cópula (C4), sin que estas diferencias resultaran significativas (Tabla 3.8).

**Total.** El análisis de los encuentros en conjunto mostró que hembras que fueron sometidas a tratamientos de exposición previa al olor de un macho dedicaron menos tiempo a la realización de comportamientos agresivos que las hembras sin exposición a olor. Al mismo tiempo, fue en este último tratamiento (E) donde se encontró mayor duración de los comportamientos reproductivos.

COMPORTAMIENTO		TRATAMIENTO					
Tipo	Nivel	F/H	P	Extraños	Conocidos	Habitados 1	Habitados 4
Reconocimiento	Total	F= 0.203	0.893	144,75±65,74	123,36±46,68	116,55±114,34	92,06±84,78
Agresión	Baja	H=6.450	0.092	146,45±195	9,28±10,91	17,83±32,30	40,93±77,40
	Media	H=5.424	0.143	166,93±395,52	39,93±28,54	17,67±19,50	19±13,13
	Alta	F=1.296	0.295	18,12±13,64	8,57±5,49	13,28±11,31	9,69±9,17
	Total	F=3.076	0.043	331,50±441,30	57,78±32,31	48,78±56,95	69,62±77,51
Reproductivo	Cortejo 1	F=0.257	0.856	77,19±82,34	116,287±66,96	95,89±105,85	86,37±94,18
	Cortejo 2	H=2.969	0.396	295,81±598,92	204,21±131,24	323,22±424,87	487,87±1065,58
	Cortejo 3	H=4.169	0.244	130,06±140,30	110,64±98,97	160,28±176,72	34,18±26,94
	Cortejo 4	H=5.307	0.151	829.92±709.40	255.92±246.23	535.80±503.53	182.10±266.79
	Cópula	F=1.635	0.204	131,87±191,98	57±61,04	38,55±75,49	18,25±43,75
	Total	H=3.245	0.355	1133.63±951.12	653.66±348.34	752.75±875.04	721.77±1246.10

**Tabla 3.9-** Duración promedio de cada tipo y nivel de comportamiento ocurridos en el tiempo total del ensayo. Los datos se expresan como media  $\pm$  DE. Valores de P correspondientes a H de Kruskal-Wallis o F de ANOVA.  $gl=3$  en todos los casos.

Las hembras pertenecientes a los diferentes tratamientos invirtieron tiempos semejantes en el reconocimiento (Tabla 3.9). Por otro lado, el tiempo total dedicado al despliegue de comportamientos agresivos fue significativamente diferente entre los tratamientos: las hembras E invirtieron más tiempo en agresión que las hembras pertenecientes a tratamientos con exposición a olor. Particularmente, este patrón de tendencias se repite dentro de los diferentes niveles de comportamientos agresivos (Tabla 3.9), sin embargo estas diferencias no fueron significativas.

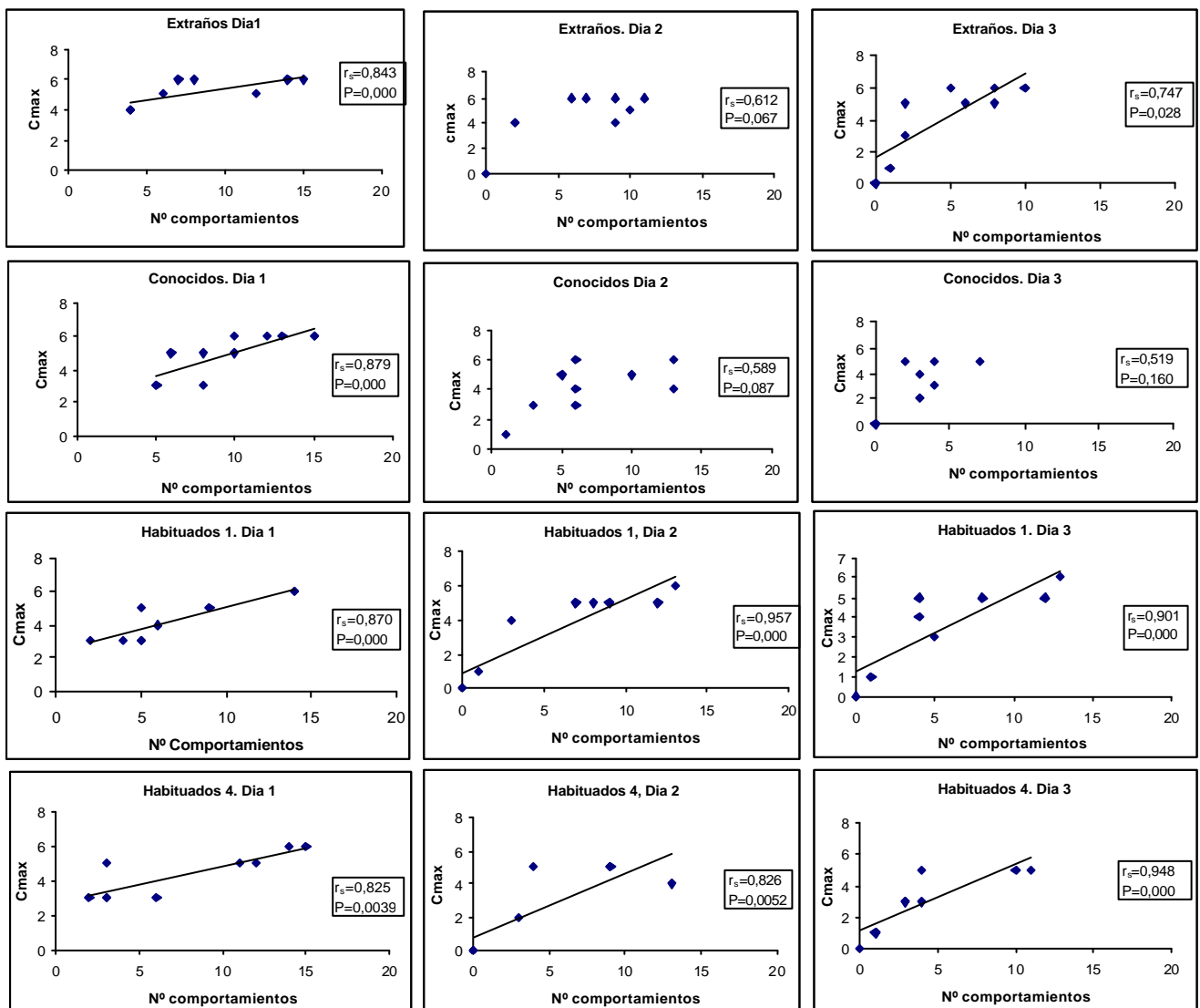
Los tiempos totales para los comportamientos reproductivos mostraron un patrón similar a los encontrados en el análisis particular de cada encuentro: las hembras H4 dedicaron una proporción de tiempo mayor a C2 que a las fases C3 y C4. Incluso cuando se compara entre tratamientos, estas hembras presentaron mayor tiempo empleado en C2 y menor tiempo de duración de C3 y C4 (incluyendo la cópula y la monta) que las hembras de los tratamientos restantes. Las hembras E y H1 invirtieron la mayor parte del tiempo destinado al cortejo en comportamientos incluidos en C4 (Tabla 3.9).

A pesar de que no se observaron diferencias significativas, el tiempo promedio dedicado al total de los comportamientos reproductivos fue comparativamente mayor en las hembras E (Tabla 3.9). La duración total promedio de las cópulas en las hembras no difirió estadísticamente entre tratamientos, aunque las hembras pertenecientes al tratamiento E destinaron en promedio mayor tiempo que los restantes tratamientos a la cópula.

## Ocurrencia

El repertorio de comportamientos (medido como ocurrencia) utilizado por los organismos a lo largo de los tres días de encuentro fue similar entre los tratamientos, tanto para los comportamientos agresivos (ANOVA:  $F= 0.815$ ,  $P= 0.498$ ) como los reproductivos (ANOVA:  $F=0.279$ ,  $P= 0.840$ ).

Con el fin de analizar si existe una relación entre el grado de desarrollo del cortejo alcanzado y el despliegue de comportamientos reproductivos, se realizó un análisis de correlación entre el Cmax y la ocurrencia de comportamientos reproductivos. Para todos los tratamientos y días se verificó la existencia de correlación positiva (Figura 3.5), demostrando que para llegar a un nivel avanzado de cortejo y eventualmente cópula, se requiere un complejo repertorio.



**Figura 3.5.** Relación entre el número de comportamientos y la fase de cortejo alcanzada (Cmax: nivel máximo de cortejo alcanzado); para cada tratamiento (de arriba hacia abajo: Extraños, Conocidos, Habitados 1 y Habitados 4) y en cada uno de los encuentros (de derecha a izquierda: días 1, 2 y 3). Correlación de Spearman, se presentan los valores de  $r_s$  y  $p$ .

## DISCUSIÓN

Este estudio demuestra que las hembras de tuco-tucos, utilizan la información química contenida en productos metabólicos de los machos y en consecuencia modulan algunos aspectos de su comportamiento reproductivo. Sin embargo, las respuestas encontradas no concuerdan claramente con las predicciones formuladas inicialmente. El efecto de la familiarización fue verificado en el tratamiento de los Conocidos y especialmente evidenciado por la falta de refuerzos en las cópulas. Además, las hembras familiarizadas iniciaron más tempranamente comportamientos de reconocimiento y dedicaron más tiempo al contacto no agresivo que el resto de los tratamientos. Contrariamente a lo esperado, la familiarización no acortó las latencias a la obtención de cópulas. Las hembras que interactuaron con machos Extraños presentaron resultados muy interesantes: inicialmente requirieron un período de evaluación, evidenciado por latencias algo mayores al reconocimiento y despliegues significativamente mayores de comportamientos de baja agresión tales como la evitación y el rechazo. Estas hembras fueron las que mostraron mayor actividad reproductiva, dada por las diferencias significativas en frecuencia de cópula y las tendencias mostradas por la frecuencia de monta y proporción de parejas que copularon. Sin embargo, estas parejas presentaron una latencia algo mayor a la cópula y la interacción con los machos se caracterizó por mayores índices de agresión (mayores frecuencias de agresión alta y duración de la agresión total). Notoriamente, y a diferencia de lo ocurrido en el tratamiento de Conocidos todas las cópulas obtenidas entre Extraños fueron reforzadas en días siguientes.

La familiarización no implicó prescindir de comportamientos agresivos de jerarquía alta, más bien parece ser un requisito necesario para llegar al cortejo y cópula en esta especie. Para que un encuentro entre el macho y la hembra sea exitoso en términos reproductivos, se espera que la pareja se aparee. En este trabajo se encontró que existe una correlación positiva entre el número de comportamientos desplegados y el alcance del cortejo, es decir, que durante el desarrollo del cortejo hasta que finalmente se concreta en cópula, intervienen un número creciente de comportamientos reproductivos. En el roedor subterráneo *Spalax ehrenbergi*, Nevo (1969) atribuye el despliegue de un elaborado cortejo en función de superar la hostilidad que caracteriza los encuentros entre individuos y así inducir a las hembras a copular, evidenciándose en esta especie que niveles muy altos de agresión resultan en un impedimento para alcanzar la cópula (Shanas *et al.* 1995). Sorprendentemente, los tratamientos de habituación con un olor (H1 y H4), no respondieron como Extraños, ya que presentaron menor actividad reproductiva general, pero a su vez las latencias al

reconocimiento fueron bajas, así como también la agresión desplegada. Las hembras expuestas al olor de distintos machos (Habitados 4) se caracterizaron por un comportamiento reproductivo donde la actividad se concentró en la segunda fase del cortejo (C2), exhibiendo en las fases siguientes baja actividad. Las hembras habituadas a un macho y expuestas a interacción con otro (Habitados 1) mostraron como particularidad una mayor actividad (duración y frecuencia) durante el tercer día de encuentro con relación a los tratamientos restantes, lo que puede atribuirse a que el decaimiento de actividad entre el segundo y tercer día fue menos acentuado entre estas hembras.

El diseño experimental utilizado en este estudio, en el que se otorga a las hembras la posibilidad de interactuar con un individuo preferido (entre un par de machos), resultó en la obtención de un amplio repertorio de comportamientos reproductivos, representando una fracción que supera el 50% de la actividad de interacción. Sin embargo, el éxito reproductivo resultante fue extremadamente bajo, lo cual impidió analizarlo en función de los tratamientos de familiarización. Las dos hembras que completaron la preñez (12%= 2/17 parejas que copularon) pertenecieron una al tratamiento Conocidos y la otra a Extraños. En el primer caso la preñez se desencadenó como consecuencia de una sola cópula mientras que en la segunda corresponde a una serie de cópulas en una misma interacción y un refuerzo en el día siguiente.

***Familiaridad: reducción de la agresividad y facilitación del comportamiento reproductivo.***

En especies solitarias con individuos que mantienen territorios adyacentes, la familiaridad resulta un mecanismo eficiente en el reconocimiento de vecinos y selección de pareja. La familiaridad posee un efecto de minimización de la agresión, incrementando la tolerancia entre vecinos (Temeles 1994). Las hembras que son menos agresivas con machos familiares les permiten aproximarse e iniciar comportamientos sexuales. El proceso de familiarización puede requerir del contacto directo pero eventual entre los miembros de una pareja, la cohabitación o la estimulación mediante señales químicas depositadas por el macho en cercanía del rango de acción de las hembras (Tabla 3.10). La ausencia de refuerzo de cópula en Conocidos evidencia diferencias entre este tratamiento y el de Extraños, especialmente en relación a los costos asociados al cortejo. La mayor agresión encontrada en los E se adiciona a que el refuerzo de cópula implica la repetición y el despliegue de un cortejo elaborado, donde la barrera de agresión característica de los individuos de esta especie debe ser gradualmente superada. En las hembras del tratamiento Conocidos, las latencias menores al reconocimiento y la ausencia de refuerzo de cópula, sugieren que la familiaridad actuaría en este caso reduciendo costos energéticos y tiempo del cortejo y probablemente, el estrés producido por

encuentros agonísticos. Por otro lado, el comportamiento de apareamiento en esta especie está caracterizado por interrupciones de la cópula ocasionadas por movimientos de escape de la hembra (Zenuto *et al.* 2002). En las hembras del tratamiento Extraños los comportamientos de agresión durante el apareamiento fueron más frecuentes y de mayor duración. Posiblemente, en el caso en que las hembras no poseen conocimiento previo del macho, la evaluación de este continuaría desde el encuentro de los individuos hasta niveles avanzados en el cortejo, lo cual se evidencia por la frecuencia de evitación y rechazos.

El logro de la familiarización favorecería a ambos sexos; los machos lograrían incrementar sus chances de aceptación y tener prioridad en el acceso a las hembras mientras que éstas estarían probablemente obteniendo apareamientos con machos dominantes, dada la capacidad de éstos para mantener sus marcas en el terreno (Hurst y Rich 1999). Se reconoce que las hembras que seleccionan parejas de alta calidad, logran beneficios directos (por ejemplo: disminución de riesgos de contagio de parásitos durante la cópula, cuidado parental, menores riesgos de infanticidio) así como “buenos genes” para su progenie (Andersson 1994). Si las hembras utilizaran como medida de evaluación de la capacidad competitiva de un macho su capacidad para demarcar el territorio, éstas preferirían copular con los machos cuyas señales químicas son las de mayor frecuencia de encuentro. En este caso se esperaría que el comportamiento reproductivo sea facilitado guardando una correlación con el aumento del tiempo de permanencia del olor del macho en presencia de la hembra, es decir, que en Conocidos el comportamiento reproductivo sea mayor que en el resto de los tratamientos, lo cual no se verificó en *C. talarum*.

Hasta el momento, no se ha analizado si la familiarización por señales químicas es una estrategia generalizada entre los mamíferos y menos aún si su magnitud varía en relación al sistema social y de apareamiento. La recopilación de evidencias reportadas para roedores (Tabla 3.10) permite visualizar que la importancia de la familiarización en el comportamiento de asociación y/o selección de pareja ha sido mayormente estudiada en especies monogámicas; de hecho la confirmación de este comportamiento es utilizado como estimador de este sistema de apareamiento (Patris y Baundoin 1998). Sin embargo, existen evidencias de preferencia sobre machos familiares en especies fuertemente poligínicas y en otras que presentan una marcada flexibilidad en sus sistemas sociales y de apareamiento. Si la ventaja de aparearse con un individuo familiar se encuentra asociada a la obtención de beneficios para la hembra o sus crías, resultaría probable que la familiaridad opere principalmente en parejas monogámicas, mientras que, si representa la obtención de buenos genes para la progenie,

también sería factible bajo sistemas poligínicos. De todas formas, si la familiaridad resulta de la extensión de la hipótesis de “mi querido enemigo”, donde se verifica una disminución general de la agresión entre vecinos, se espera que opere en individuos que establezcan territorios estables multipropósito (reproducción y alimentación), independientemente del sistema de apareamiento (Temeles 1994).

### ***Hipótesis alternativas***

Alternativamente a la familiaridad pueden plantearse otras hipótesis que intenten explicar el comportamiento observado en las hembras de *C. talarum*. Los olores biológicos son importantes en la fisiología reproductiva y comportamiento de numerosas especies de roedores; la exposición al olor de hembras en estro a los machos aumenta la frecuencia de los comportamientos de olfateo y monta (Newman y Tang Halpin 1988), e incluso la presencia de feromonas de los machos pueden inducir el estro en las hembras (Carter *et al.* 1980). Según estas evidencias, la exposición de las hembras al olor de un macho generaría predisposición a la cópula. Esta hipótesis no sería aplicable en nuestro caso ya que las hembras expuestas al olor de un macho (Conocidos, Habitados 1 y Habitados 4) presentaron en su conjunto menor comportamiento reproductivo que las hembras sin exposición (Extraños).

En especies donde la evitación de la endogamia es importante, la familiaridad puede ser utilizada como un mecanismo involucrado en la inhibición de apareamientos, reforzando el reconocimiento de parientes y la dispersión mayoritaria de un sexo (Pusey y Wolf 1996). Si bien en *C. talarum* la dispersión involucra especialmente a los machos, los cuales presentan menor relación de parentesco entre sí que las hembras ubicadas en sus alrededores (Zenuto *et al.* 1999), en esta población se ha detectado una fuerte estructuración genética a escala local (Cutrera *et al.* en prensa). Este hecho, conjuntamente con el alto grado de poliginia reportado (Zenuto *et al.* 1999), y la alta agresión entre machos, representa un escenario de alta competencia local por apareamientos. Evidencias obtenidas en condiciones naturales (proporciones sexuales de adultos, disposición espacial e incidencia de heridas en machos) y estudios en cautiverio (Zenuto *et al.* 2002) permiten proponer que la competencia entre machos es un componente muy importante de la adquisición de parejas, las cuales parecen poseer limitadas oportunidades de elección de machos. ¿Es posible entonces proponer que la posibilidad de aparearse con una pareja extraña represente un beneficio para las hembras? Esto permitiría comprender la actividad reproductiva desplegada por las hembras frente a parejas desconocidas en nuestro tratamiento de Extraños, aún cuando esto represente mayor

costo de cortejo y cópula dado el aumento en el comportamiento de agresión y la necesidad de repetir cópulas de manera de lograr la inducción del estro y/u ovulación. Sin embargo, este argumento debería compartirse para los casos de H1 y H4 ya que aún habiendo estado en contacto con olores de uno o más machos, finalmente interactuaron con un macho extraño. A fin de dilucidar este aspecto, se implementará un diseño experimental que nos permitirá verificar la existencia de selección de parejas por parte de las hembras gracias a la posibilidad de permitirles el libre acceso a pares de machos de diferentes características (familiar vs. extraño, dominante vs. subordinado) bajo una modalidad de confinamiento.

Finalmente, el comportamiento de apareamiento debe ser analizado como el producto de estrategias reproductivas individuales, las cuales reflejan cambios oportunistas en las condiciones sociales o ecológicas en el espacio y el tiempo (Gross 1996). Así, un complejo conjunto de factores tales como la densidad poblacional, niveles de predación, proporciones sexuales operativas, sumado al estado fisiológico y la familiarización, afectan las interacciones con coespecíficos, sus comportamientos de apareamiento y el éxito reproductivo resultante. Este trabajo constituye el primer estudio que considera la funcionalidad del reconocimiento individual a través de pistas químicas en el comportamiento de apareamiento de roedores subterráneos. Los resultados obtenidos permiten proponer que los individuos modulan sus comportamientos de apareamiento en relación a la posibilidad de obtener información química de sus potenciales parejas. Sin embargo, el efecto de la familiaridad no parece ser simple y demanda nuevos estudios que permitan comprender la complejidad de factores involucrados en el comportamiento reproductivo de esta especie.

Especie	Sistema Social	Sistema de apareamiento	Experimento	Preferencia	Referencia
<i>Microtus pennsylvanicus</i> (meadow voles)	Solitarios	Poligínico Promiscuo	Elección de apareamiento entre macho familiar (cohabitación) vs. macho desconocido	Hembras prefieren machos familiares.	Parker <i>et al.</i> 2001.
<i>Microtus ochrogaster</i> (prairie vole)	Territorios por parejas.	Monogámico.	1) Test de preferencia de olor de un macho familiar (pareja) frente a macho desconocido 2) Elección de apareamiento entre macho familiar (por experiencia sexual previa y por alojamiento adyacente) vs. macho desconocido.	1) Las hembras prefirieron los olores del macho familiar (pareja) que los olores del macho extraño. 2) Hembras prefirieron aparearse con machos familiares vs. machos no familiares.	Newman y Tang-Halpin 1988. Shapiro 1986
<i>Peromyscus californicus</i> (california mouse)	Territorios por parejas.	Monogámico.	Testeo de preferencia social de la hembra (en diestro) y preferencia de apareamiento (hembras en estro).	Mayoría de las hembras mantiene preferencia social y de apareamiento frente a un mismo macho.	Gubernick y Addington 1994.
<i>Dipodomys ingens</i> (kangaroo rats)	Solitarios.	Monogamia Promiscuo o Poligínico	Interacción de la hembra con macho familiar (por alojamiento adyacente) y no familiar.	Mayor contacto amigable y reducción de la agresividad frente a machos familiares vs. no familiares	Randall <i>et al.</i> 2002.
<i>Mesocricetus auratus</i> (golden hamster).	Solitarios.	Promiscuo.	Familiarización de las hembras al olor de un macho, luego interacción.	Hembras prefieren aparearse con machos familiares, se reduce la agresión y se facilita el comportamiento reproductivo.	Tang-Martinez <i>et al.</i> 1993.
<i>Mus spicilegus</i> (mound-builder mice)	ND.	Monogámico.	Test de preferencia de la hembra por machos familiares (periodo de contacto limitado) vs. no familiares. Interacción con macho no familiar.	Hembras familiarizadas prefieren la presencia de macho familiar y rehusan copular con el macho no familiar.	Patris y Baundoin 1998.
<i>Mus musculus domesticus</i> (house mouse)	Sociales	Poligínico	Test de preferencia de la hembra por machos familiares vs. no familiares.	Hembras familiarizadas se asocian con el macho no familiar y copularon con él.	Patris y Baundoin 1998.
<i>Microtus montanus</i> (montane vole)	Solitarios.	Poligínico.	Elección de apareamiento entre macho familiar (por experiencia sexual previa y por alojamiento adyacente) vs. macho desconocido.	No hay copulas selectivas con machos familiares vs. no familiares. Hembras prefieren la presencia de machos desconocidos.	Shapiro <i>et al.</i> 1986.

**Tabla 3.10.** Preferencia de pareja en distintas especies de roedores en relación a su sistema de apareamiento y sistema social. ND: no descripto.

**BIBLIOGRAFÍA**

- ANDERSSON, M. 1994. Sexual selection. Princeton University Press. Princeton N. J.
- BARNARD, CJ, HURST JL Y P ALDHOUS. 1991. Of mice and kin: the functional significance of kin bias in social behaviour. *Biol Rev* 66: 379-430.
- BATEMAN, AJ. 1948. Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity* 2: 349-368.
- BLAUSTEIN, AR. 1981. Sexual selection and mammalian olfaction. *Am Nat* 117: 1006-1010.
- BRADBURY, JW Y SLVEHRENCAMP. 1998. Principles of animal communication. Sinauer Associates, Massachusetts.
- BROWN, RE. 1979. Mammalian social odours: a critical review. *Adv. Study Behav.* 10: 103-162
- BROWN, RE Y DW MACDONALD. 1985. Social odours in mammals. Vol 1 y 2. Oxford: Clarendon Press.
- BUSCH, C, AI MALIZIA, OA SCAGLIA Y OA REIG, 1989. Spatial distribution and attributes of a population of *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *J Mamm* 70(1): 204-208.
- CARTER, CS, LL GETZ, L GAVISH, JL MCDERMOTT Y P ARNOLD. 1980. Male-related pheromones and the activation of female reproduction in prairie vole (*Microtus ochrogaster*). *Biol Reprod* 23, 1038 –1045.
- COHEN-PARSONS, M, Y CS CARTER. 1988, Males increase progesterin receptor binding in brain of females voles. *Physiol Behav* 42 191–197.
- COOPERSMITH, CB Y EM BANKS. 1983. Effects of olfactory cues on sexual behavior in the brown lemming. *Lemmus trimucronatus*. *J Comp Psychol* 97: 120-126.
- CUTRERA, AP, EA LACEY Y C BUSCH. 2005. Genetic structure in a solitary rodent (*Ctenomys talarum*): implications for kinship and dispersal. *Molec Ecol* 14:2511-2523.
- DALY, M. 1977. Some experimental tests of the functional significance of scent-marking by gerbils (*Meriones unguiculatus*). *J Comp Physiol* 97: 120-126.
- DOTY, RL. 1986. Odor-guided behavior in mammals. *Experientia* 41: 257-270.
- EISENBERG, JF Y DG KLEIMAN. 1972. Olfactory communication in mammals. *Annu Rev Eco. Syst* 3: 1-32.
- ENDLER, JA. 1992. Signals, signal conditions, and the direction of evolution. *Am. Nat.* 139: 125–153.
- Engel, CR. 1990. Scent marking residency and female choice in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). En: Chemical signals in vertebrates. Vol. 5. (Ed. DW Macdonals, D. Muller-Schwarze y SE Natynczuk). Oxford, Oxford University Press.
- FANJUL, MS, RR ZENUTO Y C BUSCH. 2003. Use of olfaction for sexual recognition in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Acta Theriol* 148(1): 35-46.
- FERKIN, MH, ES SOROKIN, RJOHNSTON Y CJ LEE. 1997. Attractiveness of scents varies with protein content of the diet in meadow voles. *Anim Behav* 53: 133-141.
- FRANCHESCOLI, G. 2000. Sensory capabilities and communication. En: The biology of subterranean rodents: evolutionary challenges and opportunities. (Lacey, EA, JL Patton y GN Cameron, Eds.) The University of Chicago Press, Chicago.
- GOSLING, LM. 1982. A reassessment of the function of scent marking in territories. *Z Tierpsychol.* 60: 89-118.
- GOSLING, LM Y HV MCKAY. 1990. Competitor assessment by scent matching: an experimental test. *Behav Ecol Sociobiol* 26: 415-420.
- GROSS, MR. 1996. Alternative reproductive strategies and tactics: diversity between the sexes. *Tree* 11, 92-98.
- GUBERNICK, DJ Y RL ADDINGTON. 1994. The stability of female social and mating preferences in the monogamous California mouse, *Peromyscus californicus*. *Anim Behav* 47, 599-567.
- GUTIERREZ-GARCIA, AG, Y CM CONTRERAS. 2002. Algunos aspectos etológicos de la comunicación química en ratas y ratones de laboratorio. *Rev Biomédica* 13: 189-209.
- Halpin, ZT. 1986. Individual odors among mammals: origins and functions. *Adv Stud Behav* 16: 39-70.

- HARBORNE, JB. 1994. Introduction to Ecological Biochemistry. Cuarta Edition. Academic Press, New York: 318.
- HURST, JL. 1993. The priming effects of urine substrate marks on interactions between male house mice *Mus musculus domesticus* Schwarz y Schwarz. *Anim. Behav.* 45: 55-81.
- HURST, JL Y TJ RICH. 1999. Scent marks as competitive signals of mate quality. En: Advances in chemical communication in vertebrates. (Johnston, RE, D Müller-Schwarze y P Sorensen, Eds) Kluwer Academic, New York.
- JOHNSTON, RE. 1985. Olfactory and vomeronasal mechanisms of communication. En: Taste, olfaction and the Central Nervous System (Pfaff, DW, Editor). Rockefeller University Press, New York.
- KAVALIERS, M Y DD COLWELL. 1995a. Odours of parasitized males induce aversive responses in female mice. *Anim Behav* 50: 1161-1169.
- KAVALIERS, M Y DD COLWELL. 1995b. Discrimination by females mice between the odours of parasitized and non-parasitized males. *Proc Roy Soc Series B* 261: 31-35.
- KREBS, JR, YNB DAVIS. 1993. Introduction to Behavioral Ecology. Tercera Edición. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- MALIZIA, AI. 1994. Ecología poblacional de *Ctenomys talarum*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina, 96 pp.
- MILLIGAN, SR. 1975. Mating, ovulation and corpus luteum function in the vole *Microtus agrestis*. *J Reprod Fertil* 42:35-44.
- MÜLLER-SCHWARZE, D. 1999. Signal specialization and evolution in mammals. En: Advances in Chemical Signals in Vertebrates (Johnston RE, D Müller-Schwarze y T Sorensen PW, Eds.). Plenum Publishers, New York,
- NEVO, E. 1969. Mole rats *Spalax ehrenbergi*: mating behaviour and its evolutionary significance. *Science* 163: 484-186.
- NEWMAN KS Y Z TANG-HALPIN. 1988. Individual odours and mate recognition in the prairie vole, *Microtus ochrogaster*. *Anim Behav* 36: 1779-1787.
- PATRIS, B Y C BAUDOIN. 1998. Female sexual preferences differ in *Mus spicilegus* and *Mus musculus domesticus*: the role of familiarization and sexual experience. *Anim Behav* 56: 1465-1470.
- PARKER, KJ, KM PHILLIPS Y TM LEE. 2001. Development of selective preferences in captive male and female meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*. *Anim Behav* 61: 1217-1226.
- PENN, D Y W POTTS. 1998. Chemical signals and parasite-mediated sexual selection. *Tree* 13: 391-396.
- PETRULIS, A, M PENG Y RE JOHNSTON. 1999. Effects of vomeronasal organ removal on individual odour discrimination, sex-odour preference, and scent marking by female hamsters. *Physiol. Behav* 66: 73-83.
- POTTS, WK, CJ MANNING Y EK WAKELAND. 1991. Mating patterns in seminatural population of mice influenced by MHC genotype. *Nature* 352: 619-621.
- PUSEY A Y M WOLF. 1996. Inbreeding avoidance in animals. *Tree* 11: 201-206.
- RANDALL, JA, ER HEKKALA, LD COOPER Y J BARFIELD. 2002. Familiarity and flexible mating strategies of a solitary rodent, *Dipodomys ingens*. *Anim Behav* 64: 11-21.
- RANDALL, JA. 1991. Mating strategies of a nocturnal desert rodent (*Dipodomys spectabilis*). *Behav Ecol Sociob* 28: 215-220.
- REDFORD, KH, Y JF EISENBERG. 1992. Mammals of the Neotropics: the Southern Cone. Vol. 2. Chile, Argentina, Uruguay, Paraguay. University of Chicago Press, Chicago. 430 pp.
- RICH, TL, Y JL HURST. 1998. Scent marks as reliable signals of the competitive ability of males. *Anim Behav* 56: 727-735.
- SHANAS, U, G HETH, E NEVO, R SHALGI Y J TERKEL. 1995. Reproductive behavior in the female blind mole rat (*Spalax ehrenbergi*). *J Zool, Lond.* 237: 195-210.

- SHAPIRO, LE, D AUSTIN, SE WARD Y DA DEWSBURY. 1986. Familiarity and mate choice in two species of voles (*Microtus orchrogaster* and *Microtus montanus*). *Anim. Behav.* 34: 90-97.
- TANG - MARTINEZ, Z, MUELLER, LL Y GT TAYLOR. 1993. Individual odours and mating success in the golden hamster *Mesocricetus auratus*. *Anim Behav* 45: 1141-1151.
- TEMELES, EJ. 1994. The role of neighbors in territorial systems: when are they "dear enemies"? *Anim Behav* 47: 339-350.
- TRIVERS, RL. 1972. Parental investment and sexual selection. En: *Sexual Selection and the Descent of Man* (Ed. B. Campbell), London: Heinemann.
- WILLIAMS, GC. 1966. *Adaptation and Natural Selection*. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- WEIR, BJ. 1974. Reproductive characteristics of Histicromorph rodents. *Symp Zool Soc, Lond* 34: 337-343.
- ZENUTO RR, VASALLO A, Y C BUSCH. 2001. A method for studying social and reproductive behavior of subterranean rodents in captivity. *Acta Theriol* 46: 161-170.
- ZENUTO, RR, A VASALLO Y C BUSCH. 2002. Comportamiento social y reproductivo del roedor subterráneo solitario *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae) en condiciones de semicautiverio. *Rev Chi. Hist Nat* 75: 165-177
- ZENUTO, RR Y MS FANJUL. 2002. Olfactory Discrimination of Individual Scents in the Subterranean Rodent *Ctenomys talarum* (tuco-tuco). *Ethology* 108 (7): 629-641.
- ZENUTO, RR, EA LACEY, Y C BUSCH. 1999. DNA fingerprinting reveals polygyny in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Mol Ecol* 8:1529-1532.
- ZENUTO, RR, MS FANJUL Y C BUSCH. 2004. Subterranean rodent *Ctenomys talarum* (tuco-tuco) use chemical communication during breeding season *J Chem Ecol* 30 (11): 2111-2126.

## APÉNDICE

## Latencia Día I

COMPORTAMIENTO			TRATAMIENTO				
Tipo	Comp. Part.	H/F	P	Extraños	Conocidos	Habitados 1	Habitados 4
Reproducción	Aloacicalamiento	F=4.468	0.035	482,5±112,4 <sup>b</sup>	621,1±322,7 <sup>b</sup>	1304±216,3 <sup>a</sup>	377,3±303,9 <sup>b</sup>
	Levanta cola	F=6.665	0.003	295,8±209,2 <sup>b</sup>	466,3±353,9 <sup>b</sup>	493,4±200 <sup>b</sup>	1167±526 <sup>a</sup>
	Monta parcial	H=10.474	0.015	292,3±32,45	432,2±336,6	1800±0,00	1800±0,00

**Tabla I.** Valores de latencia para comportamientos particulares del el primer día de encuentro. Los datos se expresan como media ± DE. Los valores de P corresponden a H de Kruskal-Wallis o F de ANOVA. Letras distintas indican diferencias significativas, Prueba de Comparaciones Múltiples P<0.05. Cuando no se efectuó un comportamiento se asignó la duración total del encuentro (1800 s). Comp. Part.: Comportamientos Particulares. gl=3 en todos los casos

	Día	F/H	P	TRATAMIENTO			
				Extraños	Conocidos	Habitados 1	Habitados 4
Frecuencia de Monta	1	F=2.606	0.068	11.11±11.05	4.82±4.99	3.55±6.29	2.78±4.32
	2	H=5.017	0.170	6.89±8.7	0.56±0.73	3.22±4.76	0.75±1.39
	3	F=1.776	0.174	4.12±5.17	1.12±2.47	2.87±5.14	0.22±0.67
Duración de Monta	1	F=2.064	0.139	226±169	91,8±90	157±127	64,9±86,9
	2	F=2.522	0.103	120.80±112.82	18.25±22.38	41.90±45.00	5.33±3.78
	3	H=4.620	0.202	36.58±45.48	18.75±6.45	83.38±110.70	8.00±6.08

**Tabla II.** Frecuencia y duración del comportamiento de Monta observado en los tres días de interacción. Los datos se expresan como media ± DE. Valores de p correspondientes a H de Kruskal-Wallis o F de ANOVA

Duración de Contacto Naso- nasal	Día	F/H	P	TRATAMIENTO			
				Extraños	Conocidos	Habitados 1	Habitados 4
	1	F=2.961	0.048	3,33±2,29 <sup>a</sup>	10,82±9,17 <sup>b</sup>	12,43±6,73 <sup>b</sup>	11,86±8,13 <sup>b</sup>
	2	H=1.012	0.798	10.67±10.27	5.06±4.95	11.07±17.46	6.07±4.55
	3	H=6.838	0.077	3.40±3.76	2.30±2.11	12.00±10.73	6.25±4.02

**Tabla III.** Duración del comportamiento Contacto Naso-nasal para los tres días de interacción. Valores de p correspondientes a H de Kruskal-Wallis o F de ANOVA. Los datos se expresan como media  $\pm$  DE. Letras distintas indican diferencias significativas, Test de Comparaciones Múltiples Holm- Sidak,  $p < 0.05$ .

## CAPÍTULO IV

**CONDICIÓN REPRODUCTIVA, RECEPTIVIDAD  
COMPORTAMENTAL Y EFECTO DEL MACHO**



## INTRODUCCIÓN

El éxito reproductivo de los mamíferos requiere de la adecuada integración de estímulos fisiológicos, comportamentales, sociales y ambientales. La relación entre la fisiología y el comportamiento es ampliamente reconocida y de particular importancia durante el proceso reproductivo (Adler 1978). El atractivo de la hembra durante el período de fertilidad se manifiesta tanto por pistas conductuales como no conductuales. La manifestación conductual del estro puede involucrar la *atracción*, actividades que indican el interés del macho por la hembra (Beach 1976), y la *receptividad*, conductas de la hembra que indican su interés por el macho, tales como aproximación, inspección genital y monta (Tang-Martinez *et al.* 1993, proceptividad *sensu* Beach 1976). Entre los mamíferos, y especialmente para los roedores, las pistas químicas constituyen un importante componente no conductual del atractivo de la hembra (Brown 1985, Doty 1986). Gran cantidad de estudios han mostrado la importancia de la investigación olfativa durante el cortejo, reconociéndose una estrecha relación entre la atracción de las señales químicas y el estado fisiológico de las hembras que los emiten (Eisenberg y Kleiman 1972, Johnston 1979, 1980, Ferkin y Johnston 1995, Ferkin *et al.* 2004). Durante este período, el incremento de comportamientos tales como la presentación de la zona genital al macho acentúa la atracción por el macho ya que se favorece la transmisión de señales químicas y propicia en primera instancia la investigación de la hembra y finalmente la cópula.

La importancia relativa del ambiente social sobre el patrón reproductivo varía de acuerdo al modo de ovulación de la especie (Milligan 1982). En términos generales, las especies que presentan ovulación espontánea muestran variaciones en las hormonas sexuales, receptividad comportamental y ovulación, de forma cíclica e independiente de la presencia del macho o sus señales químicas. En especies que presentan ovulación inducida, en contraste, la ovulación depende del estímulo provisto por el macho. Para la mayor parte de los ovuladores inducidos, las distintas fases de la activación reproductiva (desarrollo folicular y receptividad comportamental) suceden espontáneamente en respuesta a variables ambientales apropiadas (Bronson 1989). Aunque muchas especies responden consistentemente a factores estacionales, otras como los roedores del género *Microtus*, dependen de factores sociales, como la presencia física o de feromonas del macho (Sawrey y Dewsbury 1985). En los ovuladores inducidos estrictos, la ovulación requiere del estímulo cervico-vaginal resultado del coito, mientras que en los ovuladores inducidos facultativos, estímulos como señales químicas y/o presencia física del macho pueden inducir la ovulación. Por otro lado, no sólo la ovulación resulta estímulo-

dependiente, sino que la ocurrencia del estro vaginal (que en general se manifiesta como un incremento en la cornificación, Hikim *et al.* 1992) varía con las condiciones ambientales y sociales (Cohen-Parsons y Roy 1989, Ramírez y Soufi 1994). El estudio de las variables que afectan la reproducción de estas especies se torna más complejo si se considera que la receptividad comportamental no siempre se encuentra relacionada perfectamente al estro vaginal y la ovulación.

La ovulación inducida parece ser la norma general para la mayor parte de los roedores solitarios (Zarrow y Clarck 1968, Milligan 1982), más aún para los que presentan hábitos subterráneos (Bennett *et al.* 2000), mientras que en los subterráneos sociales se encuentran representantes de ambas estrategias (ovuladores espontáneos como *Heterocephalus glaber* e inducidos, como *Cyptomys hottentotus pretoriae* y *C. h. natalensis*; Faulkes *et al.* 1990, Malherbe *et al.* 2004, Jakson y Bennett 2005). Estos diferentes patrones reproductivos resultan de adaptaciones a diferentes condiciones ambientales y sociales (Bronson 1989). En especies de roedores subterráneos solitarios caracterizadas por alta agresividad, la reproducción suele ser un corto evento donde estas barreras son moderadas. Entonces, la mayoría de ellos se encuentran enfrentados con problemas tales como localizar a posibles parejas y transmitirles su intención de aparearse en un ambiente con limitadas posibilidades de comunicación (Bennett *et al.* 2000). De esta forma, la inducción de la ovulación representaría una estrategia reproductiva beneficiosa para muchas de estas especies, permitiendo responder rápidamente ante las oportunidades de apareamiento. En el solitario *S. ehrenbergi* las hembras permanecen en un estro vaginal continuo durante la estación reproductiva, pero requieren más de un período copulatorio para ovular (Shanas *et al.* 1995); sin embargo el efecto del olor o de presencia del macho no fueron investigados para esta especie. Numerosos estudios han abordado el comportamiento de hembras y machos durante el cortejo y la cópula (ver Bennett *et al.* 2000), pero los cambios conductuales en relación al estado reproductivo no han sido estudiados en roedores subterráneos solitarios.

Como fue mencionado en capítulos previos, el roedor subterráneo solitario *Ctenomys talarum* presenta estacionalidad en la reproducción, la cual estaría relacionada a diferentes factores ambientales. La ovulación, por otro lado, parece estar condicionada al estímulo copulatorio; Weir (1974) reportó que sólo habían sido hallados cuerpos lúteos en hembras que copularon, aunque las particularidades de estos resultados no fueron mencionadas (cópulas en cautiverio, detección de las cópulas, condiciones previas de las hembras, etc). El cortejo de *C. talarum* se caracteriza, en condiciones de semicautiverio, por vocalizaciones, olfateo de la zona

genital, intentos de monta, mordiscos gentiles, aproximación de la hembra en búsqueda del contacto con la pareja, marcado e investigación de los espacios ajenos (Zenuto *et al.* 2002). Durante el cortejo, la olfacción de coespecíficos es de gran importancia (Zenuto *et al.* 2001), cuando ambos sexos son capaces de discriminar la condición reproductiva mediante señales químicas (Zenuto *et al.* 2004). Así, se ha sugerido que la condición reproductiva de las hembras afectaría las señales que producen, así como también la respuestas a señales de los coespecíficos (Zenuto *et al.* 2004). Una mayor comprensión de la relación existente entre la receptividad comportamental, citología vaginal y estado fisiológico (niveles de hormonas sexuales) determinando el éxito de apareamiento, así como la evaluación del rol del macho y la cópula en la inducción de la ovulación constituyen información clave para entender la reproducción en esta y otras especies de roedores subterráneos. El presente capítulo tiene como objetivo: (1) evaluar si el estado reproductivo (medido a través de la citología vaginal y hormonas sexuales) afecta la conductas de sollicitación (receptividad) de la hembra y (2) evaluar si la interacción con el macho afecta la condición reproductiva (citología vaginal y hormonas) de las hembras de *Ctenomys talarum*. Para esto, se realizó una aproximación combinada entre observaciones comportamentales, citología vaginal, niveles de hormonales (estrógeno y progesterona) e histología ovárica.

#### METODOLOGÍA

**Animales: captura y mantenimiento en cautiverio.** Individuos adultos de *C. talarum* fueron capturados en la localidad de Mar de Cobo (37° 45' S, 57° 56' O) utilizando trampas de captura viva tipo tubo ubicadas en las bocas de las cuevas donde se registró actividad excavatoria reciente. Las hembras fueron capturadas antes de la época reproductiva (marzo-mayo) a fin de evitar toda posible actividad sexual previa a los experimentos, mientras que los machos fueron capturados durante la estación reproductiva (junio-enero). Los animales fueron transferidos a un bioterio donde se alojaron individualmente en cajas plásticas (42x 34x 26 cm) con 3 cm de cama de virutas de madera. La habitación se mantuvo en condiciones de termoneutralidad ( $23 \pm 1$  °C) y bajo condiciones naturales de fotoperíodo. Los individuos fueron alimentados *ad libitum* con zanahorias, batatas, alfalfa, pastos mixtos y semillas de girasol. Los machos fueron mantenidos en un período de adaptación al bioterio por al menos 4 días antes de participar de los ensayos.

**Diseño experimental.** Los encuentros de apareamiento fueron realizados de acuerdo a las condiciones descritas en el capítulo 3, las cuales involucran inicialmente un *test de preferencia*

y posteriormente un *ensayo de interacción* de 30 minutos de duración. Se realizaron 20 ensayos, para lo cual se emplearon 20 hembras y 16 machos (los machos solo fueron reutilizados luego de al menos 10 días entre ensayos).

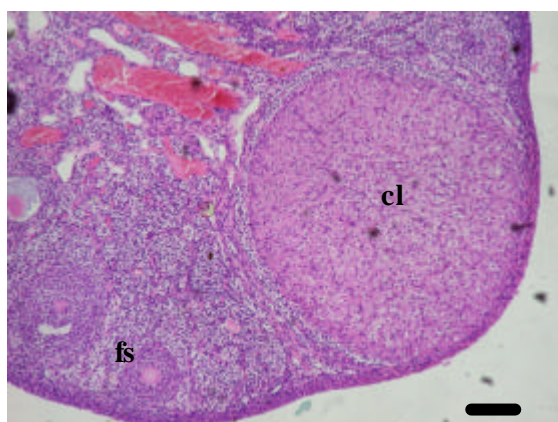
**Citología vaginal.** Para cada hembra que participó de un ensayo de interacción se tomaron muestras del epitelio vaginal (ver Cáp. 1) en tres períodos: uno el día anterior, el segundo al finalizar el ensayo de interacción y un tercero a las 24 hs del mismo. Se cuantificaron las proporciones celulares en cada uno de las muestras de epitelio vaginal, calculándose el porcentaje de células epiteliales y el índice de cornificación (IC).

**Análisis hormonales.** A fin de obtener muestras de orina para realizar las determinaciones hormonales (estrógeno y progesterona), se utilizaron cajas metabólicas similares a las descritas por Drozds (1975) donde se colocó a cada individuo durante la noche previa y la noche posterior a la interacción con el macho. Las muestras de orina fueron colectadas a lo largo de 12 horas, en vasos de precipitado conteniendo vaselina, luego fueron fraccionadas, congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y almacenadas hasta que las determinaciones fueran realizadas (tiempo máximo: 15 semanas). Las muestras de orina que se contaminaron con heces fueron descartadas.

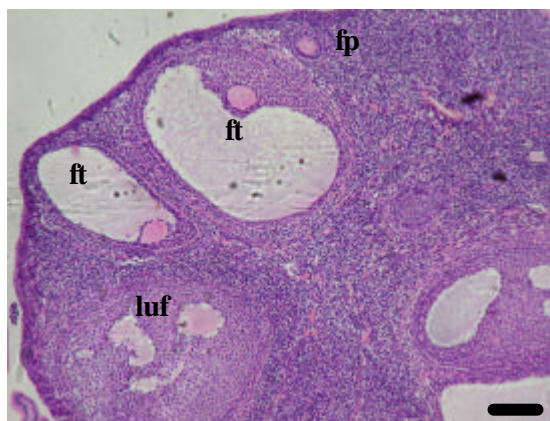
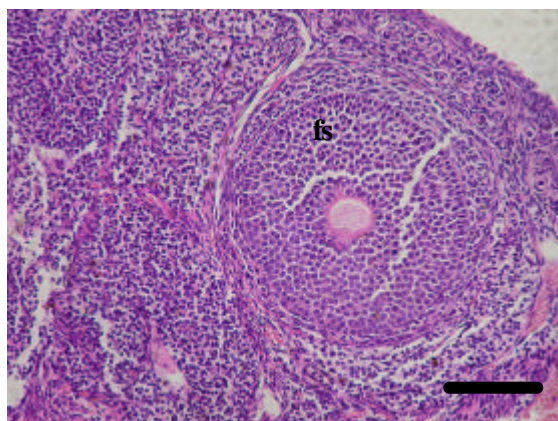
Debido a que las determinaciones de estrógeno y progesterona fueron realizadas en orina, las mismas fueron corregidas, por su variación en relación a la ingesta de fluidos. Para esto se determinó la concentración de creatinina, la cual se excreta a una tasa relativamente constante (Malherbe *et al.* 2004). Así, los resultados fueron estandarizados expresándolos en ng o pg de hormona / mg de creatinina (ng/ mg Cr). Las determinaciones de estrógeno, progesterona y creatinina fueron realizadas por el Laboratorio Biomédico Dr. Rapela (M. Vet M. C. Silva, MN 4957- Capital Federal, Argentina), mediante técnicas de Inmunoensayo (MEIA), Electroquimioluminiscencia y Cinético, respectivamente.

**Histología de los ovarios.** Se realizaron observaciones cualitativas de los ovarios para un subgrupo de hembras (n= 17), las cuales fueron sacrificadas por inhalación de cloroformo al quinto día posterior a la interacción con el macho. Los órganos reproductores fueron removidos inmediatamente y almacenados en formalina. Para cada hembra, ambos ovarios fueron tratados mediante una técnica histológica estándar (Drury y Wallington 1967): deshidratados con etanol, embebidos en parafina, seccionados en forma semiseriada (6  $\mu\text{m}$  de espesor), montados, teñidos con hematoxilina-eosina y observados bajo esteromicroscopio (x 100). La actividad ovárica fue evaluada, para lo que se diferenciaron: folículos secundarios, folículos terciarios, cuerpos lúteos

(Willingstorfer *et al.* 1998) y folículos luteinizados (LUF: 'luteinized unruptured follicle', Weir y Rowlands 1974), ver Fig. 4.1.



**Figura 4.1.** - Fotomicrografías de cortes histológicos de ovarios: a) cuerpo lúteo (cl), b) folículo secundario (fs) y c) folículo primario (fp) folículos terciarios (ft) y folículos luteinizados (luf).



**Observaciones comportamentales.** Los comportamientos receptivos observados durante las interacciones fueron seleccionados en base a estudios previos (Zenuto *et al.* 2002, Cáp. III) y son detallados en la Tabla 4.1. Los comportamientos de cortejo evaluados en el presente estudio incluyen principalmente el canal táctil y el químico. El canal auditivo no fue utilizado dada la dificultad de registrar y cuantificar las vocalizaciones. Dentro de los táctiles, la monta, los empujones y mordiscos son los más conspicuos. La comunicación química, por otra parte, se encuentra ligada a otro grupo de conductas receptivas de la hembra tales como la exposición de la grupa, y levantar la cola. Durante estos comportamientos, la hembra expone zonas de gran potencial de emisión de señales químicas en relación al estado reproductivo. Para cada comportamiento, se registró la frecuencia absoluta de ocurrencia durante los 30 minutos del ensayo.

**Tabla 4.1-** Variables comportamentales registradas. (\*) Tipo de comportamiento A: atracción; R: receptividad.

<b>Comportamiento (*)</b>	<b>Definición</b>
Olfateo zona posterior	H olfatea la zona posterior del M
Perseguir (R)	H persigue al M
Empujar-Morder (R)	H llama la atención del M empujándolo o tocándolo con el hocico o mordiendo gentilmente su cuello.
Grupa (R)	H expone su zona posterior ante la presencia del M, generalmente esta conducta esta precedida por un llamado de atención de la H al M
H monta M (R)	H monta al M
H levanta cola (R)	H levanta cola exponiendo el área genital cuando el macho inspecciona su zona posterior
M olfatea zona posterior	M olfatea la zona posterior de H
Intento de monta (A)	M intenta montar a H pero lo hace de forma parcial y la hembra lo evade rápidamente.
Monta	M monta a la H en una posición que permite la copula
Copula	

Abreviaturas: H: Hembra, M: Macho

**Análisis de los datos.** Como medida de receptividad de la hembra se empleo la suma de los comportamientos: ‘Perseguir’, ‘Empujar- morder’, ‘Grupa’, ‘H monta M’ y ‘Levanta cola’. Aunque se registró el olfateo de hembras hacia machos y viceversa, estos comportamientos no fueron considerados en la caracterización de las conductas receptivas dado que eran realizados con alta frecuencia tanto en contextos reproductivos como territoriales. De acuerdo a la ocurrencia total de estos comportamientos receptivos y la ocurrencia de cópula durante los encuentros, se clasificó a las hembras en tres categorías que reflejaron un grado decreciente de receptividad: Cópula (C, n=6), Receptivas (R, n=7) y No receptivas (NR, n=7). El criterio utilizado en la diferenciación de las hembras receptivas de las no receptivas incluyó dos condiciones: que se verificara la ocurrencia de al menos tres comportamientos receptivos y que mostrara una frecuencia total de comportamientos receptivos mayores a 15 (Tabla 4.2). Dada esta categorización, se investigó si las hembras pertenecientes a cada grupo diferían en sus niveles hormonales (progesterona, estrógeno) así como en la composición del epitelio vaginal (Índice de Cornificación y porcentaje de células epiteliales, ver Cap. I) previos a la interacción con el macho, mediante análisis de la varianza paramétrico (ANOVA) o no paramétrico (Kruskal-Wallis) de acuerdo a si los datos cumplían los supuestos de homocedasticidad y normalidad (Zar 1996). Posteriormente, se investigó el efecto de la interacción con el macho dentro de estos grupos. Para ello, se calcularon las variaciones en los niveles hormonales y la composición del epitelio en las muestras tomadas antes y después de la interacción (después –

antes). Finalmente, se evaluó la relación existente entre los niveles hormonales y la caracterización epitelial mediante correlación de Pearson para los diferentes tiempos (Zar 1996).

## RESULTADOS

Los comportamientos de receptividad mostrados fueron diversos, hallándose una gran variabilidad entre las hembras en cuanto al comportamiento desplegado para acercarse y/o incitar la atención del macho (Tabla 4.2). En el comienzo de la interacción, los encuentros se caracterizaron por el despliegue de comportamientos agonísticos y de evitación, los cuales se atenuaron paulatinamente, seguidos por una fase de reconocimiento. Durante ésta los individuos olfatearon a su pareja, inicialmente a distancia y luego se acercaron gradualmente. Luego del reconocimiento, tanto el macho como la hembra presentaron comportamientos claros de receptividad (hembras) o atracción (machos). La receptividad de la hembra se caracterizó por el acercamiento activo hacia el macho así como comportamientos de solicitud de cortejo: empuja o muerde suavemente al macho, la hembra monta al macho, expone su zona posterior o grupa, y finalmente en esta posición o ante la presencia del macho, la hembra frecuentemente levanta la cola exponiendo el área genital. En menor frecuencia, las hembras desplegaron la exposición del cuello y apoyaron su zona posterior al macho. En reiteradas oportunidades, las hembras marcaron los túneles frotando su zona anogenital, sin embargo la intención receptiva no es clara, pudiendo tratarse de un comportamiento territorial. Las hembras que no mostraron interés por el macho (no receptivas) superaron la fase del reconocimiento, para luego permanecer pasivas y esquivas en relación al macho. La atracción del macho por la hembra se manifestó predominantemente por la frecuencia de intentos de monta hacia la hembra. Entre las hembras que no copularon (receptivas y no receptivas), la frecuencia de receptividad y atracción total se encontró directamente relacionada a la atracción del macho por la hembra, dada por los intentos de monta ( $r = 0.915$ ,  $n = 14$ ,  $p < 0.00001$ ).

Los niveles de progesterona así como de estrógeno en orina no mostraron relación con el índice de cornificación y el porcentaje de células epiteliales correspondientes al mismo día. Sin embargo, se detectaron correlaciones positivas entre los niveles de ambas hormonas posteriores a la interacción (“Después”) y el porcentaje de células epiteliales registradas al día siguiente (“24 hs después”). Las variaciones en los niveles de progesterona y estrógeno cuantificados con anterioridad y posterioridad al encuentro (‘Después’- ‘Antes’) mostraron relación significativa con el porcentaje de células epiteliales registradas al día siguiente del encuentro. Del mismo

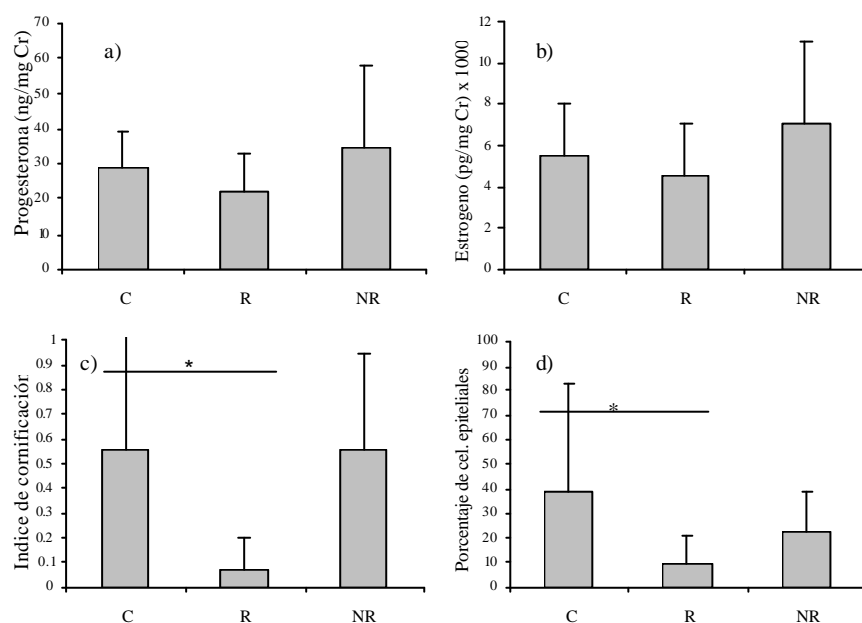
modo, la variación de la progesterona ('Después'- 'Antes') mostró una relación significativa con el índice de cornificación y el porcentaje de células epiteliales correspondientes al período posterior al encuentro (Tabla 4.3).

El estado reproductivo de las hembras previo al encuentro con el macho se relacionó con el comportamiento reproductivo mostrado (Cópula, Receptiva y No receptiva) en cuanto a su citología vaginal pero no así para las concentraciones hormonales en orina. Tanto los niveles de progesterona como de estrógeno no mostraron diferencias en relación al comportamiento subsiguiente de la hembra (Fig 4.2a y b, ANOVA,  $F = 5.730$ ,  $gl = 2$ ,  $p = 0.537$ ; Kruskal-Wallis,  $H = 1.770$ ,  $gl = 2$ ,  $p = 0.413$ , respectivamente). Sin embargo, las hembras mostraron diferencias en el índice de cornificación previos al encuentro (Fig 4.c, Kruskal-Wallis,  $H = 6.095$ ,  $gl = 2$ ,  $p = 0.047$ ), particularmente entre las hembras que copularon en relación a aquellas receptivas (Prueba *a posteriori* de Dunn  $p < 0.05$ ). Del mismo modo, el porcentaje de células epiteliales varió entre los grupos (Fig 4.2d, ANOVA,  $F = 4.994$ ,  $gl = 2$ ,  $p = 0.02$ ). Las hembras que copularon mostraron diferencias significativas con aquellas que se mostraron receptivas (Tukey  $q = 4.34$ ,  $p = 0.018$ ) pero no se hallaron diferencias para aquellas hembras que copularon en relación a las que no se mostraron receptivas al macho ( $q = 3.219$ ,  $p = 0.08$ ), ni entre las categorías R y NR ( $q = 1.174$ ,  $p = 0.69$ ).

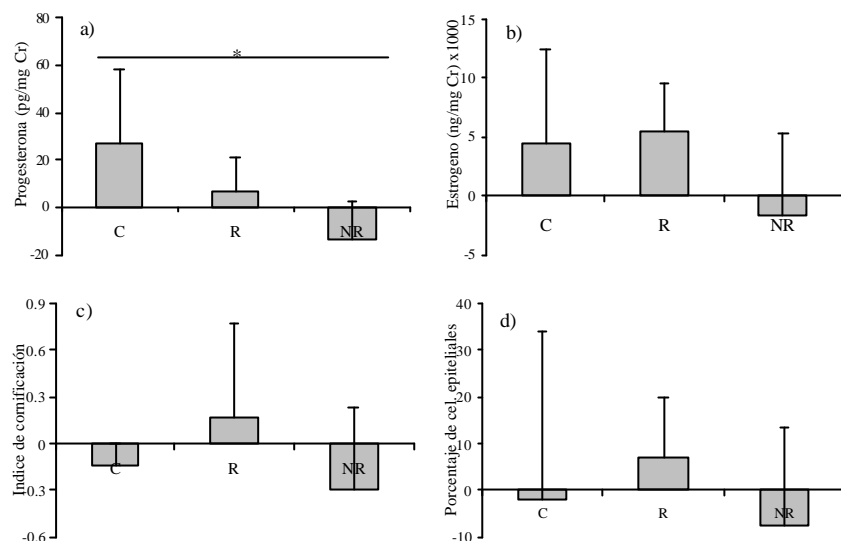
Tal como se observa en la Fig. 4.3, luego de la interacción con el macho las hembras mostraron variaciones, tanto disminuciones como incrementos, en sus niveles hormonales y en menos grado en la composición del epitelio vaginal. Las variaciones en los niveles de progesterona difirieron entre los grupos (ANOVA,  $F = 5.730$ ,  $gl = 2$ ,  $p = 0.013$ ). Las hembras que copularon presentaron un incremento en el nivel de progesterona, del mismo modo aunque en menor proporción, lo hicieron las hembras receptivas, mientras que en aquellas no receptivas el nivel de progesterona disminuyó (Fig. 4.3 a). Sin embargo, las diferencias sólo fueron detectadas para los casos extremos (C vs NP: Comparaciones Múltiples de Tukey,  $q = 4.78$ ,  $p = 0.01$ ; C vs R  $q = 2.355$ ,  $p = 0.247$ ; R vs NR  $q = 2.525$ ,  $p = 0.204$ ). Las concentraciones de estrógeno también variaron aunque las diferencias fueron marginalmente significativas (Kruskal-Wallis,  $H = 5.553$ ,  $gl = 2$ ,  $p = 0.062$ ). Tanto las hembras que copularon como aquellas que sólo se mostraron receptivas hacia el macho, incrementaron sus niveles de estrógenos, aunque el de estas últimas fue levemente mayor. Por otro lado, en las hembras NR se produjo una disminución de la concentración de estrógenos (Fig. 4.3 b). La variación del índice de cornificación así como el porcentaje de células epiteliales fue similar: las hembras R mostraron un leve incremento

mientras que aquellas que copularon y fueron no receptivas disminuyeron (Fig. 4.3 c y d). En ningún caso se observaron diferencias significativas entre los grupos (ANOVA, IC:  $F=$ ,  $gl= 2$ ,  $p= 0.225$ ; células epiteliales:  $F = 0.628$ ,  $gl = 2$ ,  $p = 0.545$ ).

Como resultado del análisis cualitativo de la histología ovárica (Tabla 4.4), se observó que la mayor parte de las hembras presentaron folículos primarios y secundarios. Los folículos terciarios se encontraron en 5/ 6 y 3/ 4 hembras R y C, respectivamente. En las hembras NR, sólo se encontraron folículos terciarios en 4/ 7 casos. Los cuerpos lúteos se hallaron exclusivamente en hembras que copularon. Por otro lado, la presencia de folículos terciarios luteinizados (LUF) fue más destacada en hembras no receptivas, aunque se presentaron también en las otras condiciones.



**Figura 4.2** – Promedios ( $\pm$  DE) previos a la interacción con el macho de niveles de progesterona (a), estrógeno (b), índice de cornificación (c) y porcentaje de células epiteliales (d) para hembras que mostraron diferentes grados de receptividad. \*  $p < 0.05$ .



**Figura 4.3** - Promedios (de) de las diferencias entre los registros posteriores y previos al contacto con el macho de niveles de progesterona (a), estrógeno (b), índice de cornificación (c) y porcentaje de células epiteliales (d) para hembras que mostraron diferentes grados de receptividad.  
\* p<0.05

**Tabla 4.2-** Variación individual en los comportamientos presentados por las hembras de *C. talarum* durante el encuentro con el macho.

Hembra #		3j	8j	9j	17	1	6	15	3	7	16	b	11	10	12	9	5	14	8	13	2	4		
Grado de receptividad		C	C	C	C	C	C	C	R	R	R	R	R	R	R	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	
Comportamiento	Olfatea Zona posterior	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?		?	?	?	?	?	?	
	Persigue	?		?	?	?			?	?		?		?										
	Empujar - Morder	?	?	?	?	?		?	?	?	?	?	?	?	?		?		?	?	?	?	?	
	Grupa	?	?	?	?	?		?	?	?	?	?	?	?	?		?	?			?		?	
	H monta M	?		?	?	?		?	?	?	?	?	?	?	?									
	Levanta cola	?	?		?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?		?							?
Frecuencia promedio (rango)						33 (83-8)				41 (85-17)				7.4 (15-0)										

**Tabla 4.3-** Matriz de correlación describiendo las relaciones entre progesterona y estrógeno urinario y las características del epitelio para los diferentes tiempos en relación al encuentro con el macho. Para cada nivel se reportan: Índice de correlación de Pearson (arriba; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ), y número muestral (abajo). § Diferencia entre 'Después' - 'Antes'

		Índice de cornificación			Porcentaje de Cél. epiteliales		
		Antes	Después	24 h. después	Antes	Después	24 h. después
<b>Progesterona</b>	<i>Antes</i>	0.048	-0.430	-0.289	-0.033	-0.217	-0.0155
		20	19	17	20	19	18
	<i>Después</i>		-0.0515	-0.051		0.374	<b>0.527 *</b>
			17	17		19	18
	<i>Diferencia §</i>		<b>0.556 *</b>	0.130		<b>0.532 *</b>	<b>0.698 **</b>
			19	17		19	18
<b>Estrógeno</b>	<i>Antes</i>	0.197	-0.367	-0.344	-0.186	-0.140	-0.289
		20	19	17	20	19	18
	<i>Después</i>		0.0805	-0.359		0.05	<b>0.551 **</b>
			19	17		19	18
	<i>Diferencia §</i>		0.258	-0.156		0.123	<b>0.679 ***</b>
			19	17		19	18

**Tabla 4.4-**

Resultado del análisis histológico cualitativo, mostrando la presencia o ausencia de diferentes estadios de desarrollo folicular en hembras de *Ctenomys talarum* y cuando ocurrió la ovulación (presencia de cuerpos lúteos).  
+ presentes; - ausente.  
\* folículos luteinizados (LUF)

Hembra		Folículos Primarios	Folículos secundarios	Folículos terciarios	Cuerpos lúteos
<b>14</b>	<b>NR</b>	+	+	+*	-
<b>2</b>	<b>NR</b>	-	+	+*	-
<b>13</b>	<b>NR</b>	-	+	-	-
<b>4</b>	<b>NR</b>	+	+	-	-
<b>5</b>	<b>NR</b>	+	+	+*	-
<b>8</b>	<b>NR</b>	+	+	-	-
<b>9</b>	<b>NR</b>	+	+	+*	-
<b>7</b>	<b>R</b>	+	+	+*	-
<b>10</b>	<b>R</b>	+	+	+	-
<b>11</b>	<b>R</b>	+	-	+	-
<b>12</b>	<b>R</b>	+	+	-	-
<b>3</b>	<b>R</b>	+	+	+*	-
<b>16</b>	<b>R</b>	-	+	+	-
<b>15</b>	<b>C</b>	+	+	-	+
<b>6</b>	<b>C</b>	-	+	+*	-
<b>17</b>	<b>C</b>	+	+	+	+
<b>1</b>	<b>C</b>	+	+	+	+

## DISCUSIÓN

Si bien el comportamiento reproductivo ha sido reportado en varias especies de roedores subterráneos (ver Bennett *et al.* 2000) la identificación de comportamientos particulares que señalan la atracción y receptividad de las hembras no se conoce hasta el presente. Este trabajo analiza el comportamiento de receptividad de las hembras en relación a la condición hormonal y la composición de la citología vaginal, evaluando además los cambios que se verifican en su estado fisiológico a partir de la cópula y el contacto físico con el macho. Las hembras receptivas y las que copularon en este estudio mostraron un amplio espectro de comportamientos de receptividad, manifestados en frecuencias similares para ambas categorías. La agresividad constituye un componente clave en la interacción, hasta que se logra un acercamiento entre los miembros de la pareja y se inicia el reconocimiento. El empleo del tacto durante el cortejo y el apareamiento ha sido sugerido para otros *Ctenomyidos* (Altuna *et al.* 1991, Camín 1999) así como en otros grupos de roedores subterráneos (ver Bennett *et al.* 2000). La utilización del canal químico durante el cortejo resulta esperable en cuanto a la información que estas señales portan respecto de la condición reproductiva de los organismos (Heth *et al.* 1996, Zenuto *et al.* 2004). Nevo (1969) propone que un despliegue elaborado de comportamientos reproductivos es requisito en organismos altamente territoriales como *S. ehrenbergi* a fines de lograr disminuir la agresión y comunicar las intenciones reproductivas de los miembros de una pareja.

La citología vaginal ha sido empleada para caracterizar la receptividad reproductiva en distintas especies de ovuladores espontáneos e inducidos. La relación entre los cambios en el epitelio vaginal y en los niveles de progesterona y estrógeno ha sido documentada para distintas especies (Hikim *et al.* 1991). Un incremento en los niveles plasmáticos de estrógeno produce cambios en la morfología del epitelio vaginal en distintas especies de ovuladores inducidos (Shille *et al.* 1979, Ryan 1984). Los metabolitos de hormonas esteroides excretadas en la orina se corresponden con precisión a los niveles hormonales plasmáticos (Schideler *et al.* 2005), de esta forma se espera que los cambios en los esteroides urinarios se encuentren correlacionadas a la citología vaginal. Sin embargo, esta correspondencia puede verificarse con cierto grado de retraso temporal. Para la especie de ovulación inducida *Mustela nigripes*, la correlaciones de los esteroides fecales y el porcentaje de cornificación para el mismo día fue baja en relación a aquellas donde se emplearon los valores hormonales del día anterior, y más aún cuando se empleó el promedio de varios días anteriores (Young *et al.* 2001). Estos autores sugirieron que el incremento en la cornificación es un efecto hormonal acumulativo más que basado en los valores

absolutos diarios (Young *et al.* 2001). En *C. talarum*, las correlaciones entre ambos parámetros no fueron significativas para el mismo día, mientras que aquellas basadas en la tendencia (incremento o disminución) de la concentración de estrógeno y progesterona sí lo fueron. Este hallazgo sugiere un efecto de las variaciones en las concentraciones de hormonas, más que de la cantidad absoluta y puntual, como responsable de la variación en la composición del epitelio vaginal. De esta manera, el epitelio vaginal es el reflejo de una tendencia hormonal y no de niveles puntuales. Además, las hormonas afectaron principalmente los porcentajes de células epiteliales y en menor grado los índices de cornificación, consistentemente con lo encontrado previamente cuando se evaluó el efecto del fotoperíodo (Cap. II). Aunque la citología vaginal emplea mayormente la cornificación como indicadora del período fértil-receptivo, en especies tales como *Microtus agrestis* se ha encontrado que las hembras con epitelios vaginales compuestos mayormente por células nucleadas son receptivas a la cópula (Breed 1967). De esta forma, la citología vaginal en *C. talarum* representa un componente de utilidad en la evaluación del estado reproductivo de las hembras, aunque no es el único factor a tener en cuenta para la predicción del resultado de un encuentro reproductivo.

Los roedores que presentan ovulación espontánea experimentan cambios cíclicos en el epitelio vaginal que reflejan certeramente la actividad endocrina de los ovarios (Nalbandov 1976 en Sawrey y Dewsbury 1985). Estas fluctuaciones se hallan correlacionadas a la ovulación y a la receptividad comportamental. El caso de los roedores de ovulación inducida, es evidentemente diferente. Existirían sin embargo, cambios periódicos en el epitelio vaginal indicadores de la receptividad comportamental. Alternativamente, el estímulo del macho podría producir los cambios endócrinos necesarios que resultarían en cambios en la citología vaginal y receptividad comportamental (Sawrey y Dewsbury 1985). Aunque la mayor parte de los roedores subterráneos presentan ovulación inducida (Bennett *et al.* 2000) la relación entre la receptividad comportamental y el estado fisiológico en la hembra ha sido escasamente explorado. Los diferentes grados de receptividad presentados por las hembras de *C. talarum* se mostraron relacionados con el porcentaje de células epiteliales y el índice de cornificación, pero no con los niveles hormonales. Como se menciono antes, esto probablemente se debe a que tanto el estro vaginal como comportamental estarían relacionados con el historial hormonal y las tendencias en sus concentraciones pero no así con los niveles puntuales y absolutos. Para *S. ehrenbergi*, el grado de cornificación señala el período reproductivo de la misma (Shanas *et al.* 1995). El mismo estudio señala que aunque todas las hembras que copularon poseen un epitelio vaginal

con células cornificadas solo en el 11% de las hembras con alta proporción de cornificación ocurrió cópula, mostrando que la presencia de cornificación es un criterio insuficiente para determinar la receptividad para esta especie (Shanas *et al.* 1995). Por otro lado, el aumento en interacciones que presentan cópulas a partir de que se les permitió a las hembras la selección del macho en *C. talarum* (Cap. III) y en *S. ehrenbergi* (Shanas *et al.* 1995) indicaría que la selección de pareja juega un importante rol en estas especies de roedores subterráneos altamente agresivos y territoriales. En muchas especies, el acercamiento y los comportamientos receptividad de la hembra hacia un macho además de mostrar una variación con respecto a su estado reproductivo constituyen parte del comportamiento de selección de pareja (Tomihara 2005). Así, parte de la variabilidad comportamental observada durante los encuentros reproductivos podría atribuirse a las variaciones en el estado reproductivo de la hembra, pero también al ejercicio de selección de pareja, dadas las diferencias existentes en la calidad de los machos.

En las hembras que copularon, se observó un incremento significativo de la progesterona, debido a un incremento de su secreción por parte de los cuerpos lúteos. Estas últimas estructuras solo fueron halladas en hembras que copularon, de manera coincidente a lo previamente hallado por Weir (1974), pero no así en hembras que experimentaran contacto físico (R y NR). Los cuerpos lúteos son una confiable y clara evidencia de ovulación (Hinds y Smith 1992 en Malherbe *et al.* 2004). En especies con ovulación inducida, la estimulación vaginal copulatoria es de fundamental importancia en la inducción de cambios neuroendocrinos y comportamentales necesaria para alcanzar la ovulación, y por ende una reproducción exitosa (Sawyer 1966). No obstante, entre los ovuladores inducidos diferencias en la sensibilidad de su sistema de control neuroendocrino producen variaciones en cuanto al estímulo requerido en cada especie (Ramirez y Soufi 1994, ver Cap V). Muchos roedores subterráneos presentan ovulación inducida (Bennett *et al.* 2000). La inducción de la ovulación mediante el estímulo copulatorio ha sido observada en muchos roedores subterráneos solitarios como *S. ehrenbergi*, que Shanas *et al.* (1995) relacionan a su condición social. Sin embargo, en especies sociales donde la rigurosidad ambiental limita fuertemente la reproducción, la misma se encuentra ligada también a factores sociales. Para las hembras de *C. h. nataliensis* y de *C. h. prettoriae*, el contacto con olores del macho produce un incremento limitado de la actividad ovárica y de los niveles de progesterona, mientras que la cópula induce la respuesta ovulatoria, dada por la presencia de cuerpos lúteos y un conspicuo incremento de los niveles de progesterona (Malherbe *et al.* 2004, Jackson y Bennett 2005). La inducción de la ovulación en respuesta a la cópula parece ser un sistema eficiente en asegurar la

fertilización, y entonces es sorprendente encontrar que la inducción de la ovulación no ha sido adoptada para todas las especies de mamíferos de forma de evitar la pérdida de gametas en caso de ovulación y no concepción (Ramirez y Soufi 1994). En términos de eficiencia reproductiva, Zarrow y Clack (1968) sugirieron que la ovulación inducida es particularmente eficiente en especies no gregarias y que presentan bajas densidades, donde la probabilidad de encontrar parejas es baja. Sin embargo, esta idea sería válida si los ovuladores reflejos estuvieran en un continuo estado de estro. Esta situación no ocurre en la mayor parte de los ovuladores inducidos (Ramirez y Soufi 1994) y tampoco es el caso de *C. talarum*.

Los niveles de estrógenos posteriores a la interacción mostraron un incremento, tanto en hembras que copularon como en aquellas receptivas, pero no en aquellas no receptivas. Esto, junto con la presencia de folículos luteinizados en los ovarios de las hembras NR, señalarían que se encontrarían en un estado probablemente no reversible a corto plazo. Willingstorfer *et al.* (1998) propusieron que la falta de ovulación en las hembras no reproductivas de *C. damarensis* podía ser interpretada tanto como evidencia de la supresión de la reproducción en un ovulador espontáneo o como la falta de estímulo copulatorio en especies de ovulación inducida. En el caso de hembras que copularon y ovularon (presentaron CL) se observó además un incremento de estrógeno, probablemente producto del desarrollo folicular. Este fenómeno ha sido observado previamente en musarañas (*Suncus murinus*) especie con ovulación inducida, donde la cópula que induce la ovulación también estimula los ovarios al desarrollo folicular e incremento de la secreción de estrógeno (Fortune *et al.* 1992). La función del incremento del estrógeno luego de la ovulación es desconocida, aunque podría estar relacionada con la preparación del tracto genital para la preñez (Fortune *et al.* 1992). Sin embargo, en otras especies de ovuladores inducidos los niveles de estrógeno disminuyen luego de la ovulación (Hilliard *et al.* 1971, Schille *et al.* 1983, Villars *et al.* 1990). Finalmente el incremento del estrógeno en las hembras receptivas estaría dado por un incremento de su producción por los folículos en desarrollo. Un incremento en el tamaño y desarrollo folicular fue observado en otras especies de roedores subterráneos de ovulación inducida donde se colocó a machos y hembras a través de una malla metálica (Malherbe *et al.* 2004, Jackson y Bennett 2005). La existencia de folículos terciarios luteinizados en los ovarios de *C. talarum*, respondería a su condición de hystricomorfo, ya que esta parece ser una característica del grupo (Weir y Rowlands 1974). Los mismos han sido reportados en representantes de otros géneros pertenecientes al mismo grupo, como *Georychus*, *Bathyergus* y *Cryptomys* aunque su función no es clara; si bien se postula que contribuirían en la producción

de progesterona necesaria para soportar las gestaciones extensas que los caracterizan, en muchos casos se los ha encontrado con predominancia en individuos no reproductivos (Willingstorfer *et al.* 1998, Spinks *et al.* 1999).

En resumen, las hembras de *C. talarum* no presentan un estado continuo de receptividad comportamental y fisiológica durante la estación reproductiva como fue propuesto para ovuladores inducidos (Zarrow y Clark 1968). La manifestación de diferentes grados de receptividad podría ser el resultado del estado fisiológico de la hembra así como del ejercicio de selección de pareja. La atracción de los machos se halló fuertemente relacionada a la receptividad de la hembra, sugiriendo que las señales conductuales y no conductuales (olor) son suficientes para que el macho detecte el estado de la hembra. El efecto del macho varía de acuerdo al tipo de contacto (con o sin cópula) así como el estado reproductivo de la hembra. Para las hembras de tuco tuco, la ovulación requiere del estímulo copulatorio.

**BIBLIOGRAFÍA**

- ADLER, NT. 1978. Social and environmental control of reproductive processes in animals. En: Sex and Behavior: Status and Prospectus. (McGill, T, D Dewsbury y B Sachs, Eds.). Plenum: New York.
- ALTUNA, CA, FRANCESCOLO, G Y G IZQUIERDO. 1991. Copulatory pattern of *Ctenomys pearsoni* (Rodentia, Octodontidae) from Balneario Solís, Uruguay. *Mammalia* 55: 316-318.
- BEACH, FA. 1976. Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammal. *Horm Behav* 7:105-138.
- BENNETT, NC, CG FAULKES YAJ MOLTENO. 2000. Reproduction in subterranean rodents. En: Life underground. The biology of subterranean rodents (Lacey, EA, JL Patton y GN Cameron, Eds.). The University Chicago Press, Chicago, USA Breed 1967
- BRONSON, FH. 1989. Mammalian reproductive biology. The University of Chicago Press, Chicago, USA.
- CAMÍN, S. 1999. Mating behaviour of *Ctenomys mendocinus* (Rodentia, Ctenomyidae). *Z Säugetierk* 64 230–238.
- COHEN-PARSONS M, Y CS CARTER. 1988 Males increase progesterin receptor binding in brain of female voles. *Physiol Behav* 42:191–197
- DOTY, RL. 1986. Odor-guided behavior in mammals. *Experientia* 42: 257-271.
- DROZDZ, A. 1975. Feeding and nutrition. Metabolic cages for small rodents. En: Methods for Ecological Bionergetic. IBP Handbook. Vol 24. (. Grodzinski, W, RZ. Klekowski y A Duncan, Eds). Oxford. Blackwell Scientific Publications.
- DRURY, RAB, Y EA WALLINGTON. 1967. Carleton's Histological Technique. Cuarta edición. Oxford University Press.
- EISEMBERG, JF Y DG KLEIMAN. 1972. Olfactory communication in mammals. *Ann Rev Ecol System* 3:1-32.
- FAULKES, CG, DH ABBOTT Y JUM JARVIS. 1990. Social suppression of ovarian cyclicity in captive and wild colonies of naked mole-rats, *Heterocephalus glaber*. *J Reprod Fertil* 88:559–568.
- FERKIN, MH, DN LEE, Y ST LEONARD. 2004. The reproductive state of female voles affects their scent marking behavior and the responses of male conspecifics to such marks. *Ethology* 110:257-272.
- FERKIN, MH, Y RE JOHNSTON. 1995. Effects of pregnancy, lactation, and postpartum oestrus on odour signals and the attraction to odours in female meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*. *Anim Behav* 49:1211–1217.
- FORTUNE, JE, JJ EPPIG Y EF RISSMAN. 1992. Mating stimulates production by ovaries of the musk shrew (*Suncus murinus*). *Biol Reprod* 46:885-891.
- HETH, G, E NEVO, Y J TODRANK. 1996. Seasonal changes in urinary odors and in responses to them by blind subterranean mole rats. *Physiol Behav* 60:963–968.
- HIKIM, APS, A WOOLF, A BARTKE Y AG AMADOR. 1991. The estrus cycle of captive woodchucks (*Marmota monax*). *Biol Reprod* 44:733–738.
- HILLIARD, J, Y LW EATON JR. 1971. Estradiol-17 beta, progesterone and 20-alpha-hydroxypregn-4-en-3-one in rabbit ovarian venous plasma. II. From mating through implantation. *Endocrinology* 89(2):522-7.
- HINDS, LA, Y MJ SMITH. 1992. Evidence from plasma progesterone concentrations for male-induced ovulation in the brush-tailed bettong, *Bettongia penicillata* *J Reprod Fertil* 95:291–302.
- JACKSON, CR, Y NC BENNETT. 2005, Is the Natal mole-rat (*Cryptomys hottentotus natalensis*) a spontaneous or induced ovulator?: *J Mamm* 86:1–6.
- JOHNSTON, RE. 1979. Olfactory preferences, scent marking, and “proceptivity” in female hamsters. *Horm Behav* 13:21–39.
- JOHNSTON, RE. 1980. Responses of male hamsters to odors of females in different reproductive states. *J Comp Physiol Psychol* 94:894–904.
- MALHERBE, GP, NCBENNETT, Y AS SCHOEMAN. 2004. Is the highveld mole-rat *Cryptomys hottentotus pretoriae* (Rodentia: Bathyergidae) an induced or spontaneous ovulator?. *J Zool, Lond* 263:159-165.
- MILLIGAN, SR 1982. Induced ovulation in mammals. Oxford reviews of reproductive biology (CA Finn, Ed): Clarendon Press, Oxford, United Kingdom

- NALBANDOV, AV. 1976. Reproductive physiology of mammals and birds. WH Freeman and company, San Francisco.
- NEVO, E. 1969. Mole Rat *Spalax ehrenbergi*: Mating Behavior and its Evolutionary Significance. *Science* 163: 484-486.
- RAMIREZ, VD Y WL SOUFI. 1994. Neuroendocrine control of the rabbit ovarian cycle. En: The Physiology of Reproduction, Vol 2. (E. Knobil y JD Neill, Eds.). Academic Press, New York.
- RYAN, KD. 1984. Hormonal correlates of photoperiod-induced puberty in a reflex ovulator, the female ferret (*Mustela furo*). *Biol Reprod* 31: 925-935.
- SAWREY, DK, Y DA DEWSBURY. 1985. Control of ovulation, vaginal estrus and behavioral receptivity in voles (*Microtus*). *Neurosci Biobehav Rev* 9: 563-571.
- SAWYER, CH. 1966. Neural mechanisms in the steroid feedback regulation of sexual behavior and pituitary-gonad function. En: Brain and behavior, III: The brain and gonadal functions. (Gorski, RA y RE Whalen, Eds.), University of California Press, Berkeley.
- SCHIDELER, SE, CJ MUNRO, L TELL, G OWITTI, L LAUGHLIN, R CHARLETON JR. Y BL LASLEY. 2005. The relationship of serum estradiol and progesterone concentrations to the enzyme, immunoassay measurements of urinary estrone conjugates and immunoreactive pregnanediol-3-glucuronide in *Macaca mulatta*. *Am J Prim* 22(2):113-122.
- SCHILLE VM, C MUNRO, SW FARMER, H PAKKOFF Y GH STABENFELT. 1983. Ovarian and endocrine responses in the cat after coitus *J Reprod Fertil* 1978 18:193-197.
- SHANAS, U, G HETH, E NEVO, R SHALGI Y J TERKEL. 1995. Reproductive behaviour in the female blind mole rat (*Spalax ehrenbergi*). *J Zool, Lond* 137: 195- 210
- SHILLE, VM, EK LUNDSTROM, Y GH STABENFELDT. 1979. Follicular Function in the domestic cat as determined by estradiol-17 $\beta$  concentrations in plasma: relation to estrous behavior and cornification of exfoliated vaginal epithelium. *Biol Reprod* 21:953-963
- SPINKS, AC, NC BENNETT Y JUM JARVIS. 2000. Regulation of reproduction in female common mole-rats (*Cryptomys hottentotus hottentotus*): the effects of breeding season and reproductive status. *J Zool* 248: 161-168
- TANG - MARTINEZ, Z, LL MUELLER, Y GT TAYLOR. 1993. Individual odours and mating success in the golden hamster *Mesocricetus auratus*. *Anim Behav* 45: 1141-1151.
- TOMIHARA, Z. 2005. Selective approach to male and subsequent receptivity to mounting comprise mate-choice behavior of female mice. *J Psychol Res* 47(1):22-30.
- VILLARS, TA, MS ERSKINE, GM LAMBERT, D JACOBSON, CE WEAVER Y MJ BAUM. 1990. Endocrine correlates of mating-induced reductions in estrous behaviour in an induced ovulator, the ferret. *Horm Behav* 24(2):198-214.
- WEIR, BJ. 1974. Reproductive characteristic of hystricomorph rodents. *Symp Zool Soc Lond* 34:265-301.
- WEIR, BJ, Y IW ROWLANDS. 1974, Functional anatomy of the hystricomorph ovary: *Symp Zool Soc Lond* 34:303-332.
- WILLINGSTORFER, W, H BURDA, J WINCKLER. 1998. Ovarian growth and folliculogenesis in breeding and non-breeding females of a. social rodent, the Zambian common mole-rat, *Cryptomys* sp. *J. Morphol.* 237: 33-41
- YOUNG, KM, JL BROWN Y KL GOODROWE. 2001. Characterization of reproductive cycles and adrenal activity in the black-footed ferret (*Mustela nigripes*) by fecal hormone analysis. *Zoo Biol* 20:517-536.
- ZAR, JH. 1996. Biostatistical analysis. Tercera edición. Prentice Hall, New Jersey.
- ZARROW, MX Y JH CLARK. 1968. Ovulation following vaginal stimulation in a spontaneous ovulator and its implications. *J Endocrinol* 40: 343- 352.
- ZENUTO, RR, AI VASSALLO Y C BUSCH. 2001. A method to study social and reproductive behaviour of subterranean rodents in captivity. *Acta Theriol* 46:161- 170.
- ZENUTO, RR, VASALLO A Y C BUSCH. 2002. Comportamiento social y reproductivo del roedor subterráneo solitario *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae) en condiciones de semicautiverio. *Rev Chil Hist Nat* 75: 165-177
- ZENUTO, RR, MS FANJUL Y C BUSCH. 2004. Subterranean rodent *Ctenomys talarum* (tuco-tuco) use chemical communication during breeding season. *J Chem Ecol* 30: 2111-2126.

## CAPÍTULO V

### **PATRÓN COPULATORIO E INDUCCIÓN DE LA OVULACIÓN**



## INTRODUCCIÓN

El cortejo y la cópula pueden ser vistos como una tarea cooperativa entre ambos sexos bajo el objetivo principal de propagar sus genes. Sin embargo, existen conflictos de intereses ya que cada sexo maximiza su fitness individual, dadas las diferencias en la inversión reproductiva que realiza (Trivers 1972, Krebs y Davis 1993). Tanto el comportamiento de cortejo, como el copulatorio, se espera que presenten escasa variabilidad a nivel intraespecífico a la vez que una alta variabilidad interespecífica, ya que el reconocimiento asociado a la pertenencia a la misma especie resulta fundamental al momento de obtener una reproducción exitosa. Más allá de la identificación específica, el comportamiento asociado al apareamiento presenta otros componentes asociados a la competencia intraespecífica entre machos, así como al ejercicio de la evaluación que las hembras realizan sobre sus potenciales parejas (Krebs y Davis 1993).

Si bien la función última de la cópula es la transferencia de espermatozoides del macho a la hembra, el despliegue, duración y frecuencia de comportamientos asociados a este proceso son determinantes para ambos sexos para lograr una preñez exitosa (Dewsbury 1972). Así, para el macho, la repetición de penetraciones proporciona el estímulo necesario para la eyaculación, afectando además el número de penetraciones, la cantidad de espermatozoides eyaculados (Adler y Bermant 1966, Toner y Adler 1986, Stockley 1997). Las penetraciones facilitan además el transporte de espermatozoides en el útero y cumplen un rol fundamental al remover tapones copulatorios, en especial en especies promiscuas (Dewsbury 1981, Stockley y Preston 2004). En las hembras, la cópula en sí misma, con o sin transferencia de semen, estimula la actividad neuroendocrina. En especies de roedores que presentan ovulación espontánea, la cópula modula la secreción de diversas hormonas sexuales, tales como la luteinizante, folículo estimulante, luteotrófica y progesterona hasta el nivel de lograr pseudopreñez e inducir la secreción de leche (Dilley y Adler 1968, Dewsbury 1972, Lombardi 1988). Entre los roedores que presentan ovulación inducida, algunas especies sólo requieren la presencia (visual, táctil, química y/o auditiva) del macho para que ocurra la ovulación, mientras que los ovuladores inducidos estrictos requieren de la cópula para lograr la estimulación necesaria (Sawrey y Dewsbury 1985, Cohen-Parsons y Carter 1988, Ramirez y Soufi 1994). Si bien la probabilidad de que ocurra la ovulación depende de la cantidad total de estimulación copulatoria que reciba la hembra, en otros casos pequeñas cantidades resultan efectivas. Más aún, las series copulatorias que siguen a la ovulación son de importancia para la formación del

cuerpo lúteo y el mantenimiento la preñez (Sawrey y Dewsbury 1985). Por lo tanto, los diferentes parámetros del patrón copulatorio del macho son de gran significancia funcional en el éxito reproductivo de ambos sexos en los mamíferos, particularmente en aquellos que presentan ovulación inducida.

Basado en la relativa constancia de los patrones copulatorios en mamíferos a nivel específico, Dewsbury (1972) propuso un sistema de clasificación, que resulta una herramienta fundamental en los estudios comparativos y que permite además correlacionar el comportamiento reproductivo de los machos con condiciones ecológicas, características fisiológicas y morfológicas. La clasificación se basa en la presencia o ausencia de cuatro características principales del patrón copulatorio: a) enganche, b) movimientos pélvicos luego de la penetración, c) penetraciones múltiples hasta alcanzar la penetración eyaculatoria, y d) eyaculaciones múltiples. De acuerdo a las diferentes combinaciones de estas cuatro condiciones, resultan 16 posibles patrones copulatorios.

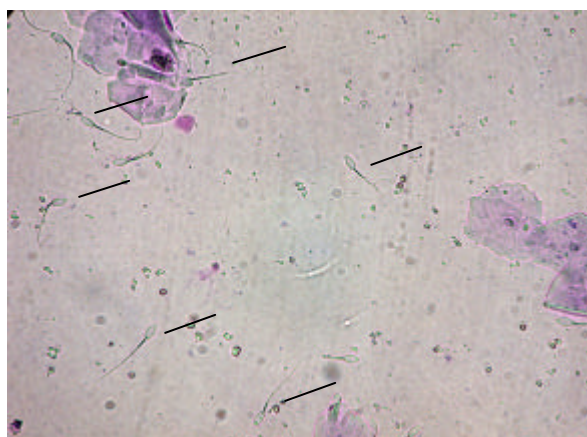
Los comportamientos copulatorios de numerosas especies de roedores subterráneos no relacionados taxonómicamente son muy similares. Muchas de las especies estudiadas muestran el patrón 9 (según Dewsbury 1972), caracterizado por carencia de enganche, movimientos pélvicos durante la penetración, penetraciones múltiples y eyaculaciones múltiples (Bennett *et al.* 2000). Dentro de este grupo, diferencias encontradas en algunos componentes del patrón copulatorio han sido atribuidas a factores como el grado de socialidad y la posibilidad de realizar las cópulas bajo resguardo en cámaras de apareamiento (Hickman 1982). Sin embargo, menor atención se ha focalizado en la relación entre los componentes del patrón copulatorio y la fisiología y comportamiento de las hembras.

El comportamiento de apareamiento ha sido descrito en varias especies de roedores pertenecientes al suborden de los histicomorfos (Kleiman 1974). Este grupo incluye especies que presentan una amplia diversidad en modos de vida (subterráneos, de superficie, acuáticos y arborícolas), organización social (solitarios, sociales) y ciclos de ovulación (espontánea, inducida). El género *Ctenomys*, perteneciente a este suborden, es sin lugar a dudas, el de mayor diversificación específica entre los roedores subterráneos (que incluye aproximadamente 60 especies, Woods 1993). Aún así, solo dos especies fueron descritas en relación a su patrón copulatorio, *C. pearsoni* (Altuna *et al.* 1991) y *C. mendocinus* (Camín 1999). Ambas son, al igual que *Ctenomys talarum*, organismos subterráneos y solitarios, y si bien se ha reportado solamente para esta última que presenta ovulación inducida (Weir 1974),

también se ha inferido este carácter para las otras dos especies (Altuna *et al.* 1991, Camín 1999). El presente capítulo tiene como objetivo: (1) describir cuantitativamente el patrón copulatorio de *Ctenomys talarum* (2) definir el mismo de acuerdo al criterio establecido por Dewsbury (1972) y (3) evaluar si los diferentes componentes del patrón copulatorio resultan consistentes con lo esperado para roedores con ovulación inducida.

## METODOLOGÍA

El análisis del patrón copulatorio que se provee en este capítulo corresponde a las experiencias de apareamiento resultantes en cópula (7/20 parejas; 7 hembras y 7 machos) que se tratan en el capítulo IV. En todos los casos, el registro en video se extendió hasta alcanzar el criterio de saciedad estándar (30 minutos sin penetración, Dewsbury 1975). La extensión de los encuentros fue en promedio de  $45.5 \pm 12.34$  minutos (rango 30-61). Al finalizar cada ensayo, se realizó un extendido vaginal de cada hembra a fin de detectar la transferencia exitosa de espermatozoides durante la/s cópulas. Estos extendidos fueron teñidos con Giemsa y posteriormente se verificó la presencia de espermatozoides (Fig. 5.1) bajo estereomicroscopio (100x). La ocurrencia de ovulación en las hembras fue confirmada mediante la presencia de cuerpos lúteos. Así, luego de cuatro días de la experiencia de apareamiento, cuatro hembras fueron sacrificadas por inhalación de cloroformo, sus ovarios fueron removidos inmediatamente y almacenados en formalina. Posteriormente, los dos ovarios de cada hembra fueron montados conjuntamente y sometidos a una técnica histológica estándar (Drury y Wallington 1967), seccionados en forma semiseriada ( $6 \mu\text{m}$  de espesor), teñidos con hematoxilina-eosina y observados bajo estereomicroscopio (100x).



**Figura 5.1.-** Fotomicrografía del epitelio vaginal conteniendo espermatozoides (flechas). x 450

La latencia, duración y frecuencia de las categorías comportamentales utilizadas en la caracterización cuantitativa del comportamiento copulatorio se muestran en la Tabla 5.1, las cuales fueron definidas siguiendo a Dewsbury (1972, 1975) y a observaciones previas en *C. talarum*. Para cada variable comportamental se calculó el promedio y el desvío estándar. Se analizaron además las frecuencias relativas de cada comportamiento de proceptividad manifestados por las hembras (ver Tabla 4.1) antes y después del primer período copulatorio (PC) los cuales fueron contrastados mediante una prueba de diferencia de medias para muestras apareadas (Zar 1996).

**Tabla 5.1-** Categorías comportamentales utilizadas en la caracterización cuantitativa del patrón copulatorio de *Ctenomys talarum*.

Variable	Definición
<b>Latencia a la monta</b>	Tiempo hasta la primera monta del encuentro.
<b>Latencia a la penetración</b>	Tiempo hasta la primera penetración del encuentro.
<b>Periodo copulatorio (PC)</b>	Periodo que comienza con la penetración y finaliza con el retiro del pene que precede a la desmonta.
<b>Movimiento pélvicos rápidos (MPR)</b>	Movimientos pélvicos que el macho realiza dentro de la vagina; registrándose su número, duración y frecuencia.
<b>Movimientos pélvicos profundos (MPP)</b>	Movimientos pélvicos que suceden a MPR, en los cuales el macho incrementa la profundidad y disminuye la frecuencia de los mismos. Generalmente son homologadas a penetraciones eyaculatorias. Registrándose su número, duración y frecuencia.
<b>Ciclos MPR/MPP</b>	Número de veces que ocurren las series de MPR/ MPP durante el periodo copulatorio.
<b>Periodos Inter-copulatorios (PIC)</b>	Periodos entre los periodos copulatorios.

## RESULTADOS

El cortejo comenzó con el despliegue de comportamientos agonísticos (como aprontes y muestra de dientes), continuando con comportamientos de reconocimiento mutuo mediante el olfateo de la zona genital o posterior. Además, ambos sexos olfatearon activamente las señales químicas (principalmente orina) dejadas por el otro miembro de la pareja en el piso del sistema experimental. Estos comportamientos fueron seguidos por mordisqueos mutuos en la zona del cuello, topetazos, y exposición del cuello. Tanto los machos como las hembras practicaron vocalizaciones de cortejo, particulares para cada sexo. Las intenciones de monta por parte del macho fueron muy frecuentes a lo largo del encuentro, detectándose un promedio de 44.7 (rango 17-85) intentos de monta, los cuales eran evadidos por la hembra.

Sin embargo, cuando el macho perdía interés momentáneamente, la hembra estimulaba la prosecución del cortejo profiriéndole empujones, mordisqueos o persiguiéndolo.

Durante una monta exitosa (o sea, que precede a la copula), el macho montó a la hembra desde su parte posterior, y rodeándola con sus patas delanteras, la mordió firmemente en la zona del cuello. Una vez alcanzada esta posición, los machos se afirmaron sobre las ancas de la hembra con sus patas traseras, sosteniéndola más firmemente aún en esta posición. Este proceso se extendió por un período de 1 a 11 segundos mientras la hembra manifestaba a su vez, comportamientos de evasión (Tabla 5.2). A partir de este momento comenzó el período copulatorio, registrado desde la primera penetración hasta el retiro final del pene que precede por unos segundos a la desmonta. Aunque esta posición es la más frecuente, se ha observado aisladamente la posición copulatoria ventral-ventral (2 observaciones de parejas no incluidas aquí).

El comportamiento de las parejas fue altamente variable en cuanto al tiempo en que transcurre hasta el inicio de la monta (latencia de monta) como hasta que se concreta la cópula (latencia de penetración). Asimismo, el número de períodos copulatorios observado fue variable (rango 1- 8), aunque predominaron los de dos o tres. Una vez alcanzada la penetración, el macho comenzó a realizar movimientos pélvicos rápidos (MPR) donde la profundidad de la penetración vaginal fue moderada y durante los cuales el pene fue retirado completamente de la vagina. Este tipo de movimientos pélvicos se observó en una frecuencia de 4 a 12 MP por segundo (Tabla 5.2). Cada uno de los movimientos pélvicos era realizado a su vez en un patrón de movimiento de tres tiempos. En el comienzo, la entrada del pene se realizó en un tiempo mientras que era retirado en dos tiempos. A medida que la cópula avanzaba, el patrón cambiaba, realizándose la penetración en 2 tiempos y la retirada del pene en uno. Luego, se verificaron los movimientos pélvicos profundos (MPP), caracterizados por alcanzar una mayor profundidad dentro de la vagina y con una duración de 1 a 2 segundos (Tabla 5.2). En algunos casos, la eyacuación durante los movimientos profundos fue clara, ya que se manifestaba como un breve período de inmovilidad, mientras que el macho se aferraba con firmeza al cuello de la hembra, y dirigía su cola hacia arriba. La finalización de los ciclos MPR/MPP así como la duración del PC estuvo condicionado por los movimientos de evasión de la hembra. Luego de la desmonta, el macho dedicaba varios segundos a acicalar su zona genital, reiniciando el cortejo y/o cópula, aunque esto se manifestó con mucha varianza entre las parejas observadas (Tabla 5.2). Notoriamente, la transferencia de esperma fue verificada a

través de la presencia de espermatozoides en los extendidos vaginales en todos los casos, con excepción de la pareja que realizó el mayor número de PC pero de escasa duración, sin verificarse movimientos pélvicos profundos. Aún así, la hembra logró la estimulación necesaria para lograr la ovulación, ya que fueron encontrados cuerpos lúteos, al igual que en otros dos casos donde se practicaron tres PC de mayor extensión y movimientos pélvicos profundos. El único caso donde no se verificó la presencia de cuerpos lúteos corresponde a una pareja que presentó un breve y único PC y ausencia de movimientos pélvicos profundos, aunque se detectó la presencia de espermatozoides.

El comportamiento de las hembras hacia los machos cambió notoriamente luego del primer PC, manifestándose más activa e insistentemente solicitando la atención del macho. Las hembras persiguieron más a los machos después del la primer cópula que durante el cortejo previo ( $t = -2,548$ , g.l.= 6,  $p = 0,044$ ). Sin embargo, el resto de los comportamientos (ver descripción Cáp. 4) analizados no mostró diferencias significativas: empujar ( $W = 13.000$ ,  $p = 0,219$ ), grupa ( $t = 1.126$ , g.l.= 6,  $p = 0,303$ ), hembra monta al macho ( $t = -1.611$ , g.l.= 6,  $p = 0,158$ ) y levanta cola ( $W = -14.000$ ,  $p = 0,297$ ).

Luego del último período copulatorio los machos acicalaron activamente su zona genital, manifestándose indiferentes a la hembra. Las hembras, por su parte, mostraron en algunos casos, comportamiento de incitación a proseguir el cortejo mientras que otras permanecieron descansando o acicalándose individualmente en contacto mutuo o solo en cercanía.

**Tabla 5.2.** Duración y frecuencias de los parámetros del patrón copulatorio de *C. talarum*. PC: periodo copulatorio, MP: movimientos pélvicos, PIC: periodo intercopulatorio. N/D: no determinado

Pareja	Latencia (s)		PC n°	Duración(s)	Ciclos MPR/MPP	Mov. Pélvicos Rápidos			Mov. Pelvicos Profundos			PIC (s)	Esperm.	Cuerpos Luteos	
	Monta	Penetración				Totales	Duración (s)	MP/s	Totales	Duración (s)	MP/s				
<b>1</b>	155	162	3	20	1	136	15	9,06	8	4	2	64	Presente	Si	
				96	2	211	23	9,17	20	17	1,17				
						38	9	4,22	37	22	1,68				345
				7	0	30	4	7,5	-	-	-				
<b>2</b>	165	167	2	63	1	214	21	10,19	24	14	1,71	1048	Presente	N/D	
				20	0	71	15	4,73	-	-	-				
<b>3</b>	528	538	3	9	1	60	7	8,57	4	3	1,33	64	Presente	Si	
				3	0	18	3	6	-	-	-				26
				46	1	100	14	7,14	4	4	1				
<b>4</b>	1080	1083	8	2	0	6	1	6	-	-	-	218	No se obs	Si	
				11	0	53	10	5,3	-	-	19				
				5	0	24	4	6	-	-	37				
				8	0	29	7	4,14	-	-	194				
				6	0	Nd	-	-	-	-	53				
				6	0	31	5	6,2	-	-	316				
				7	0	38	5	7,6	-	-	-				
<b>5</b>	1275	1276	1	10	0	38	6	6,33	-	-	-	-	Presente	No	
<b>6</b>	365	376	2	64	1	34	7	4,85	50	57	0,87	77	Presente	N/D	
				44	1	51	7	7,28	17	15	1,13				
<b>7</b>	1673	1681	2	46	N/D	N/D	-	-	N/D	-	-	65	Presente	N/D	
				55	N/D	N/D	-	-	N/D	-	-				
<b>Promedio</b>	<b>748,71</b>	<b>755,14</b>	<b>3</b>	<b>26,4</b>	<b>-</b>	<b>65,66</b>	<b>9,05</b>	<b>6,68</b>	<b>9,11</b>	<b>17</b>	<b>1,36</b>				
<b>DE</b>	<b>595,84</b>	<b>595,50</b>	<b>2,3</b>	<b>27,05</b>	<b>-</b>	<b>61,53</b>	<b>6,15</b>	<b>1,76</b>	<b>14,82</b>	<b>17,61</b>	<b>0,39</b>				

## DISCUSIÓN

El comportamiento de cortejo y cópula de *C. talarum* observado durante este estudio fue similar al reportado previamente, el cual fue realizado en condiciones seminaturales, utilizando sistemas de tubos de plástico que simulan en una forma simplificada las galerías que los tucos habitan (Zenuto *et al.* 2002). Esto confirma que el sistema utilizado en el presente estudio, conformado por dos cajas (asignadas como territorio individual para el macho y la hembra), conectadas por un corto tubo a una caja central (espacio de uso común, sin asignación territorial a ninguno de los miembros de la pareja) resulta eficiente en proveer un ambiente favorable para el despliegue de comportamientos reproductivos. La obtención de resultados similares utilizando diferentes sistemas de cautiverio, refuerza la idea de que aún manifestando variaciones individuales, el comportamiento de apareamiento de *C. talarum* es altamente estereotipado. Además, las observaciones realizadas no serían consecuencia de la metodología utilizada, lo cual resulta muy ventajoso dada la inherente dificultad de realizar este tipo de estudios en condiciones naturales.

El comportamiento de cortejo de *C. talarum* es bastante extenso, y complejo en cuanto al repertorio de comportamientos involucrados, algunos de ellos podrían asociarse a la evaluación de la pareja y otros al logro de la sincronización de sus estados de motivación para alcanzar la cópula. La agresión juega un rol fundamental desde el inicio, mientras que el reconocimiento químico se logra por señales dejadas por ambos miembros de la pareja en el ambiente y luego por el contacto directo. La capacidad para discriminar el estado reproductivo de un coespecífico del sexo opuesto utilizando pistas químicas contenidas en la orina, heces y exudados genitales ha sido probada en esta especie (Zenuto *et al.* 2004). La vocalización, particular para cada sexo (Schleich y Busch 2002), cumpliría la función de comunicar las intenciones reproductivas de los individuos y de disminuir la agresión. La comunicación vocal ha sido reportada como componente del comportamiento de apareamiento en varias especies de roedores subterráneos solitarios agresivos (*S. ehrenbergi*, Nevo 1969; *C. pearsoni*, Francescoli 1995; *C. mendocinus*; Camín 1999). El autoacicalamiento que practicaron ambos sexos en cercanía durante los períodos postcopulatorios, pueden atribuirse a dos factores, el primero de ellos comunicativo, ya que la estimulación manual de la zona abdominal y perigenital contribuye a la emisión de sus olores y aumentar así su atractivo (Ferkin *et al.* 1996). Por otro lado, también se postula una función sanitaria, ya que el acicalamiento de la zona genital permite disminuir la transmisión de

enfermedades de transmisión sexual, especialmente si es acompañada por lavado con saliva, dadas las propiedades defensivas de las proteínas que porta este fluido (Hart *et al.* 1987). El patrón copulatorio *C. talarum* está compuesto por varios períodos copulatorios (PC), durante cada uno de los cuales el macho realiza MP rápidos de alta frecuencia, probablemente aportando la estimulación necesaria para lograr la eyaculación en el macho y la ovulación en la hembra. Luego, la frecuencia de las penetraciones así como la profundidad de las mismas aumentan e inicia seguidamente MP más profundos que fácilmente pueden ser homologadas a penetraciones eyaculatorias. De acuerdo a lo observado en este estudio, la cantidad de estimulación vaginal sería de gran importancia para *C. talarum*. Solo hembras cuya estimulación provino de al menos tres períodos copulatorios, presentaron cuerpos lúteos. Resulta interesante destacar que una hembra presentó cuerpos lúteos a partir de un apareamiento sin penetraciones profundas pero sí con múltiples PC.

El patrón copulatorio de *C. talarum* se caracterizó por la carencia de enganche (“lock”), presencia de movimientos pélvicos luego de alcanzada la penetración y la presencia eyaculaciones múltiples, dada la factible homologación de los MPP a las penetraciones eyaculatorias. Los primeros dos caracteres se correlacionan con la morfología peneana de esta especie, de diámetro pequeño (Dewsbury 1975). Los machos no parecen requerir de penetraciones múltiples para alcanzar la eyaculación, aunque esta podría no ser una característica generalizada para la especie (solo una observación en este estudio). Así, de acuerdo a los atributos mencionados, *C. talarum* podría ajustarse al patrón 9 ó 11 según la clasificación de Dewsbury (1972), que se diferencia sólo por múltiples penetraciones múltiples o una penetración previas a la eyaculación, respectivamente. El patrón 9 caracterizado por carencia de enganche, movimientos pélvicos, múltiples penetraciones y múltiples eyaculaciones, es uno de los patrones predominantes dentro de los roedores en general (Dewbury 1972). Este patrón fue reportado para diversas especies de roedores subterráneos solitarios no emparentados (*S. ehrenbergi*, Nevo 1969; *Cryptomys hottentotus*, Hickman 1982; *Thomomys talpoides*, Andersen 1978; *Georychus capensis*, Bennet y Jarvis 1988). Asimismo el patrón 9 ó el 10 son los más frecuentes encontrados para roedores histricomorfos no subterráneos como *Chinchilla*, *Cavia* y *Microcavia* (Kleiman 1974). Dentro de la familia Octodontidae, *Octodon degus* (Kleiman 1974) y *C. pearsoni* mostraron el patrón 9 mientras que *Octodontomys* fue categorizado dentro del patrón 11 (Kleiman 1974). Por otra parte, Camín (1999) describe a *C. mendocinus* como perteneciente al patrón 12. Altuna *et al.*

(1991) describió el patrón de *C. pearsoni* incluyéndolo dentro del patrón 9. Así, los roedores subterráneos solitarios presentan patrones incluidos en el rango 9 a 12, donde la ausencia de enganche y la presencia de movimientos pélvicos son claras pero plantea dudas sobre la necesidad de varias penetraciones para alcanzar la eyaculación y la existencia de eyaculaciones múltiples, caracteres que presentan mayor dificultad en su identificación.

Al enfatizar en el patrón de penetraciones se tiende a minimizar el rol de las hembras sobre el patrón copulatorio de una especie. Las hembras juegan un rol activo regulando tanto el despliegue de comportamientos copulatorios así como la duración de los mismos, tanto mediante comportamientos de evitación como de acercamiento (Dewsbury 1972). Existe una estrecha relación evolutiva entre el comportamiento copulatorio del macho y los estímulos requeridos por la hembra en relación a la cantidad y/o al patrón temporal en que estos ocurran (Gray *et al.* 1977). La cantidad de estimulación requerida por una hembra para ovular es variable entre las especies de mamíferos (Ramirez y Soufi 1994). Más aún, los apareamientos prolongados no solo incrementan la probabilidad de ovulación sino también el número de embriones producidos (Roberts *et al.* 1999). Las hembras del roedor subterráneo solitario *S. ehrenbergi*, no ovularon luego de un solo PC pero si lo hicieron luego de dos o mas PC (Shanas *et al.* 1995). Además del número de periodos copulatorios, la duración total o de cada uno de los PC constituiría otra variable de importancia en relación a la estimulación otorgada. La duración de la copula (PC 2 a 96 s.) es variable para *C. talarum* aunque similar a valores reportados para otros roedores subterráneos como *S. ehrenbergi* ('2 s. a varios minutos', Nevo 1969) y *C. pearsoni* (26 a 65 s., Altuna *et al.* 1991). Sin embargo, otros histicognatos muestran períodos copulatorios mucho más cortos (menos de 10 s., Kleiman 1974), pero presentan ovulación espontánea. La necesidad de estimulación copulatoria dada por la duración del estímulo, así como por el patrón de penetraciones sería de importancia para las especies que presentan ovulación inducida. En cambio en otros histicomorfos subterráneos sociales, con ovulación espontánea, se han reportado tiempos de penetración breves (*Cryptomys hottentotus*, Hickman 1982; *Heterocephalus glaber*, Jarvis 1991). De acuerdo a lo observado en este estudio, la cantidad de estimulación vaginal sería de gran importancia para *C. talarum*. Solo las hembras cuya estimulación provino de al menos tres periodos copulatorios presentaron cuerpos lúteos. De esta forma el patrón copulatorio de *C. talarum* caracterizado por un promedio de 3 PC sería consistente con la cantidad de estímulo requerido para alcanzar la ovulación en una hembra con la cual no tuvo contacto previo.

La probabilidad de existencia de competencia de esperma resulta una influencia potencial modelando el comportamiento copulatorio en roedores. Resultados de estudios comparativos indican que la competencia de esperma constituye una presión de selección que favorece cortas latencias a la cópula, eyaculaciones múltiples y de breve duración (Stockley y Preston 2004). Este factor no parece ser una influencia importante en el patrón copulatorio de *C. talarum* dada la extensión de la latencia a la cópula y el patrón de penetraciones encontrados. El bajo tamaño testicular (Zenuto *et al.* 1999) y el bajo conteo espermático (Zenuto *et al.* 2003) apoyan la idea de ausencia de competencia de esperma en esta especie.

Los roedores subterráneos solitarios presentan ovulación inducida, como la mayoría de los mamíferos solitarios (Zarrow y Clark 1968), representando esta estrategia un ahorro de energía en la inversión de gametas hasta que una pareja se encuentre disponible. Los machos de este grupo presentan penes provistos de espinas, ganchos y proyecciones digitiformes que contribuyen al logro de una respuesta fisiológica de la hembra, mientras que en algunas especies, las hembras requieren señales más sutiles, como las feromonas de la orina (Lombardi 1988). La estimulación cervico-vaginal ha sido planteada tempranamente como factor crucial en el logro de la inducción de la ovulación en *Ctenomys* (Weir 1974). *C. talarum* presenta espículas en la superficie del pene que incrementarían la estimulación en las paredes de la vagina durante la cópula. Además, el saco intromitente presenta dos espinas calcáreas que son evaginadas durante la excitación y la cópula, ejerciendo una importante estimulación en el área más profunda de la vagina (Spotorno 1979, Balbontin *et al.* 1996). Estructuras similares fueron reportadas para *C. pearsoni*, excepto que las espinas son reemplazadas por bulbos espinos que cumplirían una función semejante (Altuna y Lessa 1985).

La gran diversidad de comportamientos copulatorios en roedores sería consecuencia de importantes presiones de selección en función de una reproducción exitosa. Asimismo el comportamiento copulatorio se halla relacionado a un gran espectro de variables, tales como aspectos anatómicos, organización social, tipo de ovulación, condiciones ecológicas y sistema de apareamiento (probabilidad de ocurrencia de competencia de esperma) (Dewsbury 1972, Dewsbury 1975). Frente a un sistema tan complejo, la obtención de patrones más claros en el futuro parece altamente condicionada al requisito de obtener mayor cantidad de datos que cubran todos los aspectos mencionados. Además, la mayor parte de los estudios disponibles que describen comportamientos copulatorios no consideran el efectos de los mismos en relación a la fisiología de la hembra (cambios en hormonas específicas, ovulación, formación

de cuerpos lúteos, preñez). En el caso de *C. talarum*, este estudio muestra que el carácter de solitarios, agresivos y con ovulación inducida se correlacionó con aspectos específicos del comportamiento copulatorio. Las latencias a la monta y la complejidad de comportamientos de cortejo, utilizando canales de comunicación químicos, táctiles y auditivos, contribuirían al acercamiento de los individuos, la sincronización de sus motivaciones reproductivas y a la evaluación de la pareja. La estimulación dada por varios períodos copulatorios, con ejercicio de numerosos movimientos pélvicos, además del número y duración de las penetraciones, concuerdan con lo esperado para individuos que presentan ovulación inducida. En esta estimulación contribuiría la anatomía del pene, dadas las espículas que presentan. Si bien se plantea que el comportamiento copulatorio presenta escasa variabilidad intraespecífica, resulta interesante analizar en el futuro si este cambia en algunos de sus componentes en función del grado de estimulación previo (químico, contacto físico directo) al que se haya sometido a la hembra y/o al macho.

**BIBLIOGRAFÍA**

- ADLER, NT Y G BERMANT. 1966. Sexual behavior of male rats: effects of reduced sensory feedback. *J Comp Physiol Psychol* 61: 240-243.
- ALTUNA, CA, FRANCESCOI, G Y G IZQUIERDO. 1991. Copulatory pattern of *Ctenomys pearsoni* (Rodentia, Octodontidae) from Balneario Solís, Uruguay. *Mammalia* 55: 316-318
- ALTUNA, CA, Y EP LESSA. 1985. Penial morphology in Uruguayan species of *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae). *J Mamm* 66 483-488.
- ANDERSEN, DC. 1978. Observations on reproduction, growth, and behaviour of the northern pocket gopher (*Thomomys talpoides*). *J Mamm* 59:418-422
- BALBONTIN, J., REIG, S. Y S. MORENO. 1996. Evolutionary relationships of *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae) from Argentina, based on penis morphology. *Acta Theriol* 41: 237-253.
- BENNETT, N. C. Y J. U. M. JARVIS. 1988. The reproductive biology of Cape mole-rat *Georchus capensis* (Rodentia: bathyergidae). *J Mamm* 69: 293-302.
- BENNETT, NC, CG FAULKES Y AJ MOLTENO. 2000. Reproduction in subterranean rodents. En: Life underground. The biology of subterranean rodents (Lacey, EA., JL Patton y GN Cameron, Eds.). The University Chicago Press, Chicago, USA.
- CAMÍN, S. 1999. Mating behaviour of *Ctenomys mendocinus* (Rodentia, Ctenomyidae). *Zeit für Säugetierk* 64 230-238.
- COHEN-PARSONS M, Y CS CARTER. 1988 Males increase progesterin receptor binding in brain of female voles. *Physiol Behav* 42:191-197
- DEWSBURY, DA. 1972, Patterns of copulatory behavior in male mammals. *Quarterly Review of Biology* 47:1-33.
- DEWSBURY, DA. 1975. Diversity and adaptation in rodent copulatory behavior. *Science* 190:947-954.
- DEWSBURY, DA. 1981, Social dominance, copulatory behavior, and differential reproduction in deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *J Comp Physiol Psychol* 95:880-895.
- DILLEY, WG, Y NT ADLER. 1968. Postcopulatory mammary gland secretion in rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 129(3):964-6.
- DRURY, RAB Y EA WALLINGTON. 1967. Carleton's Histological Technique, Cuarta Edición. New York: Oxford University Press.
- FERKIN, MH, ES SOROKIN Y RE JOHNSTON. 1996. Self-grooming as a sexually dimorphic communicative behavior in meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*. *Anim Behav* 51, 801-810.
- FRANCESCOI, G. 1995. Las señales acústicas en *Ctenomys* (Octodontidae) de Uruguay. X Jornadas Argentinas de Mastozoología, Resumen, 94.
- GRAY GD, AM KENNEY Y DA DEWSBURY. 1977. Adaptive significance of the copulatory behavior pattern of male meadow vole (*Microtus pennsylvanicus*) in relation to induction of ovulation and implantation in females. *J Comp Physiol Psychol* 91: 1308-1319.
- HART, BJ, E KORINEK, Y P BRENNAN. 1987, Postcopulatory genital grooming in male rats: prevention of sexually transmitted infections. *Physiol Behav* 41: 321-325.
- HICKMAN, GC 1982. Copulation of *Cryptomys hottentotus*. (Bathyergidae), a fossorial rodent. *Mammalia*, 46: 293-298.
- JARVIS, JUM. 1991. Reproduction of naked mole-rats. En: The Biology of the Naked Mole-Rat (Sherman, PW Jarvis, J. & Alexander, RD, eds). Princeton University Press, Princeton.
- KLEIMAN DG, 1974. Patterns of behaviour in hystricomorph rodents. *Symp Zool Soc Lond* 34:171-209.
- KREBS, JR Y NB DAVIS. 1993. An Introduction to Behavioural Ecology. Tercera edición Oxford. Blackwell Science.
- LOMBARDI, J. 1998. Comparative vertebrate reproduction. Kluwer Academic Press, Massachusetts, 469 pp..
- NEVO, E. 1969. Mole rats *Spalax ehrenbergi*: mating behaviour and its evolutionary significance. *Science* 163: 484-486.

- RAMIREZ, VD Y WL SOUFI. 1994. Neuroendocrine control of the rabbit ovarian cycle. En: *The Physiology of Reproduction*, Vol 2. (E. Knobil y JD Neill, Eds.). Academic Press, New York.
- ROBERTS, RL, KN WOLF, ME SPRANGEL, WF RALL Y DE WILDT. 1999. Prolonged mating in prairie voles (*Microtus ochrogaster*) Increases Likelihood of Ovulation and Embryo Number. *Biol Reprod* 60(3): 756 - 762.
- SAWREY, DK, Y DA DEWSBURY. 1985. Control of ovulation, vaginal estrus and behavioral receptivity in voles (*Microtus*). *Neurosci Biobehav Rev* 9: 563-571.
- SCHLEICH CE Y C BUSCH. 2002. Acoustic signals of a solitary subterranean rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae): physical characteristics and behavioural correlates. *J Ethology* 20 (2): 123– 131.
- SHANAS, U, G HETH, E NEVO, R SHALGI Y J TERKEL. 1995. Reproductive behaviour in the female blind mole rat (*Spalax ehrenbergi*). *J Zool, Lond* 137: 195- 210.
- SPOTORNO, AE. 1979. Contrastación de la macrosistemática de roedores caviomorfos por análisis comparativo de la morfología reproductiva masculina. *Archivos de Biología y Medicina Experimentales (Chile)* 12: 97-106.
- STOCKLEY, P. 1997. No evidence of sperm selection by female common shrews. *Proc R Soc Lond B* 264:1497–1500.
- STOCKLEY, P, Y BT PRESTON. 2004. Sperm competition and diversity in rodent copulatory behaviour. *J Evol Biol* 17:1048–1057
- TONER, JP, Y NT ADLER. 1986. The Pre-ejaculatory behavior of male and female rats affects the number of sperm in the vagina and uterus. *Physiol Behav* 36: 363-367.
- TRIVERS, RL. 1972. Parental investment and sexual selection. En: *Sexual Selection and the Descent of Man* (Ed. B. Campbell). Aldine, Chicago.
- WEIR, BJ. 1974. Reproductive characteristic of hystricomorph rodents. *Symp Zool Soc Lond* 34: 265-301.
- WOODS, CA. 1993. Suborder Hystricognathi. En: *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference* (Wilson, DE y DM Reeder, eds), Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- ZAR, JH. 1996. *Biostatistical analysis*. Tercera edición. Prentice Hall, New Jersey.
- ZARROW, MX Y JH CLARK. 1968. Ovulation following vaginal stimulation in a spontaneous ovulator and its implications. *J Endocrinol.* 40: 343- 352.
- ZENUTO, RR, AD VITULLO Y C BUSCH. 2003. Sperm characteristics in two populations of the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *J Mamm* 84: 877- 885.
- ZENUTO, RR, AI VASALLO, Y C BUSCH., 2002. Comportamiento social y reproductivo del roedor subterráneo *Ctenomys talarum* (Rodentia, Ctenomyidae) en condiciones de semicautiverio. *Rev Chil Hist Nat* 75: 165-177.
- ZENUTO, RR, EA LACEY, Y C BUSCH. 1999. DNA fingerprinting reveals polygyny in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Mol Ecol* 8:1529–1532.
- ZENUTO, RR, MS FANJUL Y C BUSCH. 2004. Subterranean rodent *Ctenomys talarum* (tuco-tuco) use chemical communication during breeding season. *J Chem Ecol* 30: 2111-2126.

## DISCUSIÓN GENERAL

La mayor parte de los mamíferos que habitan áreas sujetas a variaciones estacionales del ambiente frecuentemente restringen las actividades energéticamente costosas, como lo es la reproducción, a una época específica del año, asegurando que su progenie nazca en condiciones ambientales favorables. La sincronización de la reproducción en relación al ambiente físico, pero a su vez al ambiente social es una característica fundamental para el éxito reproductivo individual (Ims 1990, Bronson 1989). Las modificaciones adaptativas en relación a la biología básica de los roedores son cruciales para la vida subterránea debido a los particulares retos bióticos y abióticos encontrados en este hábitat particular. Sin embargo, los factores ambientales y sociales que regulan la reproducción de este grupo, y especialmente de las especies solitarias, han sido escasamente estudiados, seguramente por las dificultades logísticas inherentes al medio subterráneo y, en muchos casos, la dificultosa reproducción en cautiverio.

*Ctenomys talarum* se comporta como oportunista en lo que respecta a su actividad reproductiva; mientras que los machos no sufren regresión testicular y muestran producción de esperma durante todo el año (Malizia y Busch 1991), las hembras, ajustan su estación reproductiva de acuerdo a las variaciones en las condiciones ambientales (Cap. I). Así las hembras, que constituyen el sexo con mayor inversión energética en la reproducción, serían más sensibles a las condiciones ambientales a las cuales responderían modulando tanto el inicio como la extensión de la estación reproductiva. Las hembras de *C. talarum* emplean el fotoperíodo, para sincronizar el inicio del periodo reproductivo (Cap. II) y ajustar su actividad reproductiva de acuerdo a condiciones ambientales de manera que los altos requerimientos energéticos de la lactancia y el posparto puedan ser asegurados. Por otro lado, los nacimientos ocurren cuando la temperatura ambiente es más favorable para crías altriciales, como una estrategia que permite asegurar el crecimiento y por ende la supervivencia (Cap. I).

Aunque no fueron hallados efectos de la exposición al olor de un macho (Cap. II), sus efectos indirectos sobre la reproducción a través de la familiarización son discutidos en el Cap. III. Las hembras de tuco-tucos, utilizan la información química contenida en productos

metabólicos de los machos y en consecuencia modulan algunos aspectos de su comportamiento reproductivo. Las respuestas encontradas, sin embargo, no concuerdan claramente con las predicciones formuladas inicialmente. El efecto de la familiarización fue especialmente evidenciado por la falta de refuerzos en las cópulas. Contrariamente a lo esperado, las hembras que interactuaron con extraños mostraron mayor actividad reproductiva aunque también mayor incidencia de actos agresivos. En este caso, y a diferencia de las hembras familiarizadas, todas las cópulas obtenidas entre extraños fueron reforzadas en días siguientes. Así, la familiarización por señales químicas contribuiría en la disminución de los costos de apareamiento aunque no conllevaría a un incremento en la actividad reproductiva. El comportamiento de apareamiento debe ser analizado como el producto de estrategias reproductivas individuales, las cuales reflejan cambios oportunistas en las condiciones sociales o ecológicas en el espacio y el tiempo (Gross 1996). Este trabajo constituye el primer estudio que considera la funcionalidad del reconocimiento individual a través de pistas químicas en el comportamiento de apareamiento de roedores subterráneos. Los resultados obtenidos permiten proponer que los individuos modulan sus comportamientos de apareamiento en relación a la posibilidad de obtener información química de sus potenciales parejas. Sin embargo, el efecto de la familiaridad no parece ser simple y requiere de más estudios que permitan comprender la complejidad de los factores involucrados en el comportamiento reproductivo de esta especie.

Las hembras de *C. talarum* no presentan un estado continuo de receptividad comportamental y fisiológica durante la estación reproductiva como fue propuesto para ovuladores inducidos (Zarrow y Clark 1968). Este patrón de receptividad variable a lo largo de la estación reproductiva podría ser el resultado del estado fisiológico de la hembra así como de un importante papel en la selección de pareja. La atracción de los machos se halla fuertemente relacionada a la receptividad de la hembra, sugiriendo que las señales conductuales y no conductuales (olor) son suficientes para que el macho detecte el estado de la hembra.

La ovulación en hembras de *C. talarum* fue solo inducida por el estímulo copulatorio, de manera coincidente a lo previamente hallado por Weir (1974) y para muchos roedores subterráneos solitarios y sociales (Bennett *et al.* 2000). En especies con ovulación inducida, la estimulación vaginal copulatoria es de fundamental importancia en la inducción de cambios neuroendocrinos y comportamentales necesarios para alcanzar la ovulación, y por ende una

reproducción exitosa (Sawyer 1966). No obstante, entre los ovuladores inducidos, diferencias en la sensibilidad de su sistema de control neuroendocrino producen variaciones en cuanto al estímulo requerido en cada especie (Ramirez y Soufi 1994). Existe una estrecha relación evolutiva entre el comportamiento copulatorio del macho y los estímulos requeridos por la hembra en relación a la cantidad y/o al patrón temporal en que estos ocurran (Gray et al. 1977). De acuerdo a lo observado aquí, al menos el número de períodos copulatorios sería de gran importancia para la inducción de la repuesta ovulatoria en hembras de *C. talarum* (Cap V). Además, la duración total o de cada uno de los periodos copulatorios constituiría otra variable de importancia en relación a la estimulación otorgada. La duración de la cópula es variable para *C. talarum* aunque similar a valores reportados para otros roedores pero no para otros histricomorfos que presentan ovulación espontánea y muestran períodos copulatorios mucho más cortos. Las características del estímulo copulatorio capaz de inducir la ovulación requieren una mayor investigación para esta y la mayor parte de las especies de roedores subterráneos.

En hembras que presentaron comportamientos receptivos, el contacto físico con machos provoco un incremento de la producción de estrógenos relacionados al desarrollo folicular, pero no en aquellas no receptivas. Así, el contacto social constituiría un factor de gran importancia en esta especie solitaria. Sin embargo, estos cambios son moderados y no se vieron reflejados en el epitelio vaginal. Esto, sumado a los resultados negativos previos sobre el efecto de los olores del macho sobre la citología vaginal (Cap II), replantea si el efecto del contacto químico produciría cambios no detectados en la fisiología de la hembra, por lo que este tema requiere mayor investigación en el futuro.

Una de las características transversales en los capítulos de la presente tesis es la variabilidad inter-individual. Debido a la importancia de la variabilidad individual en la evolución por selección natural, la variación en las respuestas fisiológicas debería ser considerada como factor central dentro de la biología de los organismos. Si las respuestas de un individuo a una determinada variable ambiental varían en función de la edad, el género, condiciones sanitarias, experiencia previa y la exposición a otros factores ambientales, los efectos de un solo factor sobre una población variarán de acuerdo a su estado inicial. Por ende, la comprensión de la importancia de la variación individual dentro de las poblaciones es esencial para una buena interpretación de

los procesos fisiológicos en general y, particularmente de las respuestas reproductivas en relación al ambiente (Horton y Rowsemitt 1992).

Finalmente, el reduccionismo es el núcleo de gran parte de la investigación fisiológica. La regulación de la reproducción en los mamíferos es un proceso inmensamente complejo, donde el riesgo inherente a su estudio es que las generalizaciones puntuales podrían reflejar solo piezas de nuestro conocimiento o bien una visión unidimensional del proceso. La identificación e integración de las señales ambientales y sociales además de las consideradas en este estudio, que son de gran relevancia para asegurar una reproducción exitosa, así como también la identificación de las condiciones fisiológicas que llevan a las diferencias en la respuesta individual, requieren mayor investigación.

## BIBLIOGRAFÍA

- BENNETT, NC, CG FAUKLES Y AJ MOLTENO. 2000. Reproduction in subterranean rodents. In: Life underground. The biology of subterranean rodents: 145-182 pp. (Lacey E. A., Patton, J. L. y Cameron, G. N. Eds.). The University Chicago Press, Chicago, USA.
- BRONSON, FH. 1989. Mammalian reproductive biology. The University of Chicago Press, Chicago, USA.
- GRAY GD, AM KENNEY Y DA DEWSBURY. 1977. Adaptive significance of the copulatory behavior pattern of male meadow vole (*Microtus pennsylvanicus*) in relation to induction of ovulation and implantation in females. *J Comp Physiol Psychol* 91: 1308-1319.
- GROSS, MR 1996. Alternative reproductive strategies and tactics: diversity within sexes. *Tree* 11:92-98
- HORTON, TH Y CN ROWSEMITT. 1992. Natural selection and variation in reproductive physiology. En: Mammalian energetics, interdisciplinary views of metabolism and reproduction. (Tomasi, TE, y TH Horton, Eds.). Ithaca y London: Comstock Publishing Associates.
- IMS, RA 1990. The ecology and evolution of reproductive synchrony. *Tree* 5: 135.
- MALIZIA, AI Y C BUSCH. 1991. Reproductive parameters and growth in the fossorial rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *Mammalia* 55: 293-305.
- RAMIREZ VD Y SOUFI WL. 1994. Neuroendocrine control of the rabbit ovarian cycle. En: The Physiology of Reproduction. Vol. 2. (Knobil, E, y JD Neill, Eds.).
- SAWYER, CH. 1966. Neural mechanisms in the steroid feedback regulation of sexual behavior and pituitary-gonad function. En: Brain and behavior, III: The brain and gonadal functions. (Gorski, RA y RE Whalen, Eds.), University of California Press, Berkeley.
- WEIR BJ. 1974. Reproductive characteristic of hystricomorph rodents. *Symp Zool Soc Lond* 34: 265-301.
- ZARROW, MX Y JH. CLARK. 1968. Ovulation following vaginal stimulation in a spontaneous ovulator and its implications. *J. Endocrinol.* 40:343- 352.