

# **Caracterización funcional del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) en el roedor subterráneo *Ctenomys talarum*: respuestas fisiológicas a factores ecológicos**

**Resumen.** La presente tesis aborda diversos aspectos de la ecofisiología del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) en el roedor subterráneo *Ctenomys talarum*. El mismo consiste en una cascada hormonal que culmina con la secreción de glucocorticoides (GCs, cortisol y/o corticosterona) de las glándulas adrenales y es uno de los sistemas neuroendócrinos de crucial importancia durante las respuestas a estrés en vertebrados. Los diferentes capítulos abordan las respuestas del cortisol y la corticosterona a estrés puntual, sus patrones de variación en animales silvestres a lo largo del ciclo reproductivo y en condición de cautiverio, como así también aspectos de la regulación fisiológica de ambas hormonas, en machos y hembras de la especie. Los resultados dan cuenta de marcadas diferencias entre el cortisol y la corticosterona en sus respuestas a estrés, sus patrones de variación en condiciones naturales y en su regulación fisiológica en *C. talarum*. Estos resultados indican que la idea predominante de que ambas hormonas cumplen los mismos roles fisiológicos no es extensible a *C. talarum*. Por lo tanto, se plantea la necesidad de reconsiderar este concepto adicionando mayor información al respecto en otras especies del género y de mamíferos en general. Además, los resultados indican la existencia de diferencias en la actividad del eje HPA entre sexos vinculadas a la reproducción. También se evalúan, en paralelo a los niveles de GCs, variaciones en los niveles de hormonas reproductivas (testosterona en machos y progesterona en hembras), tanto en condición de campo como de cautiverio. Estos resultados evidencian niveles de testosterona extremadamente elevados que sitúan a la especie como un modelo interesante para el estudio de la regulación de andrógenos. Además, se estudian los efectos de estrés crónicos y puntuales sobre la regulación de la glucosa en sangre y se evalúan, desde un punto de vista comparativo, otros aspectos importantes de la homeostasis de la glucosa en la especie de estudio. Los diferentes capítulos enfatizan la importancia de realizar conjuntamente experimentos en condiciones de campo y laboratorio cuando se aborda el estudio de la fisiología del eje HPA en especies silvestres.

**Characterization of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA)  
axis in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*: physiological  
responses to ecological factors**

**Abstract.** The present thesis addresses a variety of aspects related to the ecophysiology of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. This neuroendocrine system is one of the hallmarks of the stress response in vertebrates and its activation leads to increased secretion of glucocorticoids (cortisol and/or corticosterone) from the adrenal glands. The different chapters address the responses of cortisol and corticosterone to acute and chronic stress, their patterns of variation in the field throughout the reproductive cycle and in captivity, as well as aspects related to their physiological regulation, both in males and females of the species. The results show marked differences in the responses of both GCs to stressors, their patterns of variation under natural conditions and their physiological regulation. Thus, these data indicate that the prevalent view of shared physiological roles of cortisol and corticosterone is not valid, at least for all species. The results also show differences in the activity of the HPA axis in males and females, related to the reproductive activity. In addition, parallel variations in the levels of reproductive hormones (testosterone for males and progesterone for females) under field and laboratory conditions are also evaluated. These results show extremely-high testosterone concentrations, placing *C. talarum* as an interesting model for the study of androgen regulation. In addition, this thesis also addresses how acute and chronic stressors affect the regulation of blood glucose concentrations and evaluates, within a comparative framework, other important aspects related to the homeostasis of blood glucose in this species. The different chapters emphasize the importance of conducting both field and laboratory experiments in studies about the physiology of the HPA axis in wild species.

## AGRADECIMIENTOS

Me parece fundamental resaltar la enorme importancia de las personas que me acompañaron durante esta etapa, a las cuales les debo gran parte de las cosas logradas durante la realización de esta tesis. Estas cosas incluyen, desde luego, las que están escritas en las páginas subsiguientes, pero también aquellas relacionadas con mi vida que hacen que la misma tenga sentido y sea una experiencia increíble. De esta forma, estoy enormemente agradecido a ellos/ellas. La vida es una sola y cada parte repercute en la otra. Gracias!!!!:

A la Universidad Nacional de Mar del Plata, por otorgarme lugar de trabajo donde llevar a cabo esta tesis y formarme en el campo de la biología.

A Ro (Dra. Zenuto) y a Dani (Dr. Antenucci), por miles de cosas. Por la calidad de su trato y su respeto hacia mi en todo momento. Por preocuparse por mi formación académica y mi persona. Por su forma de trasmitirme sus conocimientos y criticar constructivamente mi trabajo y discutir conmigo experimentos e ideas. Por haber paleado al lado mío en el campo en días de mucho calor y mucho frío. Por estar siempre disponibles para responder a mis preguntas. Por sus palabras de aliento cuando las cosas no salían y cuando las cosas si salían. Por haberme bancado en los momentos difíciles. Por compartir cosas de la vida más allá del trabajo. Su aporte a esta tesis es decididamente enorme y ambos ejemplifican que la calidad humana y científica son perfectamente compatibles.

A la gente del Lab Ecofisiología: Sol, Facu, Mati, Fer, Cris, Ana, Marce. Por su ayuda en el campo y en el lab en tantos momentos y por estar siempre disponibles para ayudar (gente con mentalidad de trabajo comunitario!). Por la buena onda de siempre y por todo lo que me hacen reír. Por hacerme un espacio en este Lab tan particular... son todos unos personajes!!! A Facu por los variados apodos que me ha puesto: curvita, maniquí, manos de tijera jaja!! En fin, por el día a día en el lab, que es tan importante para que uno tenga ganas de volver al otro día!!.

A un revisor del primer capítulo, cuya identidad no conozco pero sospecho, por realizar críticas enormemente constructivas que me obligaron a aprender más y terminaron fortaleciendo globalmente todo mi trabajo.

Al Dr. Gustavo Somoza por proveer el cortisol y la testosterona para los ensayos de validación correspondientes y a Julie Woodruff por traer la ACTH desde USA para las pruebas de estimulación de las adrenales.

A mis padres por su inagotable apoyo y amor en todo momento. Por las infinitas cosas que me transmitieron de forma consciente e inconsciente. Nada de esto hubiera ocurrido sin su apoyo y su presencia, ustedes son la base de todo.

A mi hermana Meli por estar siempre cerca y compartir tanto conmigo.

A Lu Pagnussat, ella sabe bien Porque y Cuanto.

A mis amigos Ale y Dani, por las charlas, las salidas y los momentos compartidos.

A la música, que nutre mi vida y siempre me recuerda quien soy.

Finalmente, quiero expresar que reconozco la importancia del factor suerte en la realización de esta tesis (factor tan poco reconocido en el ámbito de la ciencia!). Expresado de otra forma, esto es simplemente reconocer que los tucos colaboraron mucho conmigo entregándome resultados interesantes en tantas oportunidades. Uno no podía prever esto a priori, por lo que algunas de las cosas interesantes *simplemente sucedieron* en favor de mi trabajo. Una amiga bióloga me dijo una vez: “la astucia es importante Fede, pero la suerte también lo es!”.

### **Financiamiento:**

La presente tesis fue posible debido Becas de Formación de Posgrado Tipo I y tipo II otorgadas por CONICET a F. Vera. Los presentes estudios fueron financiados por los subsidios PIP 2287 otorgado a R. Zenuto y C.D. Antenucci, PICT-06 2102 y PIP 5670 otorgados a C.D. Antenucci y R. Zenuto.

# Introducción general



Foto: M. Mora

## Introducción general

*Concepto de estrés.* Debido al impacto del estrés en la salud y bienestar de humanos y animales, la biología del estrés ha sido un tema de intenso debate a lo largo de las últimas décadas. A pesar de esto, el término “estrés” es aún en la actualidad extremadamente difícil de demarcar y no existe una definición ampliamente aceptada del mismo. Históricamente, el término ha sido utilizado para referirse a diferentes conceptos, incluyendo (i) los estímulos nocivos a los cuales se encuentra expuesto un individuo (factores de estrés o estresores), (ii) las respuestas fisiológicas y comportamentales que permiten lidiar con estos estímulos y (iii) la sobrecarga en la capacidad de respuesta del organismo que desencadena un estado patológico (Moberg, 1985). En la bibliografía se adoptan diferentes definiciones dependiendo fundamentalmente del objetivo del estudio y del enfoque particular del autor. Selye (1936), definió estrés en sus estudios pioneros como “la respuesta inespecífica del cuerpo a cualquier demanda de cambio”. Algunas definiciones más recientes se centran en el concepto de homeostasis y/o de estímulo adverso para arribar a una definición. Para Chrousos y colaboradores (1998) estrés “es el reconocimiento de un estresor por el organismo y, por lo tanto, un estado de amenaza a la homeostasis”. Kim y Diamond (2002) han propuesto que “el estrés es una condición en la que un individuo se encuentra en alerta debido a un estímulo adverso y que la magnitud del estrés dependerá de la percepción del control del individuo sobre el estímulo adverso”. Por su parte, Martin (2009) define estrés como “un estado fisiológico y conductual (mediado por hormonas de estrés) que permite hacer frente, evitar o recuperarse de un estímulo o condición adversa”. En todos estos casos, se alude a que los organismos experimenten situaciones no predecibles, y en alguna medida, incontrolables, tal que incurren en un estado de emergencia (Wingfield, 1998). Otras definiciones hacen hincapié en el balance energético para definir estrés. Así, Nelson (2000) lo define como “la suma de todos los efectos inespecíficos de factores que pueden actuar sobre el organismo incrementando el consumo de energía significativamente por sobre un nivel basal o de descanso” y Bonier y colaboradores (2009) definen estrés puntual como “un desafío impredecible de corta duración que lleva al individuo a una situación de sobrecarga alostática”. Estas dos últimas definiciones pueden llegar a ser tautológicas ya que cuando las hormonas de estrés se incrementan durante procesos tales como la reproducción, es posible considerar que esto representa un estado de

“estrés reproductivo” (Martin, 2009). Bajo una perspectiva más genérica, otros autores, como Delehanty y Boonstra (2009) definen estrés “como un estado de compromiso de la homeostasis que ha producido activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal con liberación de glucocorticoides (GCs)”.

La diversidad de definiciones existentes enfatiza claramente la ambigüedad del termino “estrés” para la biología y la medicina y la enorme dificultad para arribar a un consenso sobre una definición. Según Nelson (2005) el término “estrés” sobrevive porque es conveniente para hacer referencia a un tema general de discusión en biología y medicina. Debido a estas dificultades, en la bibliografía se utilizan comúnmente términos mucho más sencillos de definir como son “factor de estrés” o “estresor” (para referirse a los estímulos nocivos que constituyen una amenaza para la homeostasis) y “respuesta de estrés” (para referirse al conjunto de mecanismos de comportamiento y fisiológicos que se producen en respuesta a dichos estímulos, Nelson 2005). Por otro lado, es importante considerar la distinción entre “estrés puntual” (una respuesta a un estresor de corta duración que permite lidiar con el mismo y, por lo tanto, presenta valor adaptativo) y “estrés crónico”, que es la respuesta a estímulos adversos de duración prolongada que resultan en un estado patológico (Nelson, 2005).

Los estudios pioneros sobre estrés fueron conducidos por el fisiólogo y médico Hans Selye, quien desarrolló el concepto de Síndrome General de Adaptación (*General Adaptation Syndrome*; Selye, 1936). En sus experimentos con ratas, Selye observó que si las mismas eran expuestas a diversos agentes nocivos (frío, lesiones quirúrgicas, ejercicio físico excesivo, intoxicación con dosis sub-letales de diversas drogas, etc.) se producía un síndrome típico, independientemente de la naturaleza del agente nocivo aplicado. Este síndrome se desarrollaba en tres etapas: alarma, resistencia y agotamiento (Selye, 1956). Si bien la idea de Selye de que las respuestas de estrés son inespecíficas ha sido muy discutida (Pacak et al., 1998, Pacak y Palkovits, 2001), varias fueron sus contribuciones para la biología del estrés: (1) estableció que diversos estímulos son capaces de producir respuestas biológicas, (2) advirtió que, aunque esta respuesta podría ayudar al animal a mantener la homeostasis, tenía el potencial de aumentar la vulnerabilidad a diversas patologías y (3) identificó la importancia del sistema neuroendócrino en la respuesta a estrés. Particularmente, este trabajo fundacional condujo a una rica línea de investigación acerca de los roles biológicos de los GCs (Neylan, 1998).

Los estudios que se desarrollaron extensivamente desde el trabajo de Selye (fundamentalmente en investigación biomédica) han demostrado que la respuesta endócrina a factores de estrés es sumamente compleja e involucra una multiplicidad de hormonas que tienen efectos sobre virtualmente todos los sistemas fisiológicos y el comportamiento. Muy brevemente, durante los primeros segundos se produce la secreción de catecolaminas (epinefrina y norepinefrina) las cuales tienen efectos estimulatorios sobre los sistemas respiratorio y cardiovascular e incrementan los niveles de glucosa en sangre (respuesta de “pelea o escape”; del inglés *fight or flight response*). Además, muchas otras hormonas, incluyendo endorfinas, prolactina, glucagón, vasopresina y hormonas tiroideas pueden ser secretadas como parte de una respuesta a estrés, redundando en una respuesta fisiológica integral del organismo (Sapolsky et al., 2000, Nelson, 2005). De esta manera, la respuesta de estrés presenta varios efectos adaptativos como incrementos en la disponibilidad de energía y la toma de oxígeno, inhibición de procesos energéticamente costosos no vinculados con la supervivencia a corto plazo (digestión, crecimiento, reproducción), disminución en la percepción de dolor y aumento de las funciones sensoriales y la memoria (Nelson, 2005).

*Eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA).* Constituye un sistema neuroendócrino de crucial importancia en las respuestas a estrés en vertebrados. Es relativamente inespecífico, ya que es activado por una gran diversidad de estresores los cuales incluyen inestabilidad social (Sapolsky, 1983), interacciones sociales agonísticas (Sands y Creel, 2004; Soto-Gamboa et al., 2005), clima adverso (Romero y Wikelsky, 2001), baja disponibilidad de alimento (Sapolsky, 1986; Astheimer et al., 1992), contaminación ambiental (Hopkins et al. 1997), actividad física excesiva (Luger et al., 1987), shocks eléctricos (Weiss, 1968), captura y manipulación (Kenagy y Place 2000; Romero et al., 2008) y diversos estresores psicológicos (frustración, confinamiento en un lugar novedoso, dar una charla pública, etc.; Nelson, 2005), entre otros. Durante la activación de este eje se induce la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y arginina vasopresina (AVP) del núcleo paraventricular del hipotálamo, las cuales llegan a la pituitaria anterior vía circulación portal y estimulan la secreción de la hormona adrenocorticotropina (ACTH) a la circulación general. La ACTH actúa a nivel de la corteza de las glándulas adrenales induciendo la síntesis y secreción de hormonas esteroides denominadas glucocorticoides (GCs, cortisol y/o corticosterona, dependiendo de la especie) a la

circulación general, cuyos niveles se incrementan de 3-5 minutos después de percibida una amenaza (Sapolsky et al., 2000; Boonstra, 2005). Los GCs ejercen numerosos efectos que permiten restituir o mantener lo homeostasis, entre los cuales se encuentran la estimulación de la gluconeogénesis en el hígado, inhibición de la toma de glucosa por tejidos periféricos, movilización de reservas de grasa como fuente de energía para el hígado, supresión de la respuesta inflamatoria e inhibición de la secreción de numerosas hormonas y neuropéptidos (Boonstra, 2005, Sapolsky et al., 2000). De hecho, a lo largo de los últimos 60 años se han descubierto una gran cantidad de efectos de los GCs sobre tejidos blanco (Sapolsky et al., 2000). Sin embargo, cuando los niveles de GCs permanecen elevados durante un tiempo relativamente prolongado (estado de estrés crónico) se producen una variedad de efectos nocivos para la salud, incluyendo, infertilidad, inhibición del crecimiento e inmunosupresión (Sapolsky, 1992). Aunque recientemente se ha reportado que durante la respuesta a estrés puede verificarse un período de incremento en la capacidad inmunológica, así como también insensibilidad a GCs (Martín, 2009). Así, los GCs ejercen un fuerte *feedback* negativo a nivel de la pituitaria y del hipotálamo, el cual permite inhibir la secreción continua de estas hormonas luego del efecto de un estresor (Boonstra, 2005). Por otro lado, el eje HPA presenta también funciones de importancia durante condiciones de homeostasis, ya que tiene efectos integrados sobre el balance energético (Pecoraro et al., 2006) y el comportamiento (Breuner y Wingfield, 2000; Pecoraro et al., 2006) y participa en la regulación de ciclos de actividad diarios (Malisch et al., 2008).

Debido a la generalidad de la respuesta del eje HPA ante factores de estrés, los niveles de GCs en plasma o, alternativamente, de sus metabolitos en heces, han sido crecientemente utilizados como indicadores de los niveles de estrés en campos como ecofisiología, endocrinología del comportamiento y biología de la conservación (Cavigelli, 1998; Kenagy y Place, 2000; Boonstra et al., 2001; Möstl y Palme, 2002; Romero, 2002; Romero, 2004; Sands y Creel, 2004; Soto-Gamboa et al, 2005; Romero, 2006; Romero et al., 2008), más allá de las investigaciones en biomedicina. Esto se debe a que se acepta, en general, que los niveles de estrés de los individuos se relacionan con la salud de los mismos. Por lo tanto, los GCs pueden ser utilizados como indicadores de la “salud” de una población y para evaluar respuestas a disturbios ambientales (Mormède et al., 2007). Más aún, bajo la perspectiva de la hipótesis que relaciona los GCs con el éxito reproductivo “*Cort-Fitness Hypothesis*”, niveles

aumentados de GCs serían indicativos de desafíos ambientales y de bajo éxito reproductivo. El soporte empírico para este patrón muestra variaciones entre poblaciones y para individuos en diferentes etapas de su ciclo de vida (Bonier et al., 2009). Por otro lado, la “*Cort-Adaptation Hypothesis*” expande la definición de desafío ambiental a desafíos alostáticos experimentados por el organismo, incluyendo las demandas energéticas durante la reproducción. En este caso, incrementos en GCs se relacionan a incrementos en el éxito reproductivo (Bonier et al., 2009).

Sin dudas, el conocimiento sobre la fisiología del eje HPA en especies silvestres es escaso ya que, hasta hace poco tiempo, estos datos han sido ignorados en gran medida en estudios ecológicos (Romero, 2004; Romero et al., 2008). Particularmente en mamíferos, las variaciones en los niveles de GCs en especies silvestres son pobremente entendidas en relación a otros grupos de vertebrados (Romero 2002; Romero et al., 2008). Dada la importancia de entender la fisiología de los GCs en investigación biomédica y en biología de la conservación, la adición de información sobre animales silvestres proveería una perspectiva más amplia sobre la naturaleza y los roles evolutivos de las respuestas del eje HPA (Romero et al., 2008). Así, los niveles de GCs sólo podrían ser utilizados confiablemente como indicadores de desafíos ambientales o éxito reproductivo si se conoce previamente la relación entre GCs, ambiente y éxito reproductivo para el organismo de interés (Bonier et al., 2009).

*Modelo de estudio.* Los roedores subterráneos del género *Ctenomys* (tuco-tucos, suborden: Hystricomorpha, Familia: Ctenomyidae) comprenden 56 de las 156 especies de roedores subterráneos conocidas y se encuentran distribuidos en una gran área del sur de Sudamérica (Reig et al., 1989). Tanto su ambiente físico como biológico presentan características que los convierten en un modelo interesante, además de novedoso, para el estudio de la ecofisiología del eje HPA. Las cuevas que habitan son ambientes oscuros donde los niveles de CO<sub>2</sub> pueden mantenerse elevados y los de O<sub>2</sub> bajos en relación a los valores de superficie (ver Shams et al., 2005). Además, el costo de la locomoción (excavación) en el ambiente subterráneo puede ser hasta 300 veces superior al de moverse la misma distancia en la superficie (Vleck 1979), mientras que la disipación del calor puede encontrarse limitada (Buffenstein, 2000). No obstante, el ambiente subterráneo brinda protección contra predadores y amortigua las variaciones diarias y estacionales de temperatura, humedad y fotoperíodo (Bennett et al., 1988; Cutrera y Antinuchi, 2004; Burda et al., 2007; Šumbera et. al, 2004). Por otro lado, casi todas las especies de tuco-tucos son solitarias

y altamente territoriales, presentando altos niveles de agresión intra-específica (Zenuto et al., 2002). Esto sugiere roles importantes para los GCs en la movilización de reservas energéticas durante las interacciones sociales agresivas, especialmente al momento de establecer los territorios individuales y, en el caso de los machos, durante la estación reproductiva por el acceso a las hembras. A pesar de esto, solo el tuco-tuco colonial *C. sociabilis* ha sido objeto de un estudio en relación a la ecofisiología del eje HPA (Woodruff et al., 2010).

*Ctenomys talarum*. Se distribuye a lo largo de la zona costera de la Provincia de Buenos Aires, desde Magdalena hasta Necochea. Se trata de una especie que ha sido extensamente utilizada como modelo en estudios de ecología, genética, comportamiento y fisiología. Por lo tanto, el estudio de la ecofisiología del eje HPA brindaría no solo información adicional necesaria para el caso de mamíferos silvestres (y particularmente roedores subterráneos), sino que también constituye una excelente oportunidad para lograr una mayor integración de estas áreas de conocimiento. Como la mayoría de los tuco-tucos, se trata de una especie solitaria y territorial que habita sistemas de cuevas que él mismo construye (Antinuchi y Busch, 1992). Allí concentran la mayor parte de sus actividades, saliendo a superficie (solo cortas distancias) desde las “bocas de alimentación” a fines de coleccionar vegetación que consumen posteriormente en el interior de sus túneles. Son herbívoros generalistas y oportunistas, ya que consumen una amplia variedad de especies vegetales en relación a su disponibilidad en el ambiente (del Valle et al., 2001). Los individuos no comparten las cuevas excepto al momento del apareamiento y las hembras con las crías hasta el momento de la dispersión (Busch et al., 1989). La especie presenta un sistema de apareamiento poligínico en el cual algunos machos monopolizan el acceso a múltiples hembras (Zenuto et al., 1999; 2002). La estación reproductiva se extiende durante nueve meses, comenzando a fines del otoño (junio; Busch et al., 1989, Malizia y Busch 1991, Fanjul et al., 2006), y como la gestación se extiende por 95 días (Zenuto et al., 2001), la mayor parte de los nacimientos ocurren en primavera. Los altos niveles de poliginia y agresión entre machos sugieren un escenario de intensa competencia local por apareamientos donde una mejor ubicación espacial de los machos representa una ventaja para obtener apareamientos (Zenuto, 1999). Evidencias disponibles de estudios llevados a cabo en el campo (proporción sexual sesgada hacia las hembras, patrón espacial de los sexos, presencia de heridas producidas en peleas, Busch et al., 1989) y en condiciones de cautiverio (Zenuto et al., 2002), permiten proponer que la

competencia entre machos sería un componente importante para la adquisición de parejas. Por otro lado, la especie puede ser mantenida con éxito en condiciones de cautiverio (Zenuto et al., 2002), por lo que ofrece la posibilidad de desarrollar estudios complementarios bajo condiciones de campo y de laboratorio. Este enfoque dual es importante ya que ambas aproximaciones (trabajo bajo condiciones de campo y cautiverio) presentan ventajas y limitaciones y se ha demostrado que los animales pueden diferir notablemente en su comportamiento y fisiología bajo una u otra condición (Künzl et al., 2003).

Por los motivos mencionados, la presente tesis se enfoca en el estudio del eje HPA, desde un punto de vista ecofisiológico, en el roedor subterráneo *C. talarum* y constituye una contribución al conocimiento de los sistemas de respuesta a estrés en poblaciones naturales, particularmente bajo presiones selectivas asociadas al medio ambiente subterráneo. Por lo tanto, el objetivo general de la presente tesis es: *caracterizar el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (eje HPA) en el roedor subterráneo Ctenomys talarum y evaluar sus respuestas a factores ecológicos y fisiológicos.*

La tesis se encuentra estructurada en 4 capítulos, los cuales abordan diferentes aspectos relacionados con esta temática. A continuación se realiza una breve descripción del contenido de cada uno de los capítulos.

**Capítulo 1: Cortisol y/o corticosterona?: niveles en condición natural y respuestas a estrés puntual y crónico en tuco-tucos macho (*Ctenomys talarum*).** En este capítulo se caracteriza al eje HPA desde el punto de vista fisiológico en sus aspectos fundamentales. Se evalúa, para *C. talarum*, cual es el principal glucocorticoide (GC) producido por las glándulas suprarrenales (cortisol o corticosterona) a través de la determinación de los niveles de ambas hormonas en animales silvestres y condiciones de cautiverio, y por medio de la evaluación de las respuestas de ambos GCs a factores de estrés puntual. La presente sección aporta evidencia sobre una diferenciación de roles entre el cortisol y la corticosterona en *C. talarum*. Además, el capítulo aborda la relación entre niveles de GCs y perfiles de leucocitos en animales silvestres (particularmente la razón neutrófilos a linfocitos en sangre) y la utilidad de los mismos como herramienta para clarificar las causas de las variaciones estacionales en los niveles de GCs en mamíferos.

**Capítulo 2: Respuesta de la glucosa en sangre frente a estrés puntuales y crónicos. Capacidad de regulación de los niveles de glucosa en sangre en el roedor subterráneo *Ctenomys talarum*.** En este capítulo se aborda la posibilidad de utilizar los niveles de glucosa en sangre como indicador adicional de estrés en los tuco-tucos. Esta evaluación se fundamenta en que las insulinas de los roedores hystricomorfos presentan muy baja actividad biológica, la cual puede afectar la capacidad de regulación de la glucemia. Se evalúa la capacidad de regulación de los niveles de glucosa en sangre por medio de pruebas de tolerancia de glucosa en el laboratorio y la medición de glucemia en animales silvestres. Se explora también el efecto de factores de estrés puntuales y crónicos sobre los niveles de glucosa en sangre y el posible rol de la actividad física como mecanismo de regulación de los niveles de glucosa en sangre.

**Capítulo 3: Variaciones estacionales en los niveles de cortisol y hormonas reproductivas en *Ctenomys talarum*: diferencias entre sexos, respuesta a estrés puntual y el cautiverio.** Se indaga en la ecofisiología del eje HPA evaluando diferencias entre sexos en los niveles de GCs asociadas al contexto reproductivo. Así, se evalúan los niveles de base y en respuesta a estrés de cortisol en machos y hembras silvestres en diferentes momentos del ciclo reproductivo. Se exploran también variaciones estacionales asociadas a los niveles de hormonas reproductivas en animales silvestres (testosterona en machos y progesterona en hembras) y los efectos del cautiverio sobre los niveles del cortisol y hormonas reproductivas. Los resultados dan cuenta de importantes diferencias entre sexos en la actividad del eje HPA vinculadas al contexto reproductivo y fuertes efectos supresores del cautiverio sobre las hormonas medidas. Además sitúan a *C. talarum* como un modelo interesante para el estudio de regulación de andrógenos.

**Capítulo 4: Respuestas del cortisol y la corticosterona a adrenocorticotropina (ACTH) en individuos cautivos y silvestres de *Ctenomys talarum*.** Se evalúan las respuestas del cortisol y la corticosterona a la hormona adrenocorticotropina (ACTH) en animales silvestres y también bajo condiciones de cautiverio. Se evidencian variaciones interanuales muy remarcables en los niveles de corticosterona en plasma. El capítulo evidencia la existencia de diferencias en la regulación fisiológica del cortisol y la corticosterona en *C. talarum*.

**Anexo: Validación de un radioinmunoensayo (RIA) para la determinación de niveles de testosterona en muestras de plasma de *Ctenomys talarum*.** Se reporta la validación del radioinmunoensayo utilizado para la determinación de niveles de testosterona en plasma de individuos macho en *C. talarum*. La sección aborda la optimización del ensayo para evitar problemas de interferencia y saturación en muestras de plasma de esta especie.

## Capítulo I

Cortisol y/o corticosterona?: niveles en condición natural y respuestas a estrés puntual y crónico en tuco-tucos macho (*Ctenomys talarum*).



El presente capítulo será publicado como: Vera, F., Antenucci, C.D., Zenuto, R.R., Cortisol and corticosterone exhibit different seasonal variation and responses to acute stress and captivity in tuco-tucos (*Ctenomys talarum*). *General and Comparative Endocrinology*, en prensa.

## 1. Introducción

Los glucocorticoides (GCs, cortisol y/o corticosterona, dependiendo de la especie) son hormonas que cumplen numerosas funciones en vertebrados. En situación de homeostasis tienen efectos integrados sobre el balance energético (Pecoraro et al., 2006; Dallman et al., 2007) y el comportamiento (Breuner y Wingfield, 2000; Pecoraro et al., 2006; Dallman et al., 2007) y participan en la regulación de ciclos de actividad de diarios (Malisch et al., 2008). Además, se encuentra bien documentado que las condiciones ambientales adversas (estresores) producen activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), aumentando la secreción de GCs por encima de los niveles basales, lo cual es crítico para mantener o restablecer la homeostasis durante el desafío ambiental o luego de este (Sapolsky et al., 2000). Sin embargo, si los niveles de GCs se mantienen elevados por tiempos relativamente prolongados (estados de estrés crónico) se producen una serie de efectos negativos sobre la salud incluyendo, infertilidad, inhibición del crecimiento e inmunosupresión (Sapolsky, 1992). Se ha demostrado que en animales silvestres los niveles de GCs pueden estar relacionados negativamente con la supervivencia (Pride, 2005; Romero y Wikelsky, 2001), aunque la relación entre los niveles de GCs y el éxito reproductivo no es siempre clara (Bonier et al., 2009; Breuner et al., 2008).

Existe un importante grado de variación entre especies en la abundancia relativa del cortisol y la corticosterona en plasma. En el grupo de los roedores el principal GC puede ser el cortisol (ardillas de tierra *Spermophilus parryii*: Boonstra et al., 2001; el Degu *Octodon degus*: Kenagy et al., 1999; Soto-Gamboa et al., 2005) o la corticosterona (lemmings *Lemmus trimucronatus*: Romero et al., 2008; ratas: Retana-Marquez et al., 2003) o ambas pueden estar presentes (ardillas *Tamias amoenus*: Boswell et al., 1994; Place y Kenagy, 2000; Romero et al., 2008; hamsters: Ottenweller et al., 1985). Actualmente, no se comprende porque algunos mamíferos presentan dos GCs en cantidades detectables en plasma. Muy comúnmente, se asume que el cortisol y la corticosterona comparten sus roles fisiológicos en estas especies (ver Place y Kenagy, 2000; Boonstra et al., 2001a; Romero et al., 2008) y que su importancia relativa depende exclusivamente de sus concentraciones en plasma. Una aproximación inicial para evaluar si efectivamente el cortisol y la corticosterona comparten las mismas funciones sería evaluar cómo ambas hormonas responden a tratamientos experimentales (incluyendo factores de estrés puntuales y crónicos) y sus patrones de

variación en condiciones naturales. Mientras que respuestas y patrones de variación similares confirmarían la noción prevaleciente de que comparten sus roles fisiológicos, diferentes patrones sugerirían algún grado de diferenciación en sus funciones.

Recientemente, se ha descrito que la mayoría de los mamíferos silvestres exhiben variaciones estacionales en los niveles plasmáticos de GCs, aunque no hay un patrón claro respecto de cual es el momento en que los GCs permanecen más elevados (Romero, 2002). Las razones de estas variaciones no se comprenden bien, aunque se han propuesto distintas explicaciones relacionadas con la movilización de reservas de energía y regulación de comportamientos mediados por GCs (Romero, 2002). En estos estudios se intentan obtener “muestras de base de GCs”, lo cual requiere realizar las extracciones de sangre dentro de los 3 min de producidas las capturas para evitar el efecto del estrés inherente a la captura y manipulación de los animales sobre los niveles de GCs en plasma (Romero, 2002, Romero et al., 2008). De hecho, un punto que merece mayor clarificación es el significado fisiológico de las variaciones estacionales en los niveles de base de GCs (Romero, 2002). Aunque se han obtenido muestras dentro de esta ventana temporal en algunos estudios, no se ha determinado si las variaciones estacionales registradas reflejan fluctuaciones paralelas en la intensidad y/o presencia de estresores naturales previos a la captura o si indican estrictamente cambios en los niveles basales de estas hormonas (ver Romero, 2004). Este problema podría ser superado por medio de la determinación conjunta de perfiles de leucocitos (u otros indicadores confiables de estrés), si se han caracterizado estos perfiles durante condiciones de presencia y ausencia de estrés (ver Davis et al., 2008). Particularmente, la razón neutrófilos a linfocitos (N:L) aumenta rápidamente en respuesta a estrés y puede ser directamente relacionada con los niveles de GCs (Davis et al., 2008). Así, mientras incrementos paralelos en la razón N:L y los niveles de GCs serían indicativos de estrés, cambios en las concentraciones de GCs acompañados por valores relativamente bajos en la razón N:L, indicarían una modulación estacional de los niveles basales de estas hormonas.

El roedor subterráneo *C. talarum* constituye un modelo interesante para explorar los aspectos previamente mencionados. Tanto el cortisol como la corticosterona se encuentran presentes en plasma de otros roedores hystricomorfos como chanchitos de Guinea (Dalle y Delost, 1974) y Chinchilla (Ponzio et al., 2004), aunque en el tuco-tuco colonial *Ctenomys sociabilis* solo la corticosterona se encontró presente en cantidades significativas (Woodruff et al., 2010). A la inversa, en *Octodon*

*degus* solo el cortisol se encontró presente en plasma (Kenagy et al., 1999). *C. talarum* presenta altos niveles de agresión intra-específica (Zenuto et al., 2002), lo cual sugiere roles importantes para los GCs en la movilización de reservas energéticas durante las interacciones agresivas, especialmente en el caso de los machos por la defensa del territorio y el acceso a hembras. Además, su nicho subterráneo reduce las fluctuaciones ambientales estacionales (temperatura, fotoperíodo Bennett et al., 1988; Cutrera y Antinuchi, 2004), lo cual contrasta con las especies previamente estudiadas que habitan ambientes de superficie. Por otro lado, esta especie puede ser mantenida con éxito en cautiverio donde las respuestas del eje HPA pueden ser monitoreadas durante el proceso de aclimatación y los efectos del estrés crónico y puntual pueden ser estudiados bajo condiciones controladas.

En el presente estudio, se reportan los resultados de muestreos y experimentos llevados a cabo en el campo y el laboratorio con el fin de contribuir al conocimiento de la fisiología del eje HPA en mamíferos y en *Ctenomys* en particular. Los objetivos específicos fueron: (1) evaluar variaciones estacionales en los niveles del cortisol y la corticosterona en plasma en tuco-tucos macho a lo largo del ciclo reproductivo, (2) comparar las respuestas del cortisol y la corticosterona a estrés puntual en el campo y en el laboratorio, (3) evaluar las respuestas de ambos GCs cuando los individuos son llevados al laboratorio y (4) determinar si las variaciones estacionales en los niveles de GCs indican cambios en los niveles de estrés o reflejan fluctuaciones en los niveles basales mediante el uso de perfiles de leucocitos.

Hipótesis: (1) Los niveles de GCs varían estacionalmente en el campo, presumiblemente reflejando las condiciones cambiantes de requerimientos energéticos e interacciones con coespecíficos, (2) el traslado de los animales a condiciones de cautiverio se encuentra asociado con niveles de aumentados de GCs. (3) En función de los antecedentes previamente mencionados sobre roedores hystricomorfos es difícil plantear a priori cual puede ser el principal GC en *C. talarum*.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Variaciones en los niveles del cortisol y la corticosterona en condiciones silvestres

Para este trabajo se capturaron un total de 97 machos adultos de *Ctenomys talarum* en la localidad de Mar de Cobo (Provincia de Buenos Aires, Argentina; 37°45'S, 57°26'W; Imagen 1). Para evaluar variaciones en los niveles de cortisol y corticosterona en el campo se capturaron individuos en tres estaciones del ciclo reproductivo de la especie durante 2007 (1) estación no reproductiva (ENR, abril-mayo, n = 12), (2) inicio de la estación reproductiva (IER, junio-julio, n = 14) y (3) pico de la estación reproductiva (PER, Octubre, n = 13, Busch et al., 1989; Malizia and Busch, 1991, Fanjul et al., 2006). La distinción en estaciones fue realizada de acuerdo al ciclo reproductivo de las hembras ya que los machos luego de alcanzar la madurez sexual no experimentan regresión de los testículos y contienen espermatozoides en sus epidídimos durante todo el año (Malizia y Busch, 1991). Los animales fueron capturados utilizando trampas de plástico de captura viva (10 cm diámetro, 35 cm largo) que fueron ubicadas cavando pozos de 20-40 cm de profundidad donde se observaron montículos frescos de arena en superficie para poder acceder a las galerías subterráneas (Fotografía 1). Estas trampas presentan un piso falso que dispara el cierre de una puerta cuando un animal presiona sobre éste. Debido a que las trampas fueron monitoreadas desde cerca, los animales nunca permanecieron en el interior de estas por más de 20 min (rango < 1 min-20 min). Cuando se detectó la captura de un animal (las trampas presentan un alambre atado a la puerta que puede ser visto desde afuera cuando la misma se ha cerrado), se llevó al animal capturado dentro de su trampa hasta a la camioneta que se utilizó para ir al campo, en la cual se realizaron las extracciones de sangre. Las muestras de sangre (500-900 µL) se obtuvieron del seno retro-orbital, luego de anestesiar 20-30 s con cloroformo, utilizando una jeringa conectada a un *butterfly* al cual se le reemplazó la aguja por un tubo capilar heparinizado. La toma de las muestras de sangre (incluida la anestesia previa) no llevó más de 3 min para garantizar que los niveles de GCs no fueran afectados por la extracción misma. Para la mayoría de las especies estudiadas, los niveles de GCs comienzan a incrementarse 3 min luego de percibido un factor de estrés, de tal manera que se considera que las muestras obtenidas en esta ventana de tiempo reflejan las concentraciones de GCs previas a la manipulación (“niveles de base”, Romero, 2002). Además, usualmente

trascurrieron 1-2 min más entre la detección de las capturas y el inicio de la toma de muestra de sangre. Sin embargo, datos preliminares mostraron que no hay correlación entre los niveles de cortisol en plasma y el tiempo de manipulación en tuco-tucos que fueron manipulados durante 1-7 min, lo que indica que estos animales no incrementan consistentemente el cortisol en respuesta a la manipulación dentro de esta ventana de tiempo (Fig. 1). En otros roedores caviomorfos las concentraciones de GCs no cambian dentro de los 5 min en respuesta a estresores (Sachser, 1994; Schwarz-Weig, 1998; ambos en Künzl et al., 2003). Las muestras de sangre fueron transportadas refrigeradas al laboratorio y centrifugadas 15 min a 660 g. El plasma fue separado del precipitado formado por células y mantenido a -20 °C hasta su análisis. En todas las muestras se determinaron los niveles de cortisol y en las que presentaron suficiente volumen residual (n = 7, 8 y 11 para ENR, IER y PER, respectivamente) se determinaron también los niveles de corticosterona.

Se ha reportado que la captura de los animales produce incrementos en las concentraciones de GCs en varias especies (Boonstra et al., 2001a; Place y Kenagy, 2000; Romero, 2002; Romero et al., 2008), aunque esto no siempre ocurre (ver Nunes et al., 2006). Para evaluar los efectos del trampeo se llevó a cabo un experimento adicional durante abril-mayo 2008 (ENR 2008) durante el cual las trampas fueron constantemente monitoreadas para obtener muestras de plasma dentro de los 3 min de producidas las capturas (niveles de base de cortisol y corticosterona) y compararlas con muestras tomadas mas allá de este intervalo de tiempo. Para garantizar que las muestras fueran obtenidas dentro de los 3 min de las capturas, 4 personas trabajaron simultáneamente en el campo y permanecieron en sus proximidades con el fin de lograr un monitoreo constante de las trampas. Inmediatamente al producirse una captura se registraba por medio de un cronómetro el tiempo transcurrido mientras se procedía lo más rápido posible para lograr la muestra de sangre dentro de los 3 min. Se logró este objetivo en 10 capturas. Debido a que la existencia de variaciones en los niveles de GCs entre años no podía ser descartada, no se consideró correcto comparar estos datos con las muestras tomadas durante 2007. Por este motivo, también se obtuvieron muestras de sangre de otros dos grupos de animales que permanecieron dentro de las trampas durante 5 (n = 5) ó 20 (n = 8) min previamente a la extracción de sangre para realizar comparaciones con las muestras de base. Para replicar el procedimiento de muestreo durante 2007 estas trampas no fueron manipuladas hasta que habían transcurrido los tiempos previamente mencionados.

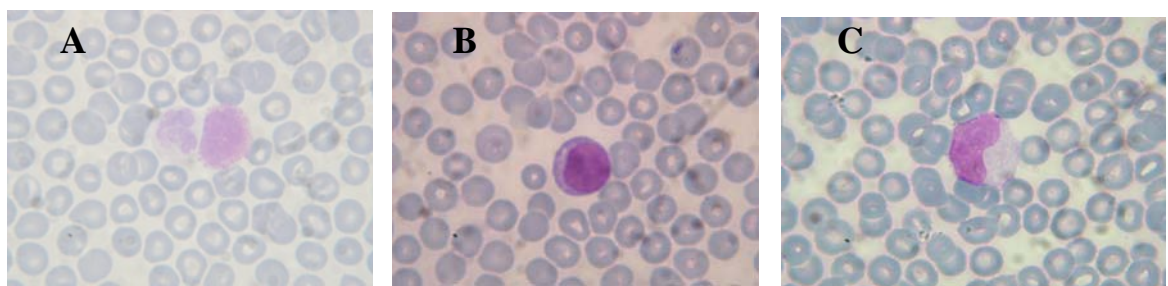
Durante el muestreo llevado a cabo en 2007 también se determinó otro indicador conocido de estrés, la razón neutrófilos a linfocitos (N:L) en sangre, durante las distintas estaciones. Los factores de estrés puntal y crónicos producen un incremento en la cantidad de neutrófilos y una disminución en los linfocitos circulantes en sangre periférica, lo cual aumenta la razón N:L (Davis et al., 2008). De hecho, los perfiles de leucocitos son considerados particularmente útiles en el campo de la biología de la conservación debido a que pueden ser relacionados directamente con las hormonas que responden a estrés, como los GCs. En este sentido, el estrés produce incrementos en la razón N:L que son proporcionales a la secreción de GCs (Davis et al., 2008). Por este motivo, el cálculo de la razón N:L puede ser utilizado para discernir si las variaciones estacionales en los niveles de GCs son debidas a estrés o reflejan solo cambios en los niveles basales de estas hormonas. En *C. talarum*, la razón N:L varía entre 0,1-1,5 en animales no disturbados en cautiverio, luego de que aclimatan a las condiciones del laboratorio (Capítulo II). Cuando los animales son sometidos a estresores puntuales la razón N:L aumenta hasta 2,5-3, alcanzando valores de hasta 6 en condiciones de estrés crónico (aclimación al cautiverio, restricción de alimento, ver Capítulo II). Cuando animales crónicamente estresados son sometidos a estrés puntal (inmovilización) la razón N:L puede aumentar hasta 10 (F. Vera, datos no publicados). Se prepararon extendidos de sangre en el campo luego de tomada la muestra de sangre, los cuales fueron fijados en metanol por 10 min. Luego de arribar al laboratorio fueron teñidos con solución May-Grunwald Giemsa y examinados bajo microscopio óptico a 1000 X. Se contaron todos los tipos celulares (linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos) hasta un total de 200 células (Fotografía 2). Los eosinófilos, basófilos y monocitos fueron raros, representando solo entre el 0,5-7,9 % de las células en los extendidos.



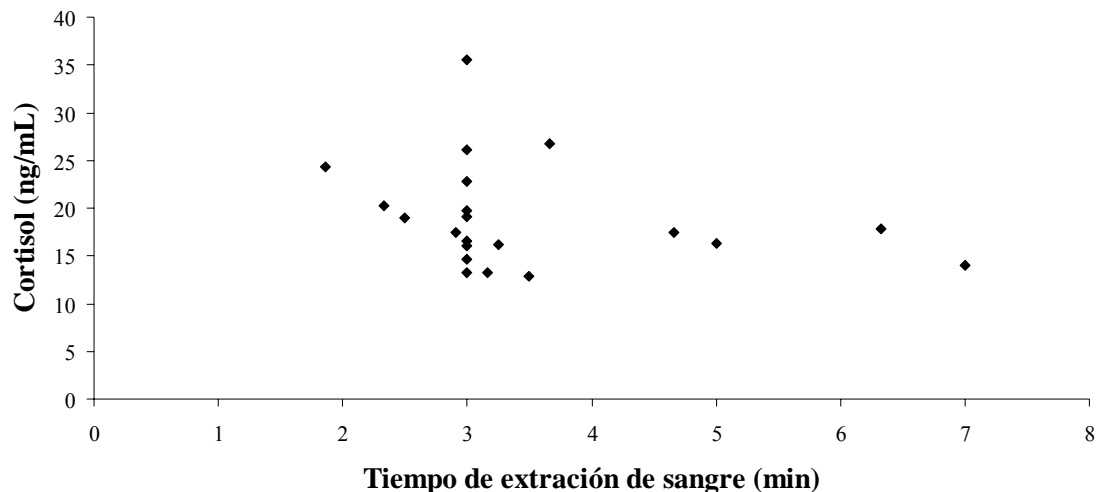
**Imagen 1:** Ubicación de la localidad de Mar de Cobo en la Provincia de Buenos Aires, Argentina (indicada con el punto rojo).



**Fotografía 1.** Montículos de arena removida por tucos-tucos en el campo.



**Fotografía 2:** Leucocitos: (A) Neutrófilo (izquierda) y eosinófilo (derecha). (B) Linfocito. (C) Monocito. Tomadas por R. Zenuto.



**Figura 1.** Relación entre la concentración de cortisol en plasma de individuos macho de *C. talarum* y el tiempo que se demoró en tomar las muestras de sangre en un estudio preliminar. Hasta los 7 min de iniciado el estrés no se producen cambios medibles en los niveles de cortisol.

## 2.2 Respuestas del cortisol y la corticosterona a estrés puntual

Para evaluar los roles del cortisol y la corticosterona en la respuesta a estrés puntual, un grupo de animales fue sometido a inmovilización en el laboratorio luego de 20 días de cautiverio. Los animales fueron firmemente sujetados durante 2 min en un aparato que consistió en dos grillas paralelas de alambre separadas por ~ 3,5 cm que impidió que realicen casi todo tipo de movimiento. Se obtuvieron muestras de sangre para la determinación de cortisol y corticosterona (en menos de 3 min) de individuos asignados a dos grupos 30 ó 60 min ( $n = 7$  y  $6$ , respectivamente) luego de la finalización del tratamiento de estrés y a un grupo control ( $n = 6$ ) que no fue disturbado antes de la extracción de sangre. Luego de la inmovilización los animales fueron retornados a sus cajas habituales hasta la toma de la muestra de sangre.

Además, se sometió a un grupo adicional de animales capturados durante ENR 2008 a 2 min de inmovilización en el campo inmediatamente luego de las capturas. Se obtuvieron muestras de sangre para la determinación de cortisol y corticosterona de dos grupos de animales 30 y 60 min luego de la inmovilización ( $n = 8$  cada grupo). Estos animales permanecieron en cajas de plástico individuales (25 cm x 32 cm x 42 cm) entre la inmovilización y la toma de las muestras de sangre (esto es, por 30 ó 60

min), por lo tanto los niveles de GC también podrían ser influenciados por el confinamiento dentro de las cajas de plástico luego de la manipulación y la captura. En este sentido, las cajas representan un ambiente desconocido y potencialmente riesgoso para animales recién capturados en el campo, los cuales intentaban cavar o subir las paredes de las mismas. Como controles se utilizaron los datos de cortisol y corticosterona de las 10 muestras de base tomadas dentro de los 3 min.

### *2.3 Respuesta del eje HPA al cautiverio*

Para evaluar la respuesta del eje HPA al cautiverio se llevó al laboratorio un grupo de machos capturados durante ENR 2008 (n = 12), los cuales fueron mantenidos en cautiverio durante 30 días. Los animales fueron alojados en cajas individuales de plástico (25 cm x 32 cm x 42 cm) provistas con viruta y alimentados *ad libitum* con una dieta compuesta por lechuga, batata, zanahoria y pastos mixtos. Debido a que *C. talarum* obtiene el agua de los vegetales que consume, no se proveyó de agua. El fotoperíodo y la temperatura fueron automáticamente controlados (12:12 L:D; 25 ± 1°C). Se obtuvieron muestras de sangre en el campo inmediatamente luego de las capturas y luego de transcurridos 10, 20 y 30 días en cautiverio para la determinación de las concentraciones de cortisol en plasma. Los animales fueron pesados en balanza analítica los mismos días en los que se tomaron las muestras de sangre.

### *2.4 Análisis hormonales*

Las muestras de plasma fueron enviadas al “Laboratorio de Alta Complejidad” (Dr. Daniel Samaruga) en Mar del Plata para la determinación de cortisol y corticosterona. El cortisol fue medido utilizando el procedimiento Coat-A-Count (*Siemens Medical Solutions Diagnostics*), que es un radioinmunoensayo de fase sólida (RIA, N° de catálogo TKCO1) en el cual cortisol marcado con <sup>125</sup>I compite con el cortisol en la muestra por sitios de unión a anticuerpos específicos. El kit utilizado tiene calibradores entre los 0 y 500 ng/mL (0, 10, 50, 100, 200 y 500 ng/mL). El límite de detección es de 2 ng/mL.

La corticosterona fue medida utilizando un kit de ELISA para rata (DSL-10-81100) provisto por Diagnostic Systems Laboratories, Webster, Texas, USA. El límite de detección de este ensayo es 1,6 ng/mL. Los calibradores del kit son: 0, 20, 50, 200,

500 y 2000 ng/mL. A las muestras de corticosterona que se encontraron por debajo del límite de detección (1,6 ng/mL) se les asignó este valor nominal para el tratamiento estadístico. Las reactividades de los anticuerpos de ambos ensayos con otras moléculas estructuralmente similares son muy bajas.

## 2.5 Validación de los ensayos

### 2.5.1 Cortisol

Se examinó el paralelismo entre la curva estándar del RIA de cortisol y diluciones seriadas de muestras de plasma. Debido a los niveles relativamente bajos de cortisol en *C. talarum* (ver *Resultados*), las muestras de plasma fueron analizadas previamente y, una vez conocida su concentración, fueron posteriormente diluidas con buffer PBS (PH 7) de manera de evitar la aproximación al límite de detección del ensayo. Además, con el fin de evaluar la exactitud del ensayo se determinaron los porcentajes de recuperación de cantidades conocidas de cortisol agregadas a muestras de plasma previamente al RIA. Se diluyeron 4 mg de cortisol (*Steraloids Inc*) en 4 mL de etanol absoluto y luego se realizaron diluciones seriadas con buffer PBS hasta obtener dos soluciones de cortisol de 61 y 127 ng/mL, respectivamente. Luego, se añadieron 20  $\mu$ L de estas soluciones (equivalentes a 2,22 y 2,54 ng de cortisol) a muestras de 40  $\mu$ L de plasma y se calcularon los porcentajes de recuperación considerando las concentraciones de cortisol medidas en alícuotas no enriquecidas de estas muestras.

### 2.5.2 Corticosterona

Debido a los bajos niveles de la hormona en relación a los estándares del kit (ver *Resultados*) se realizó en primera instancia el enriquecimiento de dos muestras de plasma de 90  $\mu$ L agregando 20  $\mu$ L del calibrador de 2000 ng/mL (equivalente a 40 ng de corticosterona). Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas de ambas muestras enriquecidas y se evaluó el paralelismo respecto de la curva estándar del ensayo. También para este ensayo se examinó la recuperación de corticosterona exógena por medio del agregado de 30  $\mu$ L del calibrador de 200 ng/mL del kit (equivalente a 6 de corticosterona) a 4 muestras de plasma (30  $\mu$ L). Los porcentajes de

recuperación se determinaron considerando los niveles de corticosterona medidos en alícuotas no enriquecidas de estas muestras.

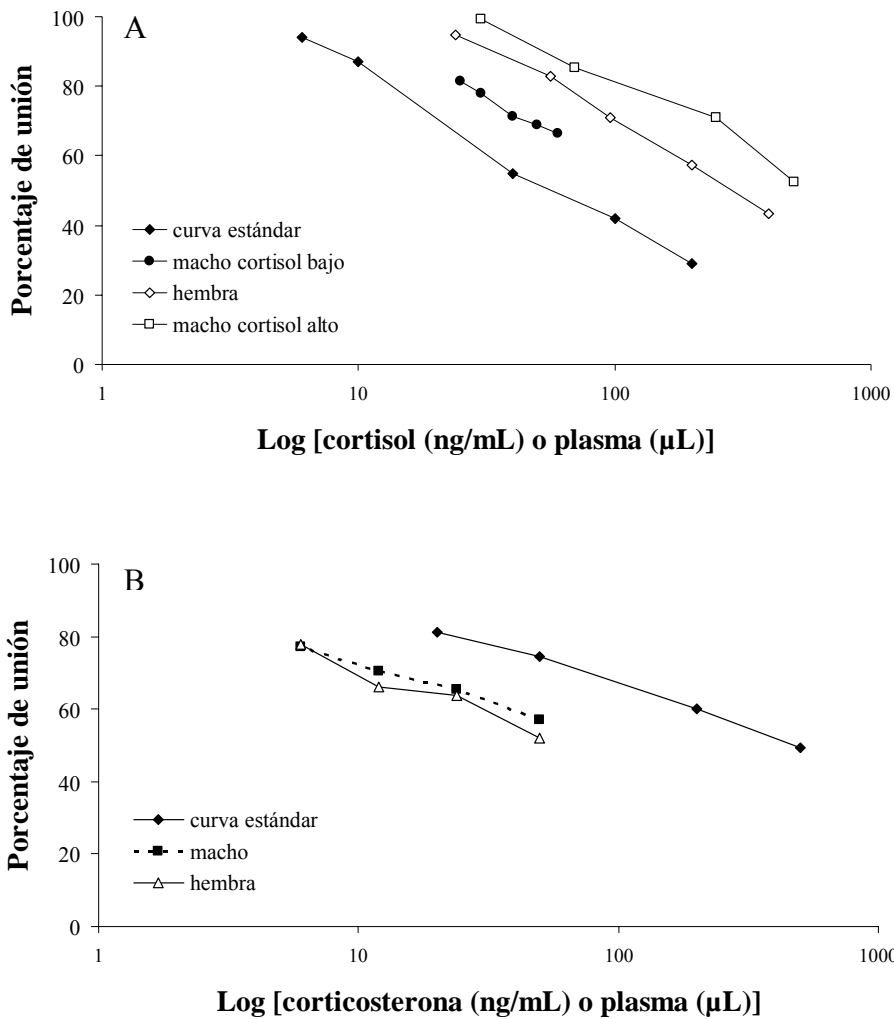
### *2.7 Análisis estadísticos*

Los datos fueron analizados utilizando ANOVA o la prueba de Kruskal-Wallis cuando los supuestos de la prueba paramétrica no se cumplieron. Se utilizaron las pruebas de Tukey o Dunn cuando se detectaron diferencias significativas. Para la comparación de 2 grupos de datos se utilizaron pruebas de *t* o la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Los niveles de cortisol y el peso corporal durante el período de 30 días en cautiverio fueron comparados utilizando ANOVA de medidas repetidas, seguido de una comparación múltiple por el método de Holm-Sidak cuando fue necesario. Se utilizaron pruebas *t* para igualdad de pendientes para evaluar el paralelismo entre las curvas de dilución de las muestras de plasma (transformación logarítmica) y la curva estándar (también con transformación logarítmica; Zar, 1984). Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar (ES).

## **3. Resultados**

### *3.1 Validación de ensayos*

Las diluciones seriadas de plasma produjeron curvas paralelas a la curva estándar del RIA de cortisol (pruebas *t* para igualdad de pendientes, macho con cortisol bajo:  $t = 0,75$ ;  $gl = 6$ ;  $p = 0,47$ ; macho con cortisol alto:  $t = 1,63$ ;  $gl = 5$ ;  $p = 0,16$ ; hembra:  $t = 0,35$ ;  $gl = 6$ ;  $p = 0,74$ ; Fig. 2A) y el ELISA de corticosterona (pruebas *t* para igualdad de pendientes, macho:  $t = 0,90$ ;  $gl = 4$ ;  $p = 0,42$ , hembra:  $t = 0,75$ ,  $gl = 4$ ,  $p = 0,49$ ; Fig. 2B).



**Figura 2.** Paralelismo del RIA de cortisol (A) y el ELISA de corticosterona (B).

Además, los porcentajes de recuperación en los ensayos de enriquecimiento fueron  $101.12 \pm 3.76$  % para el cortisol y  $94.6 \pm 5.2$  % para la corticosterona (Tablas 1 y 2). Tomados en conjunto, estos resultados muestran que no hay sustancias en el plasma que interfieran con estos ensayos y que el cortisol y la corticosterona pueden ser medidos directamente en muestras de plasma de *C. talarum* sin que sea necesario un paso previo de extracción (ver Newman et al., 2008). Además, las respuestas de cortisol a tratamientos de estrés puntual medidas en el presente capítulo y en los capítulos III y IV, como así también las respuestas a adrenocorticotropina (ACTH) registradas en el Capítulo IV, validan fisiológicamente el ensayo utilizado para el caso del cortisol.

**Tabla 1.** Porcentajes de recuperación de cortisol agregado a muestras de plasma de *C. talarum* previamente al RIA. Las muestras 1-4 fueron enriquecidas con una solución de 61 ng/mL de cortisol, mientras que las muestras 5-8 con una solución conteniendo 127 ng/mL de cortisol.

Muestra	Cortisol (ng/mL)	Esperado (ng/mL)	Observado (ng/mL)	Recuperación (%)
1	21	34,3	34	99
2	16	31	31	100
3	20,4	31,2	34,8	111
4	17,3	28,9	32,3	112
5	42,5	70,6	69,5	98
6	17,5	54	61,5	114
7	21	56,3	51	91
8	24	58,3	49	84

**Tabla 2.** Porcentajes de recuperación de corticosterona agregada a muestras de plasma de *C. talarum* previamente al ELISA.

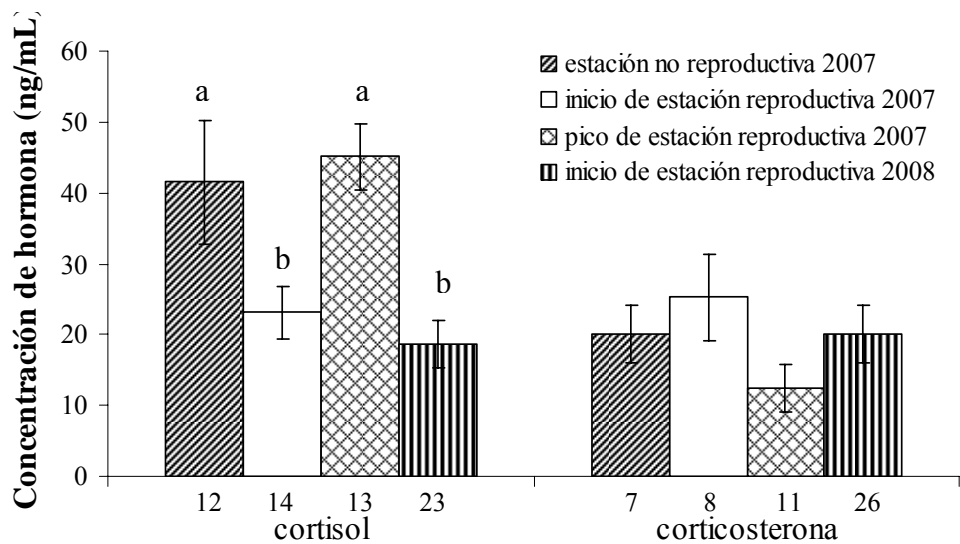
Muestra	Corticosterona (ng/mL)	Esperado (ng/mL)	Observado (ng/mL)	Recuperación (%)
1	30,2	115,1	105,1	91
2	19,8	109,9	120,7	110
3	30,8	115,4	105,1	91
4	17,6	108,8	93,6	86

### 3.2 Variaciones del cortisol y la corticosterona en campo y en cautiverio

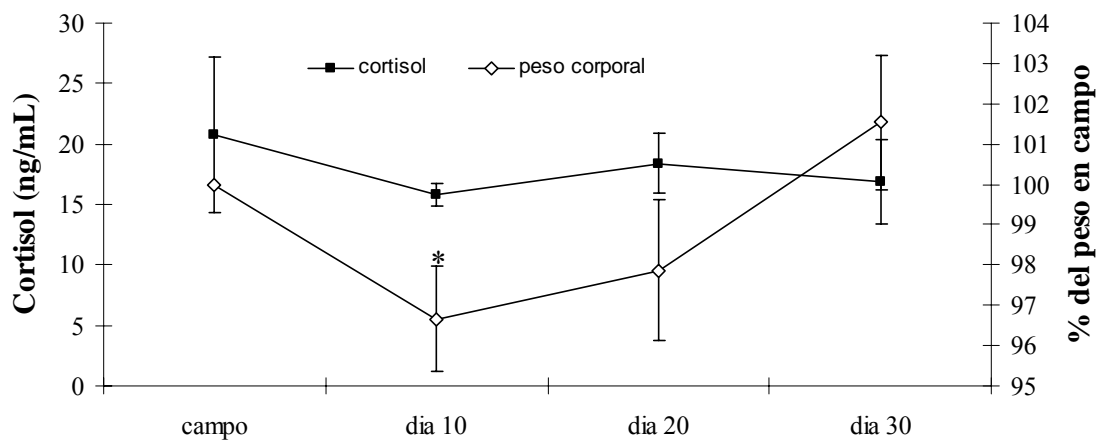
No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de cortisol en muestras tomadas dentro de los 3 min de captura y aquellas tomadas de animales que permanecieron por 5 o 20 min dentro de las trampas antes de la extracción de sangre ( $< 3$  min =  $20,15 \pm 7,36$  ng/mL; 5 min =  $15,40 \pm 0,92$  ng/mL; 20 min =  $18,97 \pm 3,51$  ng/mL; Kruskal-Wallis:  $H = 0,85$ ;  $p = 0,65$ ). Esto indicó que el confinamiento de los animales dentro de las trampas no produjo cambios medibles en los niveles de cortisol que pudieran enmascarar las variaciones estacionales, a los tiempos en los cuales se lograron las extracciones de sangre.

Los niveles de cortisol y corticosterona fueron similares en el campo a lo largo del ciclo reproductivo, aunque la corticosterona se encontró por debajo del límite de detección en 5 de 26 muestras analizadas (1 para ENR y IER y 3 para PER), mientras que el cortisol se encontró por encima del límite de detección en todas las muestras. Las concentraciones de cortisol en plasma mostraron variación estacional con valores significativamente más bajos en IER en comparación con ENR y PER (Kruskal-Wallis:  $H = 13,07$ ;  $p = 0,001$ ; Dunn:  $p < 0,05$ ; Fig. 3). En cambio, la corticosterona no mostró variaciones significativas a lo largo del año (ANOVA:  $F_{23, 25} = 2,22$ ;  $p = 0,13$ ; Fig. 3). Las relaciones cortisol/corticosterona calculadas a partir de las concentraciones medias de cada estación fueron 2,06; 0,91 y 3,62 para ENR, IER y PER, respectivamente. La razón N:L permaneció consistentemente en valores bajos, típicos de ausencia de estrés, a lo largo de todo el ciclo reproductivo y no se registraron variaciones significativas entre estaciones (ANOVA:  $F_{31,33} = 0,61$ ;  $p = 0,55$ ; Tabla 3). Las concentraciones de cortisol fueron significativamente más bajas durante ENR 2008 que en ENR 2007 (ENR 2007 =  $41,5 \pm 8,78$  ng/mL; ENR 2008 =  $18,69 \pm 3,37$  ng/mL; muestras agrupadas;  $n=23$ ; Mann-Whitney:  $p < 0,001$ ; Fig. 3). En cambio, los niveles de corticosterona no difirieron entre ENR 2007 y ENR 2008 (ENR 2007 =  $20,13 \pm 4,08$  ng/mL; ENR 2008 =  $17,04 \pm 1,78$  ng/mL;  $t = 0,78$ ;  $p = 0,44$ ; Fig. 3).

Las concentraciones de cortisol no mostraron variaciones significativas durante los 30 días de cautiverio en relación a los valores de campo (ANOVA de medidas repetidas no paramétrico:  $\text{Chi}^2 = 2,75$ ;  $\text{gl} = 3$ ;  $p = 0,43$ ; Fig. 4). Los animales mostraron una disminución significativa en el peso corporal al día 10 en cautiverio, recuperándose nuevamente a los días 20 y 30 (ANOVA de medidas repetidas:  $F_{32,46} = 3,92$ ;  $P = 0,018$ ; Holm-Sidak:  $p < 0,05$ ; Fig. 4).



**Figura 3.** Variaciones estacionales en los niveles de cortisol y corticosterona en plasma en individuos macho de *C. talarum*. Letras diferentes indican diferencias significativas para el cortisol ( $p < 0,05$ ), mientras que no se observaron diferencias para la corticosterona. El número de muestras se indica en la base de cada barra.



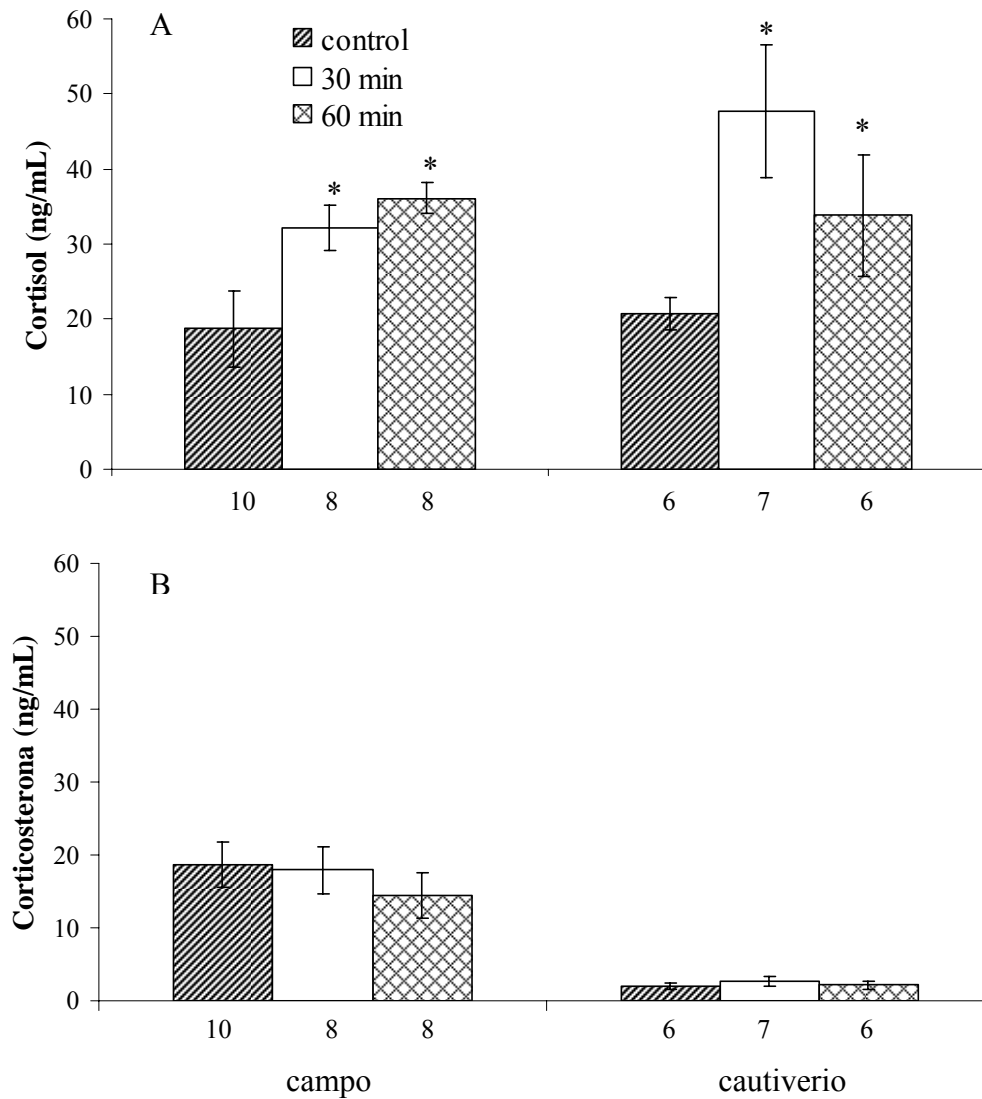
**Figura 4.** Variaciones en los niveles de cortisol en plasma y en el peso corporal en individuos macho de *C. talarum* mantenidos durante 30 días en condiciones de cautiverio,  $n = 12$ . \* indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 3.** Razón N:L (promedio  $\pm$  ES) en animales capturados en diferentes momentos del ciclo reproductivo. El número de muestras se indica entre paréntesis.

	Razón N:L
Estación no reproductiva	0,51 $\pm$ 0,13 (8)
Inicio estación reproductiva	0,53 $\pm$ 0,05 (13)
Pico estación reproductiva	0,40 $\pm$ 0,11 (13)

### 3.3 Respuestas del cortisol y la corticosterona a estrés puntual

Como se esperaba, las concentraciones de cortisol se incrementaron significativamente a los 30 min en animales sometidos a inmovilización tanto en cautiverio (ANOVA:  $F_{15,17} = 3,69$ ;  $p = 0,05$ ; Tukey:  $p < 0,05$ ) como en el campo (Kruskall-Wallis:  $H = 15,24$ ;  $p < 0,001$ ; Dunn:  $p < 0,05$ ; Fig. 5A). En contraste, los niveles de corticosterona no se vieron afectados en animales sometidos a inmovilización en el campo (ANOVA:  $F_{21,23} = 0,54$ ;  $p=0,59$ ; Fig. 5B). Este resultado es particularmente interesante teniendo en cuenta que varios factores estresantes se encontraban operando en estos individuos previamente a la toma de las muestras de sangre (ver Materiales y Métodos). Los niveles de corticosterona en individuos cautivos se encontraron por debajo del límite de detección en 14 de las 19 muestras analizadas, incluyendo tanto animales controles como estresados. Al asignar a estas muestras el valor de 1,6 ng/mL (límite de detección del ELISA) se obtuvieron concentraciones medias de corticosterona menores a 3 ng/mL (Fig. 5B). Por lo tanto, este resultado indicó un efecto supresor del cautiverio sobre los niveles de corticosterona.



**Figura 5.** Respuestas diferenciales del cortisol (A) y la corticosterona (B) a estrés puntual y condiciones de cautiverio en machos de *C. talarum*. Los animales fueron sometidos a inmovilización durante 2 min en el laboratorio o en el campo, inmediatamente después de las capturas y luego de 30 y 60 min se obtuvieron muestras de sangre para la determinación de los niveles de hormonas. Los animales controles no fueron sometidos a inmovilización. El número de muestras se indica en la base de cada barra. \* indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en animales inmovilizados en relación a sus respectivos controles.

## 4. Discusión

### 4.1 Variaciones en los niveles de GCs en condiciones naturales

Los machos silvestres de *C. talarum* mostraron variaciones en los niveles plasmáticos de cortisol, pero no de corticosterona, a lo largo del ciclo reproductivo. Por otro lado, la evaluación de los niveles de GCs en animales cautivos indicó un marcado efecto supresor del cautiverio sobre la corticosterona, pero no se registró este efecto sobre el cortisol. Finalmente, el estrés puntual (inmovilización) incrementó los niveles de cortisol en animales silvestres y cautivos pero no afectó los niveles de corticosterona. Así, ambos GCs mostraron patrones de variación marcadamente diferentes en todos los aspectos que fueron evaluados en nuestra especie de estudio.

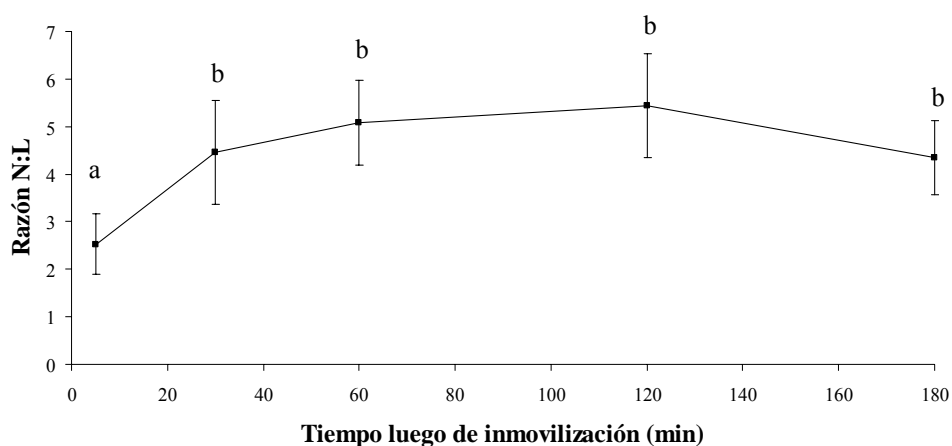
Los diferentes patrones de variación estacional de cortisol y corticosterona en tucos-tucos silvestres sugieren que bajo condiciones naturales ambas hormonas son diferencialmente afectadas por estímulos ambientales, o que son sujetas a diferente regulación endógena de su secreción estacional. Diferentes patrones de variación estacional para ambos GCs han sido reportados para ardillas de tierra *Spermophilus saturatus* (Boswell et al., 1994), aunque en ardillas *Tamias amoenus* el cortisol y la corticosterona mostraron variaciones estacionales similares (Kenagy y Place, 2000; Place y Kenagy, 2000). Por lo tanto, no solamente es variable entre especies el período del ciclo reproductivo en el cual los GCs alcanzan sus valores más elevados (Romero, 2002) si no que también las variaciones estacionales del cortisol y la corticosterona pueden coincidir o mostrar patrones distintos, dependiendo de la especie.

Para interpretar los cambios estacionales en los niveles de cortisol dos resultados importantes son: (1) la falta de efecto del trampeo a los tiempos a los cuales se lograron las capturas y extracciones de muestras de sangre y (2) los bajos valores registrados en la razón N:L durante todas las estaciones del año. No se encontraron diferencias en los niveles de cortisol entre muestras de sangre obtenidas dentro de los 3 min de captura y luego de 5 ó 20 min de permanencia en las trampas, lo que indica que se midieron niveles de hormonas característicos de animales no disturbados (llamados frecuentemente niveles “de base”). La expresión “de base” se utiliza en lugar de “basal” debido a que, en general, se desconocen las actividades realizadas por los animales antes de las capturas, por lo que no se puede descartar la existencia de estresores previos a la captura que afecten los niveles de GCs (Romero, 2004). Sin

embargo, los datos de la razón N:L indican que los animales no se encontraban estresados en el campo, enfatizando que el nicho subterráneo realmente provee protección frente a factores de estrés físicos y biológicos. Valores tan consistentemente bajos en la razón N:L no se observan en tuco-tucos durante estados de estrés (ver *Materiales y Métodos*). Asimismo, aunque los niveles de cortisol no difirieron entre el día 10 de cautiverio en relación a los valores de campo (Fig. 4), la razón N:L permaneció más elevada en animales cautivos al día 10 en relación a los valores de campo (Capítulo II), lo cual indica que los conteos de leucocitos son indicadores sensibles de estrés en la especie. Debido a esto, estos datos indican que se pudieron medir variaciones estacionales en los niveles de GCs no producidas por estrés (estrictamente niveles basales). Datos previos tomados en condición de cautiverio muestran que los incrementos en la razón N:L ocurren rápidamente luego de un factor de estrés puntual (30 min, Fig. 6). Por lo tanto, para que un factor de estrés que esté operando en el campo afecte los niveles de cortisol pero no la razón N:L, debe tener lugar unos pocos minutos antes de la captura, lo cual lo hace improbable. Este es, probablemente, el primer estudio que determina variaciones conjuntas en los niveles de GCs y perfiles de leucocitos para discriminar entre variaciones basales e inducidas por estresores en los niveles de GCs. Aunque las células del sistema inmune pueden también mostrar variaciones estacionales (no es el caso de nuestros datos de la razón N:L, Hussein et al., 2005), el conteo de monocitos, basófilos y eosinófilos puede ayudar a distinguir las respuestas de leucocitos producidas por estresores de aquellas causadas por infección (Davis et al., 2008).

Los datos muestran que se producen también variaciones inter-anales en los niveles totales de cortisol, ya que los individuos capturados durante ENR 2008 tuvieron niveles más bajos que los capturados durante la misma estación en el año anterior. De hecho, los niveles de cortisol en animales sometidos a inmovilización en el campo durante ENR 2008 fueron similares a los niveles basales durante ENR 2007 (Fig. 3 y 5), lo cual implica que las concentraciones de cortisol en condiciones de estrés también difirieron entre estas estaciones. Cambios estacionales en los niveles basales y de estrés de GCs han sido reportados en otras especies de vertebrados (Romero, 2002). La determinación de niveles de cortisol libre (no unido a la globulina de unión a glucocorticoides, *CBG*) podría clarificar estas diferencias en los niveles basales y de estrés de GCs entre estaciones. En este sentido, se sabe que la mayor parte de los GCs son transportados en plasma unidos a esta glicoproteína (Rosner, 1990;

Breuner y Orchinik, 2000). En general, se considera que solo la fracción no unida a CBG se encuentra biodisponible para interactuar con los receptores en tejidos (*hipótesis de hormona libre*, Rosner 1990), aunque las globulinas pueden regular localmente también la disponibilidad de cortisol, interactuar con receptores celulares y ser incluso internalizadas por células (Breuner y Orchinik, 2000). Más allá de esto, se considera que los niveles de GCs libres son un mejor indicador de la disponibilidad de hormona biológicamente activa que los niveles totales (Rosner, 1990; Delehanty y Boonstra, 2009).



**Figura 6.** Variaciones la razón N:L en animales sometidos a inmovilización durante 2 minutos en el laboratorio,  $n = 7$ . Letras diferentes indican diferencias significativas. ANOVA de medidas repetidas:  $F_{24,34} = 2,88$ ;  $p = 0,044$ , Holm-Sidak:  $p < 0,05$ .

#### 4.2 Respuestas del cortisol y la corticosterona a estrés puntual

Los tratamientos de inmovilización realizados en el campo y en el laboratorio muestran que solo el cortisol responde a estrés puntual en esta especie. La falta de respuesta de la corticosterona en individuos inmovilizados en el campo sugiere fuertemente que la hormona no presenta un rol típico para un GC, ya que estos animales fueron sometidos a múltiples factores de estrés que podían afectar sus niveles de corticosterona a los 30 y 60 min. Los mismos incluyen la remoción de sus cuevas con la subsiguiente manipulación, el tratamiento de inmovilización y el confinamiento en las cajas de plástico (ver Materiales y Métodos). Por lo tanto, es muy factible que la corticosterona tampoco responda a factores de estrés naturales como agresión

intraespecífica o el ataque de un predador. Este es el primer estudio en reportar respuestas tan contrastantes de ambos GCs a estrés puntual en una especie. En ardillas *Tamias amoenus*, ambos GCs respondieron positivamente al estrés de la captura y manipulación en el campo (Place y Kenagy, 2000; Kenagy y Place, 2000, Romero et al., 2008), aunque en la especie *Spermophilus saturatus* la corticosterona respondió proporcionalmente menos que el cortisol (Romero et al., 2008). Por lo tanto, no debería asumirse que ambos GC, en caso de que estén presentes, siempre responden positivamente a estresores. Al contrario, esto debería ser evaluado experimentalmente antes de interpretarse los datos sobre niveles de GCs en especies silvestres. Desde un punto de vista fisiológico, los resultados sugieren que el cortisol presentaría una mayor sensibilidad que la corticosterona a adrenocorticotropina (ACTH). Probablemente, la corticosterona no responda en absoluto a niveles fisiológicos de ACTH en *C. talarum*, lo cual explicaría su falta de respuesta a estresores puntuales.

#### 4.3 Efectos del cautiverio sobre los niveles del cortisol y la corticosterona en plasma

En el laboratorio, la disminución en los niveles de corticosterona fue robusta ya que la mayoría de las muestras se encontraron debajo del límite de detección del ensayo, incluyendo animales controles y estresados (Fig. 5). Las causas de este resultado merecen ser objeto de estudios futuros y podrían clarificar el rol de esta hormona en tuco-tucos. Una posibilidad es que la corticosterona cumpla un rol importante en la regulación del consumo de alimento. Trabajos previos demuestran que los GCs pueden actuar a nivel de los mecanismos centrales de regulación del apetito y estimular el consumo de alimento en roedores y vertebrados en general (Nicholson et al., 2002; Fleur, 2006). Dado que los animales fueron alimentados *ad libitum* durante su permanencia en el laboratorio (asumimos, por lo tanto, que se encontraban saciados) se sugiere que la secreción de corticosterona puede haberse inhibido de tal manera de moderar el consumo de alimento en estas condiciones. Otra posibilidad es que la corticosterona funcione principalmente como un complemento de la aldosterona en el balance de los fluidos corporales (es decir que funcione como un mineralocorticoide, Agarwal y Mirshahi, 1999). Ambas posibilidades merecen ser experimentalmente evaluadas en el futuro.

Probablemente, la falta de efecto del cautiverio sobre los niveles de cortisol se deba a que los animales se encontraban aclimatados al momento del muestreo (día 10

en cautiverio). Los animales arriban al laboratorio con la razón N:L incrementada 5 veces respecto de los valores de campo, lo que muestra una respuesta de estrés muy fuerte al transporte (Capítulo II). Luego la razón N:L disminuye gradualmente hasta el día 10. Dada la relación directa entre los niveles de GCs y la razón N:L (Davis et al., 2008), estos datos sugieren que el cortisol se comportaría de manera similar durante este período, permaneciendo estable posteriormente (Fig. 4). En coincidencia, los animales mostraron una disminución significativa en el peso corporal al día 10 (~ 3.4 %), incrementándose nuevamente a los días 20 y 30 en cautiverio. Tomados en conjunto, estos datos indican que el estrés es importante durante los primeros días de cautiverio y que alrededor del día 10 los animales se aclimatan a las condiciones del laboratorio.

#### 4.4 Niveles de GCs en tuco-tucos y otras especies de roedores

Las concentraciones de GCs en tuco-tucos fueron bajas en comparación con otras especies estudiadas al momento tales como ardillas *Spermophilus parryii* (Boonstra et al., 2001), *Tamiasciurus hudsonicus* (Boonstra y McColl, 2000), *Tamias amoenus* (Kenagy y Place, 2000; Place y Kenagy, 2000), chanchitos de guinea (Künzl et al., 2003), el Degu (*Octodon degus*, Soto-Gamboa et al., 2005), ratón rayado *Rhabdomys pumilio* (Schradin, 2008) y lemingos (*Lemmus trimucronatus*, Romero et al., 2008), aunque similares ardillas de tierra *Spermophilus beldingi* (Nunes et al., 2006). Niveles más bajos de GCs fueron reportados para hamsters juveniles *Mesocricetus auratus* y recientemente para hembras del tuco-tuco colonial *Ctenomys sociabilis* nacidas en cautiverio (Woodruff et al., 2010). Existe un importante grado de variación en los niveles de GCs en especies de roedores y los dos estudios en *Ctenomys* se encuentran en el extremo inferior de dicho rango (Woodruff et al., 2010; este trabajo). Es posible que otros rasgos, como los niveles de CBG y la sensibilidad de los tejidos blanco (numero y afinidad de sus receptores), difieran entre especies y compensen, al menos en parte, las variaciones en los niveles de GCs. Es interesante también que el cortisol y la corticosterona se encontraron en cantidades comparables en muestras de plasma tomadas en campo, lo cual contrasta con estudios previos en otras especies de roedores que presentan marcadas diferencias en los niveles de ambas hormonas (Kenagy y Place, 2000; Place y Kenagy, 2000; Boonstra et al, 2001; Romero et al., 2008). Al presente, las razones del enorme rango de concentraciones de

GCs que existe entre especies de mamíferos permanecen pobremente entendidas (Romero et al., 2008).

#### 4.5 No efecto del trapeo

La falta de efecto del trapeo sobre los niveles de cortisol es un resultado sorprendente, pero interesante. De estudios recientemente llevados a cabo en mamíferos silvestres se evidencia que el efecto del trapeo en los niveles de GCs varia entre especies y dependiendo de las características de la técnica de trapeo utilizada. Por ej., mientras que las ardillas de tierra del Ártico respondieron al estrés de la captura solamente incrementando la secreción de cortisol (Boonstra et al., 2001), las ardillas de tierra de Richardson (cercanas evolutivamente) mostraron una disminución rápida en los niveles de CBG que permitió una respuesta mucho más pronunciada (Delehanty y Boonstra, 2009). Más aún, en ardillas de tierra del género *Spermophilus* las hembras incrementaron los niveles de GCs en respuesta al trapeo pero los machos no (Nunes et al., 2006). Fletcher y Boonstra (2006) no encontraron correlación entre los niveles de corticosterona y el tiempo de permanencia dentro de trampas de captura viva en ratones de campo *Microtus pennsylvanicus* (desde 2 hasta 16 hs), aunque el trapeo incrementó los niveles de GCs en relación a animales sacrificados instantáneamente. Es importante destacar que en el presente estudio el efecto evaluado fue solo el de permanecer en el interior de las trampas hasta 20 min (Ver Materiales y Métodos), ya que luego de la remoción de las trampas de los túneles se procedió con rapidez para tomar las muestras de sangre. Además, las trampas se dispusieron por debajo de la superficie del suelo conectadas a los túneles de las cuevas, lo que podría reducir el riesgo percibido de permanecer dentro de las mismas. Probablemente, la permanencia dentro de las trampas por períodos más prolongados produciría una respuesta medible del eje HPA en tuco-tucos.

#### 4.6 Conclusiones

Las principales contribuciones de este trabajo son: (1) al presente se encuentra bastante expandida la idea de que los roles fisiológicos del cortisol y la corticosterona se solapan en gran medida. Nuestros resultados muestran que el cortisol y la corticosterona son diferencialmente afectados por estímulos ambientales en tuco-tucos,

mostrando diferentes patrones de variación estacional en el campo y cautiverio y una respuesta diferente a estrés puntual. Esto sugiere que los roles fisiológicos de ambas hormonas se encuentran diferenciados. Por este motivo, este estudio sitúa a los tuco-tucos como un modelo interesante para el estudio del HPA en mamíferos. (2) Se registraron variaciones conjuntas en niveles de GCs y proporciones de leucocitos para discriminar si las variaciones estacionales en los niveles de GCs son explicadas por estrés o reflejan cambios en las concentraciones basales. Aunque las causas subyacentes a los cambios estacionales en los niveles de GCs son difíciles de entender, estos datos contribuyen a esta cuestión mostrando que los niveles estrictamente basales – a diferencia de niveles de base- pueden mostrar variación estacional en poblaciones naturales. (3) Los presentes datos enfatizan aún más el importante grado de variabilidad y complejidad de la fisiología de los GCs en mamíferos que ya han señalado Romero y colaboradores (2008), lo cual indica que este campo de estudio tiene aún mucho por ser explorado.

## Capítulo II

Respuesta de la glucosa en sangre frente a estresores puntuales y crónicos. Capacidad de regulación de los niveles de glucosa en sangre en el roedor subterráneo *Ctenomys talarum*.

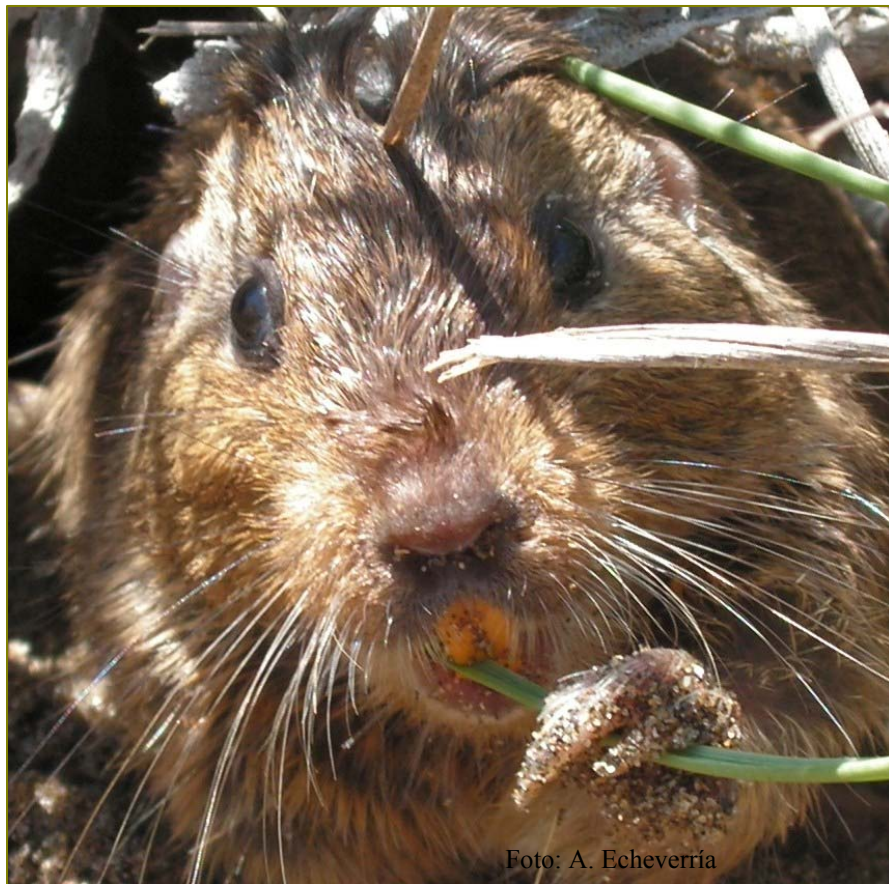


Foto: A. Echeverría

La mayor parte de los resultados presentados en este capítulo han sido publicados como: Vera, F., Zenuto, R., Antenucci, C.D., 2008. Decreased glucose tolerance but normal blood glucose levels in the field in the caviomorph rodent *Ctenomys talarum*: the role of stress and physical activity. *Comp. Biochem. Physiol.* 151, 232-238.

## 1. Introducción

La concentración de glucosa en sangre es finamente regulada en mamíferos debido a su rol central en el mantenimiento de la homeostasis. Si bien hay numerosas hormonas que, directa o indirectamente, influyen los niveles de glucosa en sangre, el balance se lleva a cabo principalmente a partir de dos hormonas que ejercen efectos opuestos: la insulina y el glucagón. La insulina es una molécula altamente conservada entre los mamíferos (Chan y Steiner, 2000; Conlon, 2001). Sin embargo, los roedores hystricomorfos constituyen una excepción (Conlon, 2001) presentando insulinas con numerosas sustituciones de amino ácidos. Las mismas afectan las propiedades fisiológicas de la hormona, resultando en una actividad biológica de solo 1-10 % en relación a mamíferos no hystricomorfos (King y Kahn, 1981). Las insulinas de hystricomorfos presentan también cambios en sus propiedades inmunológicas y una mayor actividad relacionada a la promoción del crecimiento (Zimmerman et al., 1974; King y Kahn, 1981). En este sentido, la menor actividad de las insulinas de hystricomorfos estaría vinculada con la adquisición de una función alternativa, ya que es capaz de unirse al receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), a diferencia de las insulinas de mamíferos no hystricomorfos (King et al., 1983).

A pesar de estas peculiaridades, casi todos los roedores hystricomorfos estudiados a la fecha han regulado sus niveles de glucosa en sangre en pruebas de tolerancia a glucosa tan eficientemente como lo hacen mamíferos no-hystricomorfos (Opazo et al., 2004). La única excepción a la fecha la constituye la rata desnuda *Heterocephalus glaber*, la cual presentó tolerancia reducida a la glucosa, similar a lo que ocurre en la *diabetes mellitus* (Kramer y Buffenstein, 2004). De esta forma, se ha reportado para algunos miembros de este grupo el desarrollo de mecanismos compensatorios que les permiten mantener concentraciones estándares de glucosa en sangre, a pesar de la baja actividad de sus insulinas. Entre los rasgos compensatorios propuestos se encuentran incrementos en las concentraciones de insulina, menores tasas de degradación de la insulina (Zimmerman et al., 1974), incrementos en el número de receptores de insulina (Muggeo et al., 1979; Dufty et al., 2002) y cambios en la estructura de los mismos (Opazo et al., 2004).

Los efectos del estrés sobre los niveles de glucosa en sangre no han sido evaluados en hystricomorfos. El estrés produce un efecto hiperglucémico a través de la activación del sistema nervioso simpático y el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal

(HPA), lo cual conduce a la movilización de reservas de glucógeno en hígado y músculo y la estimulación de la gluconeogénesis en hígado, entre otros efectos (Boonstra, 2005). Asimismo, se ha demostrado que el estrés puede producir complicaciones en la regulación de la glucosa en pacientes que presentan una tolerancia disminuida a la misma (Inui et al., 1998; Surwit et al., 2002). De esta forma, los hystricomorfos podrían ser particularmente susceptibles a los efectos de estresores sobre los niveles de glucosa en sangre.

*Ctenomys talarum* es un roedor subterráneo herbívoro que constituye un modelo interesante para abordar la temática previamente mencionada. Los miembros de la Familia Ctenomyidae merecen especial atención debido a que muestran diferencias en la molécula de insulina en comparación con otras especies de hystricomorfos: la cadena A presenta una inserción de dos amino-ácidos y la cadena B exhibe la deleción de una fenilalanina (Nishi y Steiner, 1990). Los tuco-tucos participan de interacciones sociales agonísticas con coespecíficos las cuales pueden llegar a ser altamente agresivas y producir perjuicio físico (Zenuto et al., 2002). Además, pueden quedar expuestos a estresores como ataques de predadores (Busch et al., 2000) y fluctuaciones de temperatura cuando emergen de sus túneles para actividades como forrajeo y dispersión (Malizia et al, 1991). De esta forma, la capacidad de regular sus niveles de glucosa en sangre durante situaciones estresantes puede tener una importancia clave para la homeostasis de la glucosa. Por otro lado, la determinación de los niveles de glucosa en sangre podría ser potencialmente utilizada para evaluar niveles de estrés (ver Zuri et al., 1998), ya que presenta la ventaja de ser menos invasiva que las determinaciones de hormonas debido a los volúmenes de sangre requeridos (apenas 2-4  $\mu$ L) y menor costo económico para el investigador. Sin embargo, dadas las particularidades de la insulina de este grupo de roedores, el comportamiento de la glucemia en condiciones de estrés debe ser evaluado en primera instancia a fin de determinarse si se trata de un indicador fiable de estrés.

Finalmente, estos animales constituyen un modelo particular para evaluar otros aspectos directamente vinculados con la regulación de la glucemia. Dos aspectos que no se han estudiado en hystricomorfos son el efecto de la actividad física y el consumo de diferentes dietas sobre los niveles de glucosa en sangre. Se sabe que la actividad contráctil *per se* estimula el ingreso de glucosa a la célula muscular, incluso en ausencia de insulina, al inducir la translocación del transportador de glucosa GLUT4 desde un pool intracelular a la membrana plasmática (Hayashi et al., 1997; Bryant et

al., 2002; Holloszy, 2003). De esta forma, la actividad contráctil produce un efecto similar al de la insulina por lo que, potencialmente, podría constituir otro mecanismo compensatorio en la regulación de la glucemia para este grupo de roedores. Los tuco-tucos son altamente activos, moviéndose 180 metros por día en sistemas artificiales de cuevas (Luna y Antinuchi, 2003) y también remueven cantidades considerables de arena durante sus actividades diarias (Malizia et al., 2000). Por otro lado, en el campo, la disponibilidad de pastos puede mostrar variaciones importantes a lo largo del año (Fanjul et al., 2006).

Los objetivos de este trabajo consistieron en: (1) evaluar la capacidad de *Ctenomys talarum* de regular sus niveles de glucosa en sangre, (2) registrar los cambios en la glucemia producidos por estrés puntual y crónico para evaluar hasta que punto los estresores pueden ocasionar problemas en la regulación de la glucosa en la especie y si la glucemia puede ser utilizada como indicador de estrés, (3) evaluar el rol de la actividad física (locomoción y excavación) como posible mecanismo compensatorio y (4) evaluar en, condiciones de cautiverio, el efecto de diferentes regímenes alimentarios sobre los niveles de glucosa en sangre y los niveles de estrés de los animales.

Hipótesis: Debido al rol central que representa la glucosa en el control de la homeostasis, los individuos de *C. talarum* presentan una buena capacidad de regulación de la misma. Sin embargo, dado el rol múltiple de la insulina en hystricomorfos, acompañada por cambios en su estructura, se predice que los individuos de *C. talarum* pueden presentar desempeños sub-óptimos en la regulación de la glucemia frente a algunos desafíos tales como estresores puntuales y crónicos. Finalmente, se propone que la actividad física puede contribuir en la regulación de la glucosa.

## **2. Materiales y Métodos**

### *2.1 Regulación de la glucemia: prueba de tolerancia a glucosa*

Se capturaron 9 individuos macho de *C. talarum* en la localidad de Mar de Cobo durante la estación reproductiva de 2006, los cuales fueron trasladados al laboratorio donde permanecieron en aclimatación a las condiciones del cautiverio descritas en el Capítulo I durante 1 semana. Para evaluar la capacidad de regular los

niveles de glucosa en sangre se llevó a cabo una prueba de tolerancia de glucosa (PTG). Luego de 15 h de ayuno se administró por vía oral a los 9 individuos 1 mL de una solución sobresaturada conteniendo 0,7 g de glucosa, dosis previamente usada por Opazo et al. (2004) con otras especies de roedores hystricomorfos. Para el peso corporal promedio de los animales utilizados en la prueba ( $151,75 \text{ g} \pm 15,06 \text{ SD}$ ), esto fue equivalente a una dosis de 4,6 g/kg peso corporal, aproximadamente. Posteriormente, se obtuvieron muestras de sangre ( $\sim 4 \mu\text{L}$ ) haciendo un pequeño corte en la punta de la cola y se determinó la concentración de glucosa utilizando el medidor de glucosa Accu-Chek Active® luego de 30, 60, 90, 120 y 180 min de administrada la solución de glucosa. Este sistema tiene un rango de medición de 0,6-33,3 mmol/L con una precisión comparable al método de referencia de la hexokinasa (menos de 3% de error). La manipulación de los animales para las determinaciones de glucosa no tomó más de 30 segundos. El último tiempo de muestreo (180 min) fue añadido durante el curso de la prueba porque algunos individuos aún presentaban niveles elevados de glucemia luego de 2 h. Para evaluar la normalidad de los niveles de glucosa durante la PTG se siguieron los criterios del *National Diabetes Data Group* (1979) debido a que es la referencia más exigente para niveles de glucosa reportada para mamíferos no humanos, incluyendo especies de roedores (Nelson, 1995; Oglesbee, 1996). Según este criterio, los niveles de glucemia luego del ayuno deben ser inferiores a 5,55 mmol/L. Además, las concentraciones de glucosa en sangre a los 30, 60 y 90 min de administrada la glucosa deben ser menores a 11,11 mmol/L y luego de 2 h inferiores a 7,78 mmol/L, para ser considerados normales.

## 2.2 Control de manipulación

Se llevó a cabo un experimento para evaluar posibles efectos sobre los niveles de glucosa en sangre de la manipulación inherente a la administración de glucosa en la PTG. Con este fin, se capturaron 11 machos adicionales en Mar de Cobo durante estación reproductiva de 2006 y se trasladaron posteriormente al laboratorio. Luego de transcurrido un período de aclimatación de 1 semana, los individuos fueron ayunados durante 15 h y luego fueron sujetados firmemente del dorso, replicando la manipulación durante la administración de la solución de glucosa. Las concentraciones de glucosa en sangre se determinaron antes y luego de 30, 60, 90, 120 y 180 min de transcurrida la manipulación.

### *2.3 Efecto de estresores puntuales sobre la glucemia*

Se evaluaron los efectos de 3 distintos factores de estrés puntual sobre los niveles de glucosa en sangre:

Inmovilización: Se contó con un grupo adicional de animales capturados durante la estación reproductiva de 2006. En el laboratorio, los mismos fueron firmemente sujetados durante dos minutos en el dispositivo descrito en el Capítulo I. Luego se obtuvieron muestras de sangre de animales asignados a 4 grupos tratamiento (n = 7 cada uno, 15, 30, 60 y 120 min luego de la finalización del tratamiento para los grupos 1 a 4, respectivamente) y a un grupo control de animales que no fue sometido a disturbio previamente a la extracción de sangre.

Manipulación: la manipulación durante la administración de glucosa en el experimento control se consideró como un factor de estrés puntual adicional.

Transporte: ver la sección siguiente.

### *2.4 Niveles de glucosa en sangre en el campo y durante la aclimatación al cautiverio*

Para evaluar los niveles de glucosa en campo y posibles variaciones a lo largo del ciclo reproductivo se capturaron individuos durante la estación no reproductiva 2007 (ENR, abril-mayo, n = 17), el inicio de la estación reproductiva (IER, junio-julio, n = 16) y su pico (PER, octubre, n = 17, Busch et al., 1989; Malizia y Busch, 1991) y se determinaron las concentraciones de glucosa inmediatamente luego de las capturas, obteniéndose las muestras de sangre del seno retro-orbital. La mayoría de estos individuos fueron los mismos que los que se utilizaron en el Capítulo I para la determinación de niveles de GCs.

Para evaluar hasta que punto los niveles de glucosa en sangre son afectados por estrés crónico, se utilizó el período de aclimatación al cautiverio como ejemplo de estrés crónico. Ocho de los individuos capturados en ENR fueron trasladados al laboratorio y los niveles de glucosa en sangre se determinaron al momento de arribar y luego de 2, 4, 7 y 10 días de cautiverio. Además, se determinó la razón neutrófilos a linfocitos (N:L) en sangre en el campo y a los tiempos de cautiverio mencionados antes como indicador adicional de los niveles de estrés de los animales. Este indicador no es afectado inmediatamente por el consumo de alimento y tampoco sigue una variación circadiana como otros indicadores como la glucosa (Ghosh et al., 1983) y los

glucocorticoides (Axelrod y Reisine, 1984). Debido a esto, fue considerado como un indicador valioso de los niveles de estrés de los animales durante la aclimatación al cautiverio. Durante este período, las condiciones de alojamiento de los animales fueron las mismas que las descritas en el Capítulo I.

### *2.5 Regulación de glucosa en sangre y actividad física*

Para evaluar si las actividades de locomoción y excavación pueden constituir un mecanismo de compensación en la regulación de la glucosa se procedió de la siguiente manera: se trasladaron al laboratorio 11 animales permitiéndoles que se aclimaten a las condiciones de cautiverio durante 1 semana. Posteriormente, 5 de estos animales fueron forzados a correr diariamente (10 min por día) durante 30 días en una cinta rotatoria que giraba a una velocidad de 0,4-0,6 m/s (equivalente a 250-360 m recorridos por día). Individuos de *Ctenomys talarum* recorrieron  $179,99 \pm 69,62$  SD m/día en sistemas artificiales de cuevas (Luna y Antinuchi, 2003) por lo tanto, estas distancias pueden considerarse como aproximaciones razonables a las distancias que los tuco-tucos se desplazan en el campo. Además, estos individuos fueron transferidos día por medio a una caja llena con arena compactada donde se les permitió excavar durante 10 min. Los 6 individuos restantes permanecieron sin actividad física durante el mismo período de 30 días para ser utilizados como controles. A los 10, 20 y 30 días luego de la semana de aclimatación al cautiverio se realizaron PTG a los individuos de ambos grupos, como se describió anteriormente. Para evaluar el efecto de la actividad física se utilizaron las mediciones de glucosa a los 120 min en la PTG (“tolerancia a glucosa 2 horas”), siguiendo el criterio utilizado por Opazo et al. (2004).

### *2.6 Respuestas la glucosa en sangre, cortisol y razón N:L a diferentes regimenes alimentarios*

Para evaluar los efectos de diferentes regímenes alimentarios sobre la glucosa en sangre y los niveles de estrés se contó con animales adicionales, los cuales una vez trasladados al laboratorio, fueron divididos en 4 grupos: (a) alimentados durante 10 días *ad libitum* con una dieta que consistió en verduras frescas (lechuga, cataluña, batata, choclo) y semillas de girasol (n = 5), (b) alimentados durante 10 días *ad libitum* con una dieta que consistió en pastos frescos (n = 8), (c) mantenidos de igual manera

que para el grupo (a) pero sometidos a un ayuno de 24 hs al concluir el día 10 de cautiverio (n = 8) y (d) mantenidos con una restricción en el acceso a alimento, de tal manera de que perdieran el 30 % de su peso corporal inicial (n = 6). Las demás condiciones de alojamiento en el laboratorio fueron, para todos los animales, las descritas en el Capítulo I. Todos los animales fueron pesados diariamente en balanza de precisión. Luego de transcurridos 10 días (11 para el grupo c) se tomaron muestras de sangre para la determinación de los niveles de glucosa en sangre, razón N:L y cortisol en plasma. Las determinaciones de la razón N:L y el análisis de cortisol se encuentran descritos en el Capítulo I.

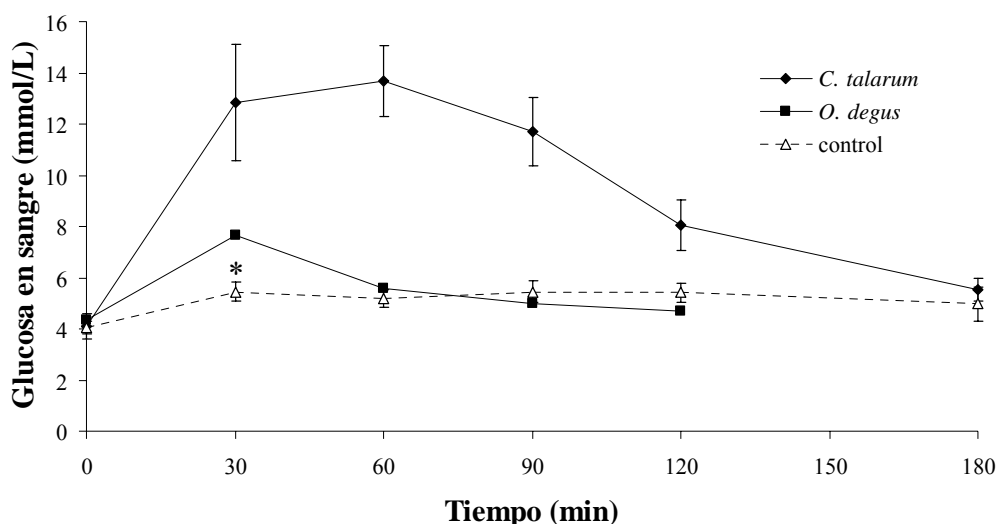
### *2.7 Análisis estadísticos*

Se utilizó ANOVA de medidas repetidas para evaluar (1) diferencias en los niveles de glucosa a los distintos tiempos en el experimento control de manipulación, (2) la razón N:L durante los diferentes tiempos de muestreo durante la aclimatación al cautiverio y (3) las variaciones en el peso corporal de los animales bajo diferentes regímenes alimentarios, seguidos por pruebas de Holm-Sidak para realizar comparaciones múltiples. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar (1) los niveles de glucosa en sangre en animales sometidos al tratamiento de inmovilización, (2) los niveles de glucosa en individuos capturados en distintas estaciones del año y (3) los niveles de glucosa y cortisol y la razón N:L en animales mantenidos con diferentes regímenes alimentarios en cautiverio, seguidas de comparaciones múltiples por el método de Dunn cuando fue necesario. Los niveles de glucosa en sangre en animales durante la aclimatación al cautiverio se compararon por medio de ANOVA de medidas repetidas no paramétrico, seguida de una comparación múltiple por el método de Dunn. Para el análisis de los efectos de la actividad física se utilizó ANOVA de dos vías de medidas repetidas para evaluar diferencias en los niveles de glucosa de ayuno y a las dos horas en las PTG entre animales controles y entrenados para un mismo tiempo de cautiverio (17, 27 y 37 días) y entre los diferentes tiempos de cautiverio dentro de ambos grupos de animales. Se realizó una transformación logarítmica a los valores de glucemia a las 2 h para cumplir con los supuestos del ANOVA (Zar, 1984). Los resultados se reportan como promedio  $\pm$  error estándar (ES).

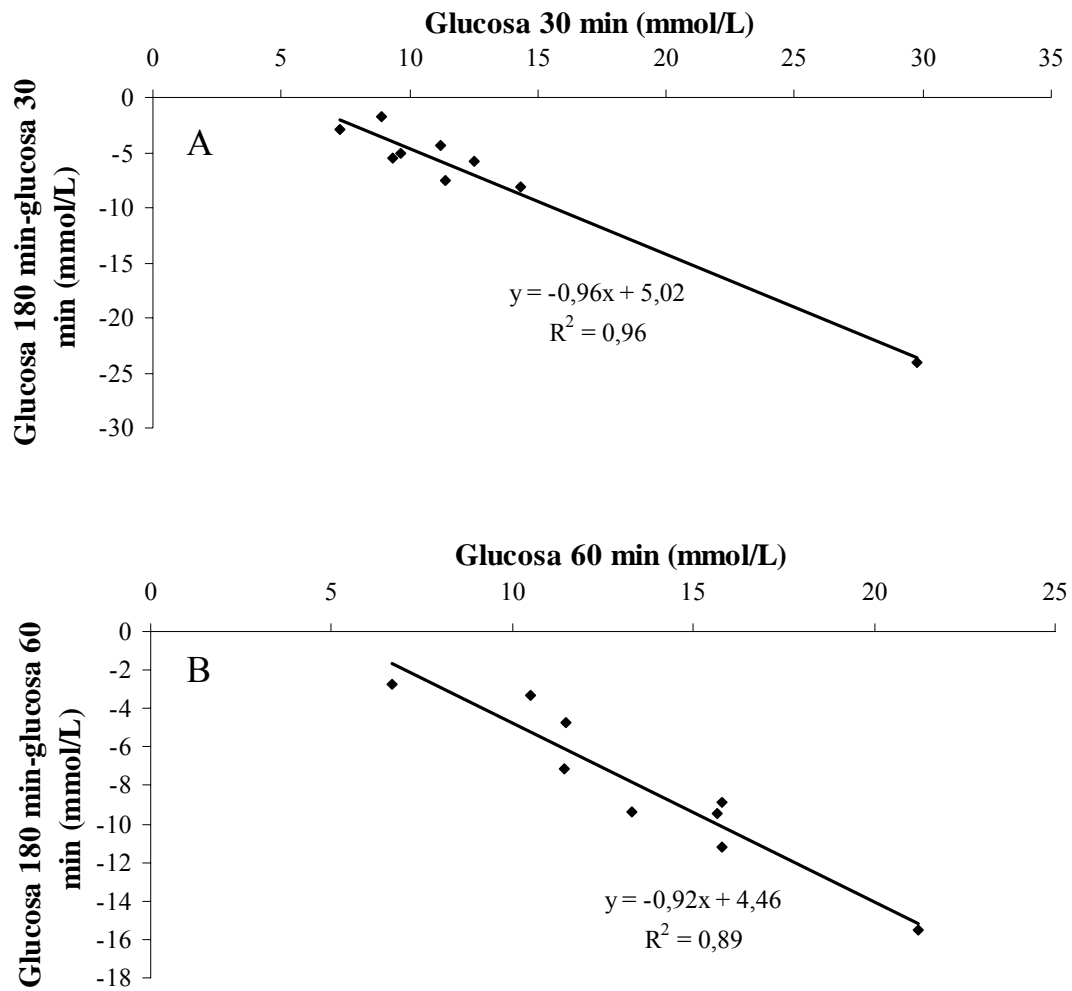
### 3. Resultados

#### 3.1 Prueba de tolerancia a glucosa

La PTG produjo una curva con forma de campana con niveles de glucosa remarcablemente elevados que alcanzaron un máximo a los 60 min (Fig. 1). Para fines comparativos, también se incluye en la Figura 1 una curva típica para un mamífero, previamente reportada por Opazo et al. (2004), para el roedor hystricomorfo *Octodon degus*. A nivel individual, 4 individuos presentaron niveles de glucosa en sangre mayores a 7,78 mmol/L 2 h después de administrada la solución de glucosa y uno de ellos presentó también una glucemia en ayuno anormalmente elevada (7,80 mmol/L). Más aún, con una sola excepción, todos los individuos presentaron niveles de glucosa en sangre anormalmente elevados a los 30, 60 y/o 90 min en la PTG (Tabla 1). Se observaron fuertes correlaciones negativas entre los niveles de glucosa en sangre de los individuos a los 30 y 60 min en la PTG y las disminuciones en los niveles de glucosa ocurridas hasta el último tiempo de muestreo en la prueba (Fig. 2). Esto indica que, más allá de la alta incidencia de valores anormales, los individuos que alcanzaron valores más altos de glucosa en la prueba mostraron posteriormente disminuciones de mayor magnitud en la glucemia.



**Figura 1.** Niveles de glucosa en sangre (promedio  $\pm$  ES) durante una prueba de tolerancia a glucosa en *C. talarum* y en un experimento control en el cual los individuos fueron firmemente sujetos por el lomo replicando la manipulación realizada durante la prueba de tolerancia. Los valores iniciales (tiempo = 0) fueron obtenidos luego de un período de 15 h de ayuno.



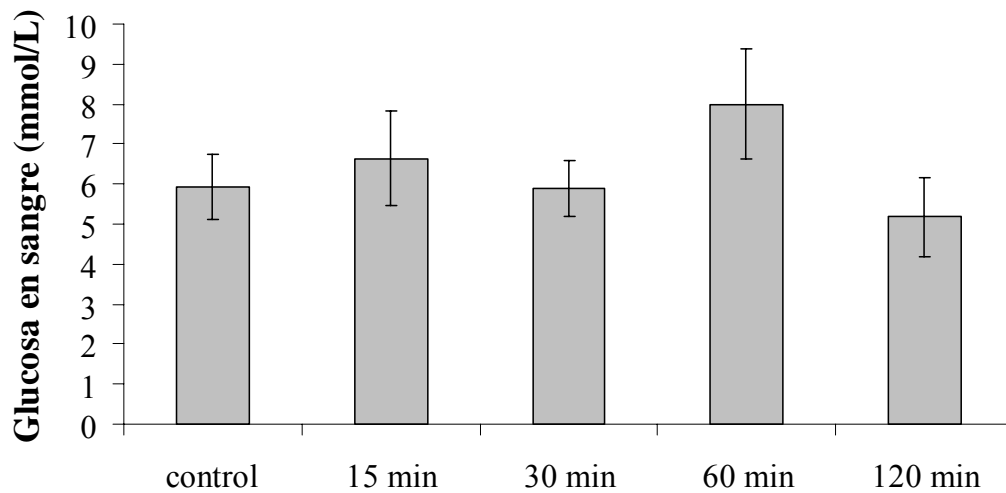
**Figura 2.** Relación entre los niveles de glucosa en sangre alcanzados a los 30 (A) y 60 (B) min en la PTG y la disminución observada en la glucemia durante el resto de la prueba.

**Tabla 1.** Valores de glucosa en sangre (mmol/L) en individuos de *C. talarum* luego de un período de 15 h de ayuno (tiempo 0) y luego de 30, 60, 90, 120 y 180 min de ingerida una solución de glucosa durante la PTG. En rojo se denotan los valores anormales de acuerdo al criterio del *National Diabetes Data Group* (1979)

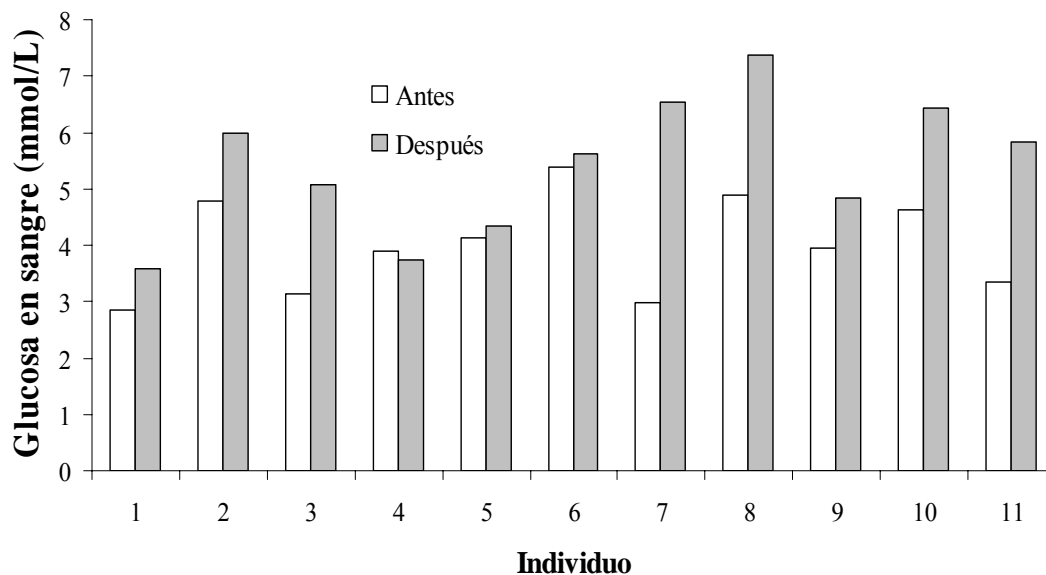
Individuo	ayuno	30	60	90	120	180
1	3,41	9,62	15,78	18,48	7,31	4,56
2	3,41	14,3	15,67	7,15	5,11	6,21
3	4,12	11,38	13,31	12,70	9,29	3,90
4	3,19	12,54	11,49	11,44	8,63	6,76
5	7,75	8,91	10,50	14,63	13,47	7,15
6	4,23	7,26	11,44	10,83	6,93	4,29
7	3,13	11,22	15,78	13,64	10,94	6,87
8	2,86	9,35	6,655	5,39	4,51	3,90
9	4,45	29,75	21,23	10,01	5,61	5,72

### 3.2 Efecto de estresores puntuales sobre la glucemia

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de glucosa en sangre entre animales sometidos a inmovilización y animales controles no disturbados (Kruskall-Wallis:  $H = 1,55$ ;  $p = 0,82$ ; Fig. 3). La manipulación de los animales en el experimento control produjo un incremento significativo en los niveles de glucosa en sangre (ANOVA de medidas repetidas:  $F_{49,64} = 3,35$ ;  $p = 0,01$ ; Holm-Sidak: glucosa en ayuno vs glucosa 30 min:  $p < 0,05$ ), pero el efecto fue muy pequeño en comparación con los valores de glucemia alcanzados luego de administrar la solución de glucosa (Fig. 1). A nivel individual, los niveles de glucosa en sangre aumentaron luego de la manipulación en 10 de los 11 animales que participaron del experimento, aunque la variación entre individuos fue importante (Fig. 4). La detección de un efecto positivo sobre la glucemia en este caso, pero no para el caso de la inmovilización, probablemente se debe a que se contó con mediciones repetidas de glucemia sobre los mismos individuos en la PTG, mientras que para el otro el diseño experimental fue estratificado.



**Figura 3.** Concentraciones de glucosa en sangre (promedio  $\pm$  ES) para individuos de *C. talarum* a distintos tiempos luego de ser sometidos a inmovilización y en animales controles no disturbados.

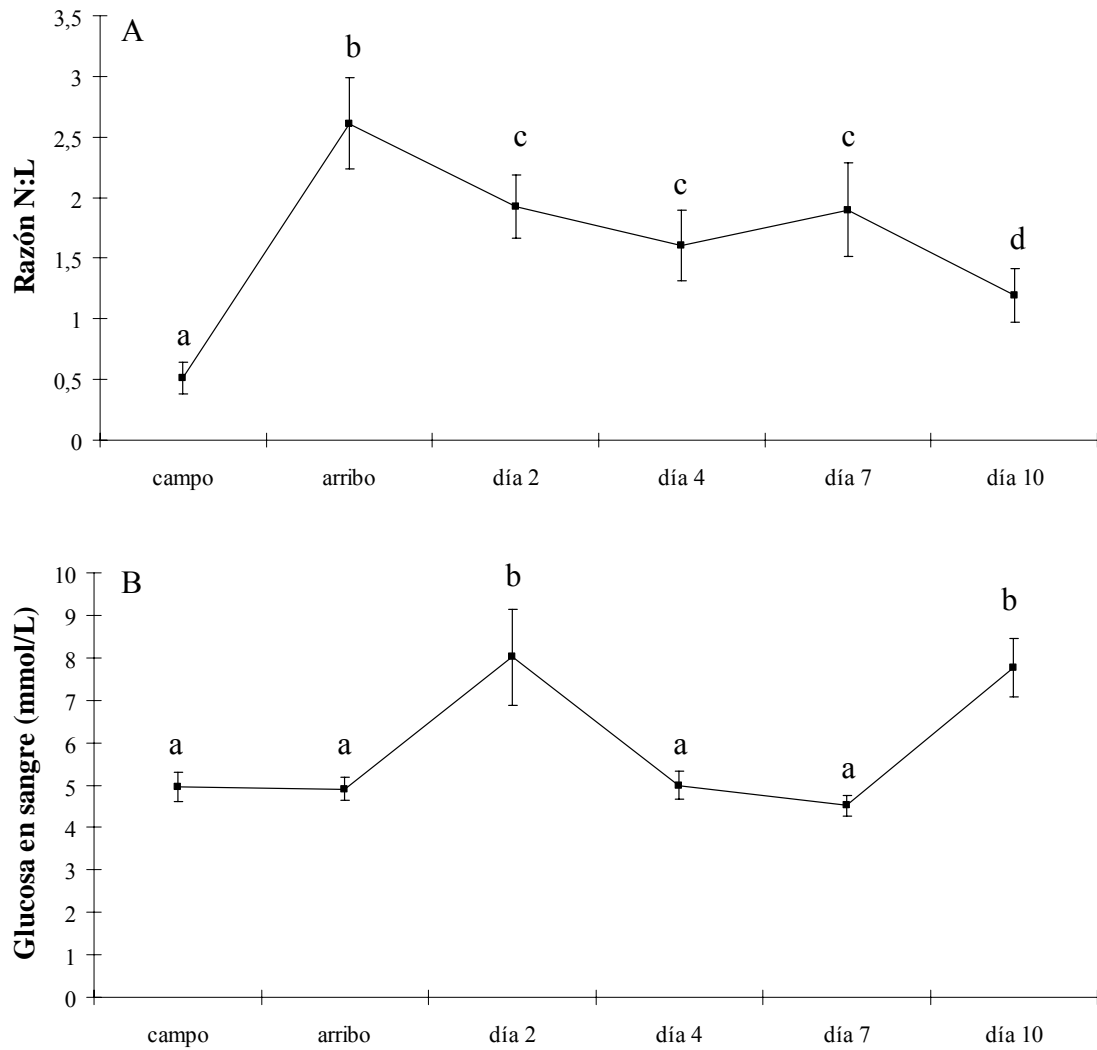


**Figura 4.** Niveles de glucosa en sangre en individuos de *C. talarum* antes y 30 min después de la manipulación en el experimento control.

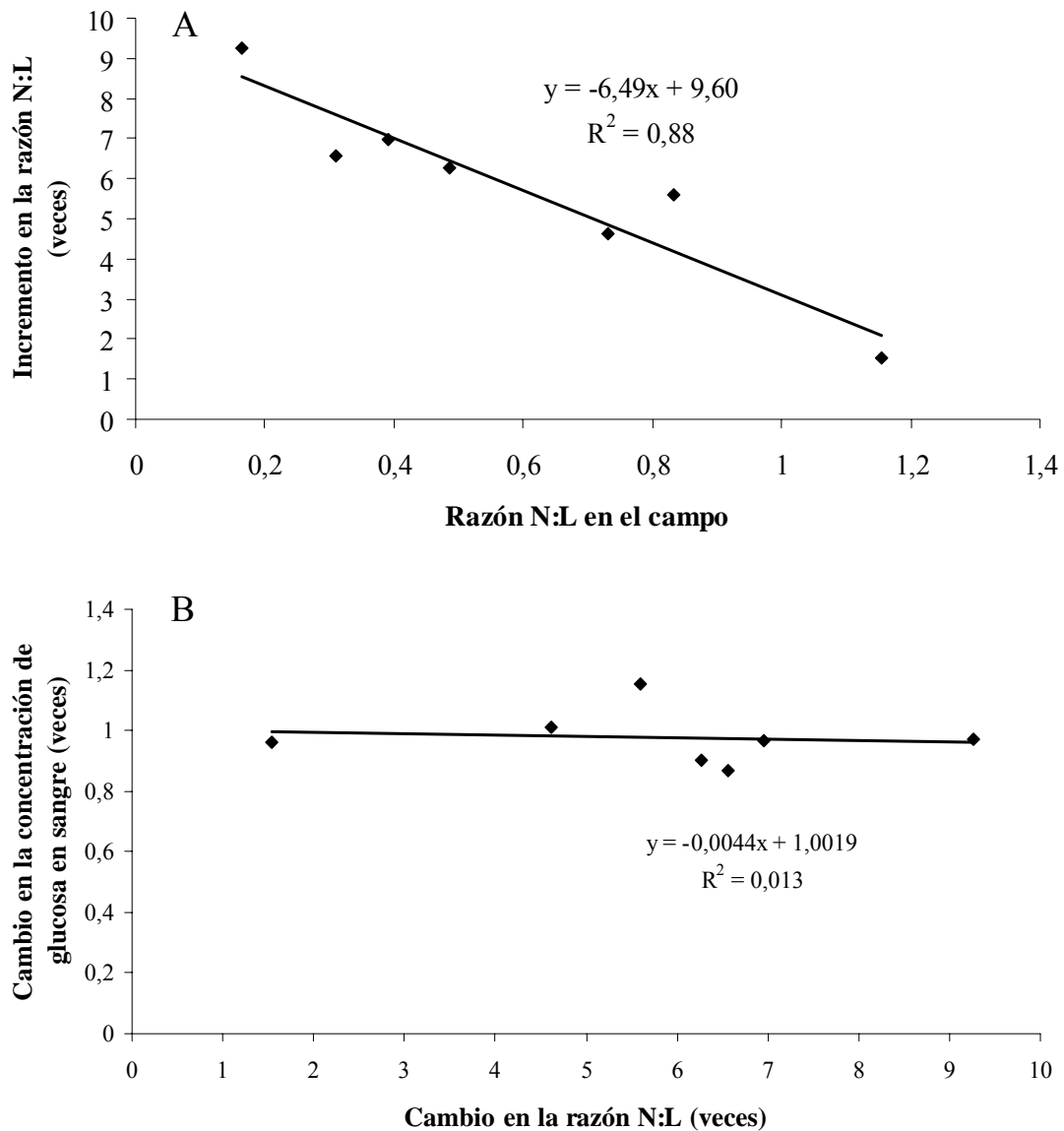
### *3.3 Niveles de glucosa en sangre en el campo y durante la aclimatación al cautiverio*

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de glucosa en sangre en animales capturados durante ENR ( $5,05 \pm 0,25$  mmol/L), IER reproductiva ( $5,59 \pm 0,39$  mmol/L) y PER ( $4,87 \pm 0,24$  mmol/L; Kruskal-Wallis:  $H = 3,57$ ;  $p = 0,17$ ). Los niveles de glucemia en el campo a lo largo del ciclo reproductivo (un total de 50 animales) permanecieron dentro del rango estándar para mamíferos de 3,85-6,05 mmol/L (National Diabetes Data Group, 1979) y no se detectaron valores anormalmente elevados. Un individuo capturado en el inicio de la estación reproductiva tuvo una glucemia alta (8,85 mmol/L), pero también presentó cataratas, por lo que pudo haber sido un caso de diabetes.

La razón N:L se incrementó  $\sim 5$  veces luego del transporte al laboratorio en relación a los valores de campo (ANOVA de medidas repetidas:  $F_{32,44} = 9,11$ ;  $p < 0,001$ ; Holm-Sidak:  $p < 0,05$ ; Fig. 5A), sin embargo los niveles de glucosa luego de arribar al bioterio no difirieron de los valores registrados en el campo (ANOVA de medidas repetidas no paramétrico:  $\chi^2 = 18,90$ ;  $p < 0,05$ ; Dunn: glucosa campo vs glucosa arribo:  $p > 0,05$ ; Fig. 5B). Se observó una fuerte correlación negativa entre la razón N:L que presentaban los animales en el campo y el número de veces que se incrementó la misma luego de arribar al laboratorio (Fig. 6A), lo cual implica que los animales con razones N:L más bajas en campo mostraron incrementos proporcionalmente mayores en respuesta al transporte. Sin embargo, no hubo correlación entre el número de veces que se incrementó la razón N:L y la variación en los niveles de glucosa en sangre (Fig. 6B). Posteriormente, la razón N:L disminuyó progresivamente hasta el día 10 de cautiverio (Fig. 5A). Las variaciones en los niveles de glucosa en sangre a lo largo del período de 10 días no se correspondieron con la variación observada en la razón N:L (Fig. 5).



**Figura 5.** Variaciones en la razón N:L (A) y los niveles de glucosa en sangre (B) en individuos de *C. talarum* en el campo, inmediatamente luego de arribar al laboratorio y luego de 2, 4, 7 y 10 días en cautiverio. Letras diferentes indican diferencias significativas,  $p < 0,05$ .

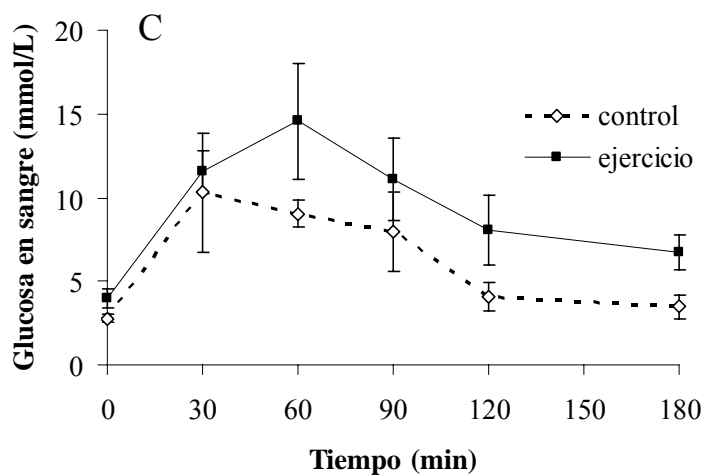
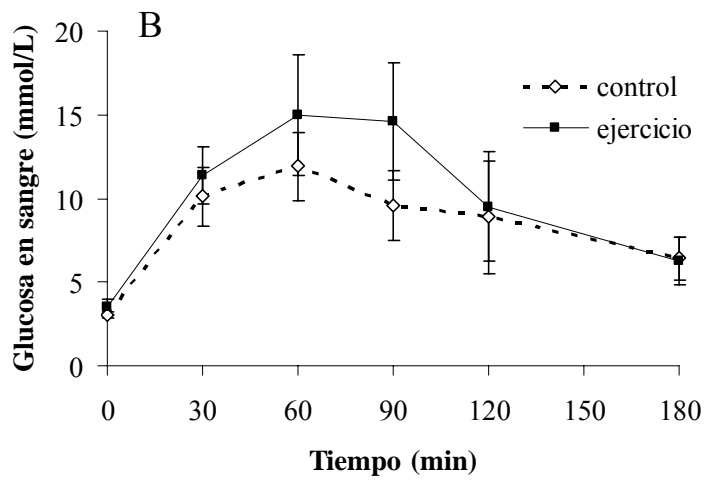
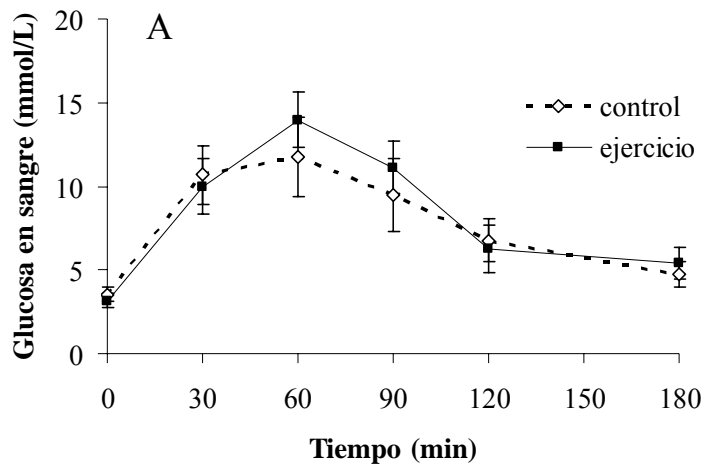


**Figura 6.** (A) Relación entre la razón N:L en individuos de *C. talarum* en el campo y el incremento observado inmediatamente luego de arribados los mismos al laboratorio. (B) Relación entre los cambios registrados en la razón N:L y en las concentraciones de glucosa en sangre en respuesta al transporte hasta el laboratorio.

### 3.4 Regulación de la glucemia y actividad física

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de glucemia en ayuno y “tolerancia a glucosa 2 h” entre individuos controles y ejercitados para un mismo tiempo de permanencia en el laboratorio o dentro de ambos grupos de animales para los diferentes tiempos de cautiverio (ANOVAs de dos vías de medidas repetidas:

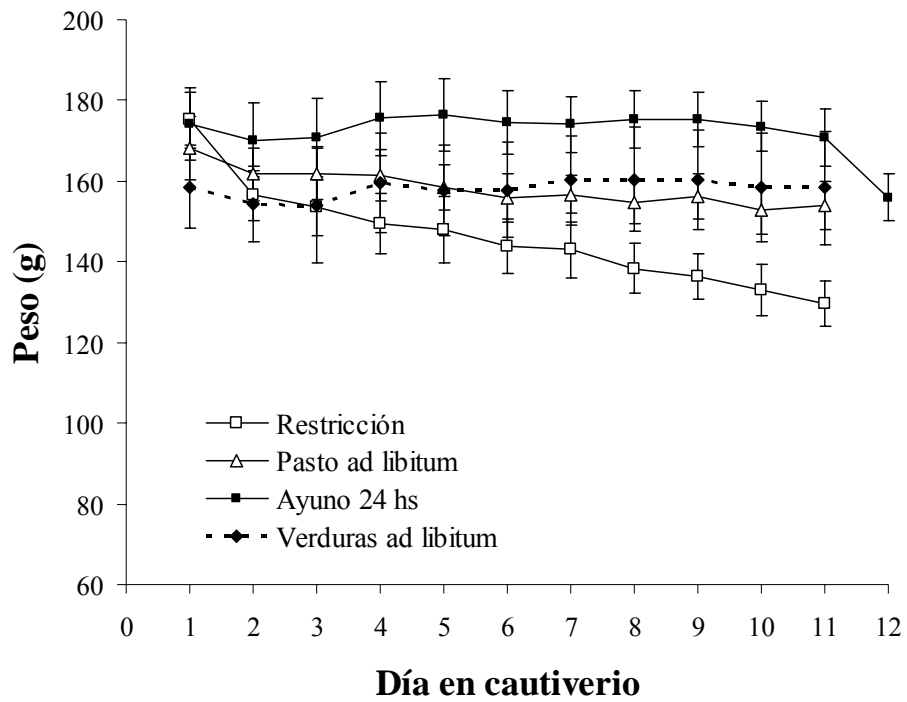
glucosa en ayuno:  $F_{17,31} = 0,83$ ;  $p = 0,38$  y  $F_{17,31} = 0,06$ ;  $p = 0,94$ ; respectivamente; tolerancia a glucosa 2 h:  $F_{17,31} = 0,43$ ;  $p = 0,53$  y  $F_{17,31} = 0,79$ ;  $p = 0,47$ ; respectivamente; Fig. 7). Se observó una interacción significativa entre ambos factores para los niveles de glucosa en ayuno pero no para la tolerancia a glucosa 2 h (ANOVAs de dos vías de medidas repetidas:  $F_{17,31} = 4,55$ ;  $p = 0,026$  y  $F_{17,31} = 0,82$ ;  $p = 0,46$ ; respectivamente). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre individuos controles y ejercitados durante los tiempos de muestreo intermedios de las PTG. A nivel individual, todos los animales ejercitados mostraron en, al menos uno de las PTG, niveles de glucosa a las 2 h superiores a los 7,78 mmol/L; uno en las dos primeras pruebas (luego de 10 y 20 días de actividad física, con 11,51 y 21,68 mmol/L, respectivamente), otros dos individuos en la segunda prueba (8,24 y 10,18 mmol/L, respectivamente) y los restantes dos animales en la tercera prueba (luego de 30 días con actividad física con 9,68 y 15,62 mmol/L, respectivamente). Todos los animales, con una sola excepción, exhibieron niveles de glucosa en sangre anormalmente elevados en los tiempos intermedios de estas PTG, pero ninguno mostró niveles anormales de glucemia en ayuno.



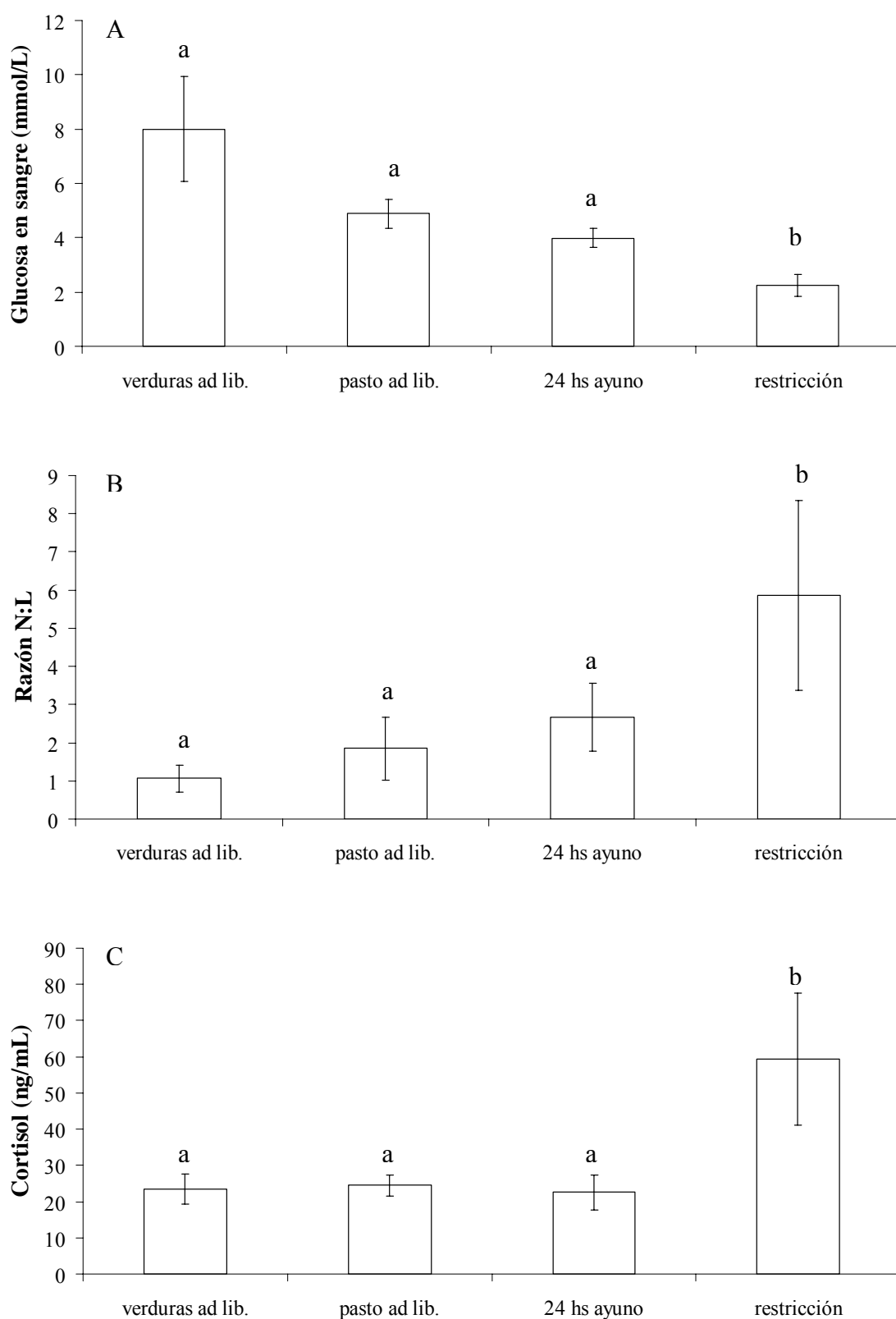
**Figura 7.** Pruebas de tolerancia a glucosa en animales ejercitados ( $n = 5$ ) luego de 10 (A), 20 (B) y 30 (C) días con actividad física y en animales controles ( $n = 6$ ) que permanecieron inactivos en el laboratorio por los mismos tiempos.

### 3.5 Efectos de diferentes regímenes alimentarios

Los animales alimentados *ad libitum* con verduras mantuvieron sus pesos sin mostrar variaciones significativas a lo largo del período de tratamiento (ANOVA de medidas repetidas:  $F_{37,51} = 0,65$ ;  $p = 0,76$ ; Fig. 8), mientras que los alimentados *ad libitum* con pastos mostraron una disminución significativa en el peso corporal al sexto día (ANOVA de medidas repetidas:  $F_{70,87} = 4,58$ ;  $p < 0,001$ ; Holm-Sidak:  $p < 0,05$ ). El ayuno de 24 hs produjo una disminución significativa en el peso de los animales (ANOVA de medidas repetidas:  $F_{74,92} = 5,8$ ;  $p < 0,001$ ; Holm-Sidak:  $p < 0,05$ ), mientras que el tratamiento de restricción causó una disminución significativa hacia el primer día de cautiverio y una declinación gradual posterior (ANOVA de medidas repetidas:  $F_{50,65} = 32,18$ ;  $p < 0,001$ ; Holm-Sidak:  $p < 0,05$ ). Estadísticamente, solo se detectaron diferencias entre el grupo de animales sometidos al tratamiento de restricción en relación a los otros grupos experimentales. Los animales sometidos a restricción crónica en el acceso a alimento presentaron niveles de glucosa en sangre significativamente más bajos y niveles de cortisol y razón N:L más elevados que los otros grupos (glucosa: Kruskal-Wallis:  $H = 10,82$ ;  $gl = 3$ ;  $p = 0,013$ ; Dunn:  $p < 0,05$ ; cortisol: Kruskal-Wallis:  $H = 8,83$ ;  $gl = 3$ ;  $p = 0,032$ ; Dunn:  $p < 0,05$ ; N:L: Kruskal-Wallis:  $H = 7,8$ ;  $gl = 3$ ;  $p = 0,04$ ; Dunn:  $p < 0,05$ ; Fig. 9). Más allá de la significancia de las pruebas estadísticas, las variaciones en los niveles de glucosa en sangre y razón N:L mostraron tendencias opuestas de variación en los grupos experimentales (Fig. 9).



**Figura 8.** Variaciones en el peso corporal (promedio  $\pm$  ES) de individuos de *C. talarum* mantenidos bajo diferentes regímenes alimentarios en cautiverio



**Figura 9.** Variaciones en los niveles de glucosa en sangre (A), la razón N:L (B) y el cortisol en plasma (C) en individuos de *C. talarum* mantenidos en cautiverio bajo diferentes regímenes alimentarios.

## 4. Discusión

### 4.1 Tolerancia a glucosa en el laboratorio y niveles de glucemia en el campo

Dos líneas de evidencia muestran que *C. talarum* no es capaz de regular sus niveles de glucosa en sangre en PTG tan ajustadamente como otras especies de mamíferos, incluyendo a otros hystricomorfos:

(1) Criterios del *National Diabetes Data Group* (1979) para la normalidad de valores en PTG: en la primera PTG un elevado porcentaje de los individuos (4 de 9) presentó valores anormalmente elevados 2 h luego de la ingesta de glucosa, mientras que en los tiempos intermedios de muestreo, 8 de los 9 individuos alcanzaron concentraciones de glucosa anormalmente altas (Tabla 1). Las PTG realizadas para evaluar los efectos de la actividad física confirmaron estos resultados ya que en estas también se registró una alta incidencia de valores anormales, como los que se muestran en la tabla 1 (datos no mostrados).

(2) Datos previamente reportados para otros hystricomorfos por Opazo et al. (2004): la curva reportada para *O. degus* por estos autores alcanza un máximo durante el primer tiempo de muestreo a los 30 min y rápidamente disminuye a los 60 y 90 min luego de una idéntica ingesta de glucosa (0,7 g, ver Fig. 1). En contraste, las curvas reportadas en este trabajo para *C. talarum* tienen forma de campana: los niveles de glucemia en campo se incrementan abruptamente alcanzando niveles máximos a los 60 min y la disminución posterior es mucho más gradual. Además, otras 8 especies ensayadas por estos autores (pertenecientes a las familias Caviidae, Abrocomidae, Octodontidae y Ctenomyidae) exhibieron valores normales de glucemia a las 2 h en PTG, aunque no se tomaron datos a tiempos intermedios en estas pruebas.

Kramer y Buffenstein (2004) han reportado también una tolerancia a glucosa disminuida para la rata desnuda *H. glaber*, la cual exhibió una repuesta en PTG muy similar a la reportada en este estudio para los tuco-tucos. De esta forma, *C. talarum* se constituye en el segundo hystricomorfo conocido con una tolerancia a glucosa disminuida. Para *H. glaber*, Kramer y Buffenstein (2004) reportaron una distribución inusual de células endócrinas en el páncreas, la cual podría encontrarse vinculada a su menor tolerancia a la glucosa. En este sentido, estudios previos han demostrado que los mecanismos moleculares que regulan la secreción de insulina dependen en gran

medida de la distribución de células endócrinas en los islotes del páncreas (Philippe et al., 1992).

Se pueden plantear una variedad de explicaciones posibles para la tolerancia a glucosa disminuida observada en *C. talarum*, aunque se requieren estudios adicionales para confirmar o descartar estas posibilidades. Las mismas incluyen: (1) actividad de su insulina muy reducida, aún en comparación con otras especies de hystricomorfos. Se sabe que existe variación en la actividad biológica de las insulinas de hystricomorfos, y los mayores cambios de actividad han sido observados en miembros de la superfamilia Octodontoidea (que incluye a los tuco-tucos). (2) Menor desarrollo de mecanismos compensatorios como, por ejemplo, menores concentraciones de insulina o números de receptores de insulina podrían ser responsables de la menor tolerancia a glucosa observada *in vivo*. (3) Diferencias en la expresión y/o actividad de transportadores de glucosa, particularmente GLUT4. Existen estudios previos que demuestran que la tolerancia a glucosa *in vivo* puede ser mejorada en ratas transgénicas que sobre-expresan GLUT4, (Shepherd et al., 1993; Holloszy 2003) y que una menor expresión de GLUT4 puede ser responsable de resistencia a insulina (Berger et al., 1989; Bourey et al., 1990).

Más allá de las razones que expliquen la tolerancia disminuida a glucosa en *C. talarum*, es importante notar que los niveles de glucemia en campo (un total de 50 animales capturados a lo largo de todo el ciclo reproductivo) se encontraron dentro del rango normal para mamíferos (3,85-6,05 mmol/L). De esta forma, los resultados anormales obtenidos en PTG en el laboratorio no se correlacionaron con valores anormales de glucemia en animales silvestres. Aunque las PTG garantizan una evaluación rigurosa de la capacidad de la especie de regular sus niveles de glucosa en sangre, pueden implicar ingestas de glucosa que nunca ocurren en condiciones naturales. Así, es muy probable que resultados normales en PTG se encuentren correlacionados con valores normales de glucemia en el campo (ya que evidencian una fuerte capacidad de regulación de la glucemia, ver Opazo et al., 2004), pero resultados anormales pueden no estar asociados en absoluto con problemas en la regulación de glucemia en el ambiente natural de los individuos. Tomados conjuntamente, estos resultados sugieren que *C. talarum* no enfrenta una presión selectiva importante que favorezca una mayor capacidad de regulación de la glucemia. De hecho, al igual que en *H. glaber* (ver Kramer y Buffenstein, 2004), este estado de baja tolerancia a la glucosa no se encuentra asociado con una patología diabética en *C. talarum*. Se sabe

que en mamíferos la posibilidad de desarrollar *diabetes mellitus* en individuos sanos es fuertemente influenciada por las características de la dieta, como el contenido calórico (Kanerek y Ho, 1984; Dahlquist et al., 1990). En su ambiente natural, los tuco-tucos consumen exclusivamente partes aéreas de plantas compuestas principalmente por fibras y proteína (Martino et al., 2007) y no consumen órganos de reserva con alto contenido de almidón (del Valle et al., 2001). Por este motivo, no se esperan ingestas de glucosa que puedan producir incrementos importantes en la glucemia en animales silvestres. En otras palabras, los datos muestran que la capacidad de regulación de la glucemia que presentan los tuco-tucos, aunque reducida en relación a otros mamíferos, es suficiente para asegurarse niveles óptimos de glucosa en sangre en su medio natural.

#### *4.2 Efectos de estrés puntual y crónico sobre la regulación de la glucemia*

El efecto de estresores puntuales sobre la glucemia solo fue detectado para la manipulación del experimento control, en el cual 10 de 11 animales presentaron niveles incrementados de glucosa en sangre luego de 30 min. Sin embargo, los niveles de cortisol en plasma estuvieron incrementados en animales sometidos a inmovilización (Capítulo I), lo cual indica que este tratamiento efectivamente produjo activación del eje HPA. Los GCs producen incrementos en los niveles de glucosa en sangre (Kannan et al., 2000; Kent y Ewbank, 1983) a través de efectos sobre el metabolismo de proteínas, carbohidratos y lípidos (Sapolsky et al., 2000). De esta forma, es muy probable que el efecto haya sido detectado solo para la manipulación porque en este caso se contó con mediciones repetidas para los mismos animales, mientras que en el caso del tratamiento de inmovilización el diseño experimental fue estratificado por grupos (ver Materiales y Métodos). Además, la variación en la glucemia entre individuos puede ser importante cuando no se encuentran en condiciones de ayuno. Mastrángelo et al. (2009), encontraron incrementos en la glucemia (pero no en la razón N:L) en individuos de *C. talarum* sometidos a inmovilización e inmovilización más olor de un predador pero los individuos estaban restringidos en su alimentación. El transporte de los animales al laboratorio produjo una respuesta de estrés muy marcada, la cual se reflejó en un aumento de 5 veces en la razón N:L (Fig. 5A). A pesar de esto, los niveles de glucosa en sangre al momento de arribar al laboratorio no difirieron de los registrados en el campo (Fig. 5B). Más aún, aunque los individuos con valores iniciales más bajos de razón N:L montaron

respuestas más pronunciadas al transporte, no variaron su glucemia en mayor proporción que aquellos que montaron respuestas más pequeñas (Fig. 6). Así, los niveles de glucosa en sangre se mantuvieron estables mientras los animales montaban una fuerte respuesta de estrés al transporte. Dado que se observó una disminución gradual en la razón N:L hasta el día 10 de cautiverio, los conteos de leucocitos validaron la utilización de este período como ejemplo de estrés crónico. Durante este período los niveles de glucosa en sangre no variaron en paralelo a la disminución en la razón N:L y, presumiblemente, fluctuaron principalmente en función de la ingesta de alimentos en el bioterio. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que los estados de estrés, ya sea puntales o crónicos, no producirían problemas en la regulación de la glucemia en *C. talarum* e indican que la glucosa en sangre no es un indicador confiable de niveles de estrés.

#### 4.3 Rol de la actividad física

Los resultados muestran que la tolerancia a la glucosa no aumenta en respuesta a la actividad física, por lo que la locomoción y excavación no constituyen un mecanismo de compensación para la regulación de la glucemia en *C. talarum*. Dado que en el curso de estos experimentos se registró una alta incidencia de valores anormales en PTG, se puede concluir que los resultados anormales en la primera PTG no fueron producto de la menor actividad física asociada al cautiverio.

#### 4.4 Respuestas a diferentes regímenes alimentarios

Las variaciones registradas en el peso corporal muestran que los individuos pueden mantener sus pesos corporales alimentados *ad libitum* con verduras pero no pastos. Esto se debe probablemente a que la dieta mono-específica de pasto no cumple con requerimientos nutricionales y/o energéticos necesarios para mantener el peso corporal bajo condición de cautiverio, a pesar de ser provista *ad libitum*. En el Capítulo I animales alimentados *ad libitum* con verduras mostraron una disminución del 3 % en el peso corporal. Esta diferencia puede deberse a un mayor aporte de agua en el material fresco para el caso de los animales en este trabajo, ya que en este caso todos los días se agregó verdura fresca aunque quedara un excedente de comida del día anterior. En el caso de los animales del Capítulo I, la comida se suministró en exceso

pero día por medio. Los resultados muestran que la restricción en el acceso a alimento funcionó como un estresor crónico, ya que produjo incrementos en los niveles de cortisol en plasma y razón N:L. Una de las respuestas inmediatas a estrés por restricción de alimento es el incremento en los niveles de GCs (Ahima et al. 1996; Sapolsky 2000, Xu y Wang 2010). En gerbos, *Meriones unguulatus*, los niveles de glucosa y las reservas de lípidos se relacionaron negativamente con los niveles de corticosterona en animales ayunados pero no en individuos alimentados, sugiriendo que este GC participa en la movilización de reservas energéticas durante períodos de restricción. Es sabido que la razón N:L se relaciona de manera positiva con los niveles de cortisol en situaciones de estrés (Davis et al, 2008). Más allá de la significancia de las pruebas estadísticas, es notable la tendencia inversa observada en la variación de los niveles de glucosa en sangre y razón N:L en los grupos experimentales (Fig. 9A y B). Es probable que la misma no se refleje en el análisis estadístico ya que el número de muestras no es grande para la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Zar, 1984). En este sentido, la razón N:L fue, en promedio, 2,5 veces mayor en animales ayunados durante 24 hs que en individuos alimentados *ad libitum* con verduras. Asimismo, los niveles de glucosa en sangre fueron dos veces más bajos en el primer grupo que en el segundo. De ser efectivamente un problema de poder estadístico, esto indicaría que la razón N:L es un indicador más sensible de estados de estrés crónico que el cortisol plasmático.

## Conclusiones

El presente estudio muestra que *C. talarum* presenta una tolerancia disminuida a la glucosa en relación a otras especies de mamíferos, constituyéndose en el segundo hystricomorfo conocido que presenta esta característica (junto a *H. glaber*). Estos resultados sugieren que existiría una variación importante en la actividad de las insulinas y/o en el desarrollo de mecanismos compensatorios y/o diferencias asociadas a los transportadores de glucosa dentro de hystricomorfos. Sin embargo, la capacidad de regulación de la glucemia de los tuco-tucos es suficiente para asegurarse niveles óptimos de glucemia en su ambiente natural e incluso regular eficientemente sus niveles de glucosa en sangre durante estrés puntual y crónico. Por lo tanto, la especie no enfrentaría una presión de selección fuerte que favorezca una mayor capacidad de regulación de la glucemia. Se cree que los cambios en estructura y función de las

insulinas de hystricomorfos reflejan la adquisición de una función alternativa (King et al., 1983; Opazo et al., 2005). De ser realmente así, los presentes resultados muestran que esto podría haber ocurrido sin comprometer la homeostasis de la glucosa en tuco-tucos. Finalmente, los resultados muestran que los niveles de glucosa en sangre no son buenos indicadores de estrés para estos animales, ya que los niveles de glucemia no mostraron buena correspondencia con los indicadores de estrés (cortisol y razón N:L).

## Capítulo III

**Variaciones estacionales en los niveles de cortisol y hormonas reproductivas en *Ctenomys talarum*: diferencias entre sexos, respuesta a estrés puntual y el cautiverio.**



Foto: F. Luna

## 1. Introducción

Los animales exhiben cambios estacionales en su fisiología y comportamiento que les permiten ajustarse a variaciones en las condiciones ambientales y el contexto social (Wikelsky y Ricklefs, 2001; Romero, 2002; Reader y Kramer, 2005, Soto-Gamboa et al., 2005). Los glucocorticoides (GCs) son hormonas que desempeñan un rol importante en la regulación del balance energético, particularmente durante períodos en los cuales los animales afrontan desafíos sociales y ambientales (Romero, 2002). Está ampliamente documentado que niveles elevados de GCs son indicativos de situaciones energéticamente demandantes (Reader y Kramer 2005; Romero, 2002). Por otro lado, el eje hipotálamo-pituitaria-gonadal (HPG), que controla los niveles de hormonas reproductivas, es otro de los sistemas endócrinos que permiten a los individuos responder a los cambios en las condiciones del contexto social y reproductivo (Wingfield et al., 1990).

Desde el punto de vista del balance energético, la reproducción es uno de los períodos más costosos en mamíferos, tanto para las hembras como para los machos. El ciclo reproductivo completo de ovulación, concepción, gestación y lactancia es uno de las actividades más costosas energéticamente para una hembra (Wade y Schneider, 1992). En particular, el período post-parto es el momento más demandante en términos de energía debido al elevado costo energético de la lactancia (Krasnow y Steiner, 2006). De hecho, el costo energético diario de producción de leche puede exceder los requerimientos energéticos totales de las hembras no reproductivas (Smith y Grove, 2002). No sorprendentemente, la reproducción tiene un impacto importante en los niveles de GCs en mamíferos, particularmente en las hembras (Boonstra y Boag, 1992; Strier et al., 2003). La gestación y la lactancia producen aumentos importantes en los niveles de GCs y de la globulina de unión a glucocorticoides (CBG) en roedores (McDonald et al., 1988). En el caso de los machos, el período reproductivo se encuentra frecuentemente asociado con la competencia por acceso a hembras y defensa de territorios, lo cual puede producir activación del eje HPA con incrementos en los niveles de GCs (Goymann y Wingfield, 2004; Soto-Gamboa et al., 2005). En casos extremos, la activación crónica del eje HPA puede producir inhibición de la secreción de hormonas reproductivas (Knapp y Moore, 1997; Blanchard et al., 2001, Ferin, 2006).

La testosterona es una hormona que presenta numerosas funciones entre los vertebrados. Es responsable de la espermatogénesis, la expresión de algunos caracteres sexuales secundarios y la activación de comportamientos sexuales (Blottner et al., 2000; Nelson, 2000). Durante el período reproductivo, la testosterona tiene efectos directos sobre los comportamientos reproductivos, incluyendo aquellos relacionados con la elección de pareja por parte de las hembras y las interacciones agonísticas entre machos (Cavigelli y Pareira, 2000; Sinervo et al., 2000; Dunlap et al., 2002). De hecho, la denominada *Hipótesis del Desafío* (Wingfield et al., 1990) predice que los niveles de andrógenos y la agresión se encuentran positivamente relacionados e íntimamente vinculados con el contexto social. En mamíferos, los niveles de andrógenos comúnmente se incrementan durante la época reproductiva (Strier et al., 1999). Por lo tanto, cuando se estudian las variaciones estacionales de GCs en relación a cambios en el contexto reproductivo y social es conveniente realizar la medición simultánea de andrógenos (Reeder y Kramer, 2005).

En el caso de las hembras, una de las estrategias que han desarrollado algunas especies con escaso tiempo disponible para la reproducción y/o extensos períodos de gestación (incluyendo roedores Hystricomorfos) es el desarrollo de un celo post-parto (Weir, 1974; Franceschini, et al., 2007). Esta estrategia implica que la lactancia y la gestación habitualmente se superponen durante el período reproductivo (Weir, 1974). Existe muy poca información disponible sobre las interacciones endócrinas de la gestación y lactancia simultáneas. Los niveles incrementados de progesterona durante la gestación (que resultan de la secreción por el cuerpo lúteo y la placenta), disminuyen al momento del parto concomitantemente con el inicio de la producción de leche mediada por la prolactina (Tucker, 1994). Como consecuencia de la posible interferencia entre progesterona y prolactina, la lactancia se caracteriza por niveles bajos de progesterona (Roy y Winne-Edwards, 1995). Así, la superposición de la lactancia y la gestación podría generar un compromiso en los niveles de progesterona en especies que desarrollan un celo post-parto (Franceschini, et al., 2007).

*Ctenomys talarum* presenta características interesantes para evaluar la interacción entre GCs y hormonas sexuales a lo largo del ciclo reproductivo, tanto en machos como en hembras. Las características previamente descritas en esta tesis (altos niveles de agresión intraespecífica, territorialidad y poliginia, ver Capítulo I) sugieren, para los machos, roles importantes de la testosterona en la regulación estacional de comportamientos agresivos y del cortisol en la movilización de reservas

de energía durante los encuentros agonísticos. Antenucci et al. (2007) reportaron que la demanda energética es considerablemente mayor para hembras reproductivas que no reproductivas, especialmente aquellas en período de lactancia. Por lo tanto, se pueden esperar cambios en la fisiología del eje HPA en hembras reproductivas que les permitirían afrontar los requerimientos energéticos incrementados. Además, las mismas desarrollan un celo post-parto y frecuentemente presentan una nueva preñez luego de dar a luz la primer camada (Malizia y Busch, 1991), por lo que representan una oportunidad interesante para evaluar variaciones en los niveles de progesterona. Finalmente, los tuco-tucos constituyen una buena oportunidad para evaluar los efectos del cautiverio sobre los niveles de GCs y hormonas reproductivas. Se ha observado que la transferencia de animales silvestres a condiciones de cautiverio puede afectar la regulación de los niveles de GCs debido al estrés crónico asociado (Künzl et al., 2003; Dickens et al., 2009) y también la actividad del eje HPG (Gottreich et al., 2000). Particularmente para el caso de los tuco-tucos, es importante conocer el status hormonal de estos animales bajo condiciones de cautiverio debido a que los mismos son utilizados en campos de estudio como la ecología del comportamiento, fisiología e inmunología, entre otros.

De acuerdo a lo planteado en los párrafos precedentes, los objetivos del presente trabajo consistieron en: (1) evaluar y comparar la variación estacional de los niveles plasmáticos de cortisol en machos y hembras silvestres de *C. talarum* (2) comparar los niveles de cortisol de base y en condición de estrés en hembras reproductivas y no reproductivas, (3) evaluar variaciones estacionales en los niveles de testosterona (machos) y progesterona (hembras) y (4) evaluar el efecto del cautiverio sobre los niveles de testosterona y progesterona en machos y hembras, respectivamente.

Hipótesis: condiciones cambiantes de requerimientos energéticos e interacciones intraespecíficas a lo largo de un ciclo anual son acompañadas de variaciones en los niveles de GCs y hormonas reproductivas en individuos de *C. talarum*. Las predicciones del presente trabajo son las siguientes: (1) los niveles cortisol aumentarán para hembras durante el período reproductivo (2) los niveles de testosterona en machos y progesterona en hembras aumentarán durante el período reproductivo y (3) el cautiverio producirá disminuciones en los niveles de hormonas reproductivas.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Variaciones estacionales en los niveles de cortisol en hembras y machos silvestres

Para evaluar variaciones en los niveles de cortisol de base y en respuesta a estrés se capturaron hembras silvestres de *C. talarum* durante la estación no reproductiva (ENR, abril-mayo) y el pico de la estación reproductiva (PER, noviembre-diciembre, Busch et al., 1989; Malizia and Busch, 1991, Fanjul et al., 2006) en 2009. Las capturas se realizaron de igual manera a la descrita en el Capítulo I pero en este caso se utilizaron trampas en forma de tubo construidas con malla de alambre. Las mismas presentan una puerta en uno de los extremos que los animales pueden empujar desde el exterior para permitir su ingreso pero luego no pueden abrir desde el interior (Fotografía 1).

Los niveles de base del cortisol en las hembras capturadas en ambas estaciones se determinaron a partir muestras de sangre obtenidas dentro de los 5 min de producidas las capturas (n = 14 y 7 para ENR y PER, respectivamente), por lo cual se evitaron posibles efectos del trampeo y la manipulación sobre los niveles de la hormona. La extracción de sangre se realizó del seno retro-orbital de igual manera a la descrita en el Capítulo I. Para evaluar los niveles de cortisol bajo condición de estrés durante ambas estaciones se contó con hembras adicionales que fueron sometidas a inmovilización durante 2 min inmediatamente luego de las capturas, tal como se describió en el Capítulo I para el caso de los machos (n = 7 y 10 para ENR y PER, respectivamente). Las muestras de sangre para la determinación de los niveles de estrés del cortisol se tomaron 30 min luego del tratamiento de estrés. Entre el tratamiento de estrés y la toma de la muestra de sangre las hembras permanecieron alojadas individualmente en cajas de plástico (25 cm x 32 cm x 42 cm). Para las hembras capturadas durante la estación reproductiva se registró, mediante palpación de la zona abdominal, si las mismas se encontraban preñadas y por medio de la observación de las mamas, si se encontraban amamantando. Con la excepción de 3 hembras juveniles (que se excluyeron de los análisis), todas las demás capturadas en la estación reproductiva se encontraron preñadas y/o en período de lactancia. Más allá de esta evaluación al momento de la captura, los datos hormonales de las hembras obtenidos durante PER fueron agrupados debido a que (1) la cantidad total de muestras no permite una adecuada comparación estadística al estratificar por condición

reproductiva (gestación o lactancia) dentro de cada tratamiento (de base vs. estrés) y (2) las hembras en período de lactancia posiblemente pudieran presentar una preñez temprana no detectable por palpación, por lo cual la estratificación podría omitir erróneamente esta otra categoría (gestación y lactancia). Por lo tanto, los análisis se limitan a comparar niveles hormonales entre hembras capturadas durante ENR y PER.

Con el fin de comparar los niveles de cortisol entre sexos se capturaron machos durante los muestreos mencionados más arriba (7 y 10 individuos para ENR y PER, respectivamente) y se tomaron muestras de sangre dentro de los 5 min de logradas las capturas. Además, para el caso de los machos se capturaron individuos durante el inicio de la estación reproductiva 2009 (IER, julio, n =8) para permitir una comparación con el patrón de variación estacional registrado durante 2007 durante las tres estaciones (Capítulo I). Los niveles de cortisol en plasma se determinaron se determinaron por medio del ensayo descrito en el Capítulo I.

A partir de todas las muestras de sangre obtenidas dentro de los 5 min de captura se realizaron extendidos de sangre para la determinación de la razón neutrófilos a linfocitos (N:L) como indicador adicional sobre el status de estrés en los individuos capturados en las distintas estaciones (Davis et al., 2008). Los números de muestras reportados para la razón N:L son menores al total de individuos capturados debido a que algunos individuos (2 machos en ENR, 1 macho en IER y 2 machos y 1 hembra en PER) presentaron bajos números de leucocitos en sangre, que resultaron insuficientes para la determinación de la razón N:L. Se registraron los pesos de todos los animales al momento de la captura por medio de una balanza Pesola.



Foto: M.S. Fanjul

**Fotografía 1:** Trampa ubicada en una galería de un individuo de *C. talarum*.

## 2.2 Niveles de hormonas reproductivas en animales silvestres

A partir de las muestras tomadas en machos silvestres se determinaron los niveles de testosterona en plasma por medio de un radioinmunoensayo (RIA) comercial (Coat-a-Count<sup>®</sup> Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, California) desarrollado para cuantificar niveles de testosterona en muestras de plasma y orina. Las muestras de plasma fueron calentadas previamente al RIA (30 min, 56 °C) y luego diluidas entre 6 y 40 veces con buffer PBS (PH 7) para eliminar interferencia de componentes del plasma e ingresar dentro del rango de medición del ensayo debido a los altos niveles de la hormona en machos de *C. talarum*. La dilución que se utilizó para la determinación de los niveles de testosterona de cada muestra fue aquella en la cual el nivel de la hormona se situó más cerca del 50 % de unión del ensayo (50 % *binding*). Las características del ensayo y la validación correspondiente se encuentran descritas en detalle en el Anexo de la presente tesis.

Asimismo, se determinaron los niveles de progesterona en muestras de plasma de las hembras capturadas durante ENR y PER (n = 9 para ambas estaciones). El menor número de muestras para progesterona se debió a que algunas muestras de plasma no presentaron volumen suficiente para la determinación de esta hormona, luego de realizado el RIA correspondiente para el cortisol. Los niveles de progesterona se determinaron mediante el kit Coat-A-Count (*Siemens Medical Solutions Diagnostics*), que es un RIA de fase sólida en el cual progesterona marcada con <sup>125</sup>I compete con la progesterona en la muestra por sitios de unión a anticuerpos específicos. Los calibradores del kit contienen 0; 0,1; 0,5; 2; 10; 20 y 40 ng/mL. El límite de detección es de 0,08 ng/mL. Para la validación del ensayo se evaluó el paralelismo para una dilución seriada de un pool de plasma de hembras y se realizaron enriquecimientos de 4 muestras de plasma (agregando 20 µL del calibrador de 40 ng/mL previamente al RIA) para determinarse la exactitud del mismo. Si bien el ensayo exhibió muy buen paralelismo, los porcentajes de recuperación de progesterona fueron muy variables (ver Resultados), sugiriendo, al igual que para la testosterona, la presencia de elementos en el plasma que producen interferencia en el ensayo. Los hystricomorfos presentan globulinas específicas de unión a progesterona (PBGs), diferentes de la globulina de unión a corticosteroides (CBG), que reducen la tasa de metabolismo de la hormona circulante durante la gestación (Heap et al., 1981; Louw et al., 1992). Presumiblemente, esta sea una estrategia relacionada con los períodos

relativamente largos de preñez de estos roedores (2-3 meses). Se ha observado que las globulinas de unión a hormonas esteroides pueden producir interferencia en estos ensayos (Slaats et al., 1987; Tate y Ward, 2004). Para evaluar si el desempeño del ensayo mejoraba al someter las muestras a tratamiento por calor, se calentaron 7 muestras de plasma (56°C, 30 min) y luego las mismas fueron separadas en dos alícuotas, una de las cuales fue enriquecida como se describió anteriormente, mientras que la otra fue analizada directamente para realizar el cálculo de los porcentajes de recuperación. Finalmente, para obtener información adicional acerca de la naturaleza de la interferencia, las muestras de plasma obtenidas de hembras silvestres fueron divididas en dos alícuotas (una tratada con calor previamente al RIA y la otra sin tratar) y se evaluaron las diferencias en los valores medidos en ambas fracciones.

### *2.3 Efectos de cautiverio sobre los niveles de cortisol y hormonas reproductivas*

Para evaluar los efectos de la transferencia de los animales al cautiverio sobre los ejes HPA y HPG se capturaron animales de ambos sexos durante junio de 2010 (6 hembras y 7 machos). Al momento de las capturas se obtuvieron (en menos de 5 min) muestras de sangre para la determinación de los niveles de hormonas en el campo. Posteriormente, estos animales fueron trasladados al laboratorio donde fueron mantenidos en cautiverio durante un período de 30 días, bajo las condiciones descritas en el capítulo I. Luego de 10, 20 y 30 días de cautiverio, se tomaron muestras de sangre para la determinación de cortisol (todas las muestras), testosterona (machos) y progesterona (hembras). Las muestras de plasma obtenidas de hembras en el campo no tuvieron un volumen suficiente para la determinación conjunta de cortisol y progesterona, por lo que se priorizó la determinación del GC en las mismas. Por este motivo, se tomaron como referencia los niveles de progesterona en el campo durante 2009.

### *2.4 Análisis estadísticos*

Se utilizó estadística paramétrica cuando los datos ajustaron a una distribución normal y presentaron homocedasticidad y no paramétrica cuando se alejaron significativamente de una u ambas condiciones (Zar, 1984). Los niveles de cortisol de base y de estrés en las hembras capturadas durante ENR y PER fueron comparados por

medio de ANOVA de dos vías. Los factores fueron “estación” (niveles: no reproductiva y reproductiva) y tratamiento (niveles: de base y estrés). Los niveles de cortisol y testosterona y la razón N:L en los machos durante ENR, IER Y PER se compararon por medio de pruebas de Kruskal-Wallis, seguidas de análisis de comparaciones múltiples de Dunn, cuando se detectaron diferencias significativas. Se compararon también las varianzas en los niveles de testosterona en diferentes estaciones por medio de la prueba F para homogeneidad de varianzas. Las concentraciones de base de cortisol en las hembras y los machos capturados durante ENR y PER se compararon utilizando pruebas de Mann-Whitney. Los niveles de progesterona, los pesos corporales y la razón N:L en hembras durante ENR y PER se compararon también por pruebas de Mann-Whitney. El paralelismo del pool de plasma respecto de la curva estándar de progesterona se evaluó con una prueba t para igualdad de pendientes. Los niveles de progesterona en alícuotas calentadas y no calentadas de muestras de plasma se compararon por medio de la prueba de Wilcoxon. La comparación de los pesos de los machos capturados en diferentes estaciones se realizó por medio de ANOVA seguido de una comparación múltiple por el método de Holm-Sidak. Los niveles hormonales a lo largo del período de 30 días en cautiverio se compararon por medio de ANOVA de medidas repetidas, seguidos por análisis de comparaciones múltiples de Holm-Sidak. La varianza en los niveles de testosterona en individuos cautivos y silvestres se comparó por medio de la prueba de Levene (Zar, 1984). Todos los resultados se presentan como promedio  $\pm$  error estándar (ES).

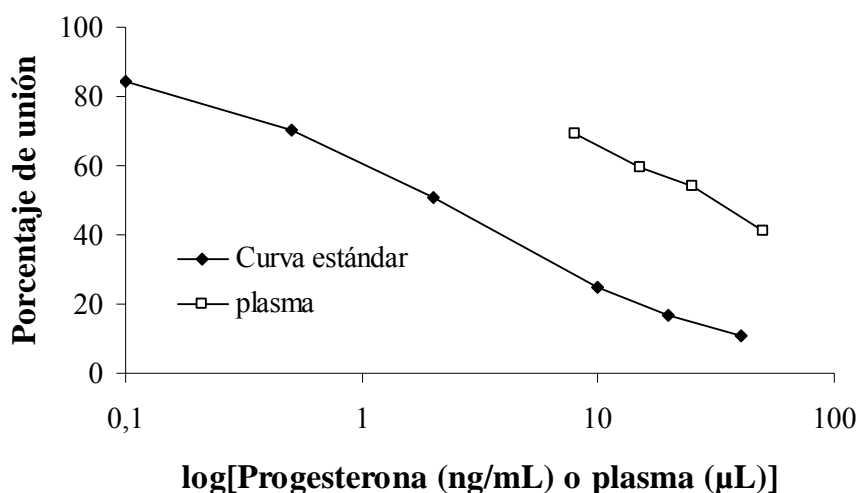
### **3. Resultados**

#### *3.1 Validación del RIA de progesterona*

El pool de plasma mostró un comportamiento paralelo respecto de la curva estándar del ensayo (prueba *t* para igualdad de pendientes,  $t = 1,6$ ;  $gl = 6$ ;  $p = 0,15$ ; Fig. 1). A pesar de esto, las muestras no tratadas con calor tuvieron porcentajes muy variables de recuperación (entre 58-90 %). Las siete muestras tratadas con calor mostraron un porcentaje de recuperación de  $87,2 \pm 5,59$  %, aunque algunas muestras tuvieron porcentajes por debajo del 80 % (Tabla 1). De esta forma, estos resultados indican que los niveles de progesterona pueden ser subestimados hasta un 25 % en algunas muestras de plasma. Por este motivo, si bien los errores en los valores medidos

serían relativamente pequeños para las muestras tratadas con calor, estos resultados deben ser considerados con prudencia.

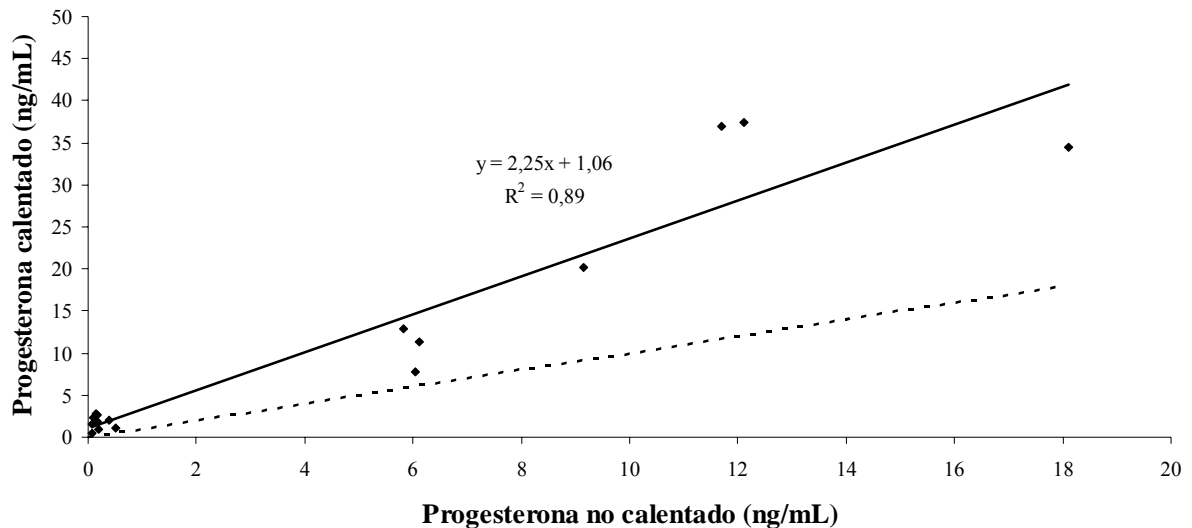
Para todas las fracciones calentadas de las muestras de plasma los valores medidos de progesterona fueron mayores que en sus correspondientes alícuotas no calentadas (estos incrementos fueron estadísticamente significativos, Wilcoxon:  $p < 0,001$ ; Fig. 2).



**Figura 1.** Paralelismo del RIA utilizado para la determinación de progesterona en muestras de plasma de hembras de *C. talarum*.

**Tabla 1.** Porcentajes de recuperación de progesterona agregada a muestras de plasma de *C. talarum* previamente al RIA.

Muestra	Progesterona (ng/mL)	Esperado (ng/mL)	Observado (ng/mL)	Recuperación (%)
1	0,79	7,91	6,37	80,4
2	1,12	8,19	6,53	79,7
3	7,72	13,59	14,69	108,1
4	0,19	7,43	5,71	76,8
5	4,62	11,05	8,89	80,4
6	1,32	8,35	9,13	109,3
7	11,79	16,92	12,78	75,5



**Figura 2.** Relación entre los niveles medidos de progesterona en alícuotas calentadas (56°C, 30 min) y no calentadas de las mismas muestras de plasma de hembras de *C. talarum*. La línea punteada indica una relación 1:1.

### 3.2 Variación en el peso corporal

Los machos capturados durante ENR tuvieron, en promedio, un menor peso corporal que los capturados durante IER y PER (ENR: 122,04 ± 12,44 g; IER: 170,06 ± 9,09 g; PER = 156,81 ± 6,91 g; ANOVA:  $F_{20,22} = 6,55$ ,  $p = 0,006$ ; Holm-Sidak:  $p < 0,05$ ), debido a que se capturaron 4 individuos juveniles sobre un total de 7 capturas. Los machos capturados al inicio de la estación reproductiva y durante su pico no mostraron diferencias significativas en su peso corporal (Holm-Sidak:  $p > 0,05$ ) y fueron todos adultos de peso mayor a 120 g. Por su parte, los pesos corporales de las hembras capturadas durante la estación no reproductiva y su pico no difirieron significativamente (ENR: 125,74 ± 3,16 g; PER: 131,44 ± 3,68 g; Mann-Whitney:  $p = 0,28$ ) debido a que las hembras capturadas durante el PER se encontraban en estadios iniciales de preñez, amamantando o ambas situaciones simultáneamente pero ninguna en preñez avanzada.

### 3.3 Niveles de cortisol y hormonas reproductivas en el campo

Los niveles de base de cortisol fueron significativamente más elevados para las hembras que para los machos, tanto en ENR (Mann-Whitney:  $p = 0,002$ ) como en PER (Mann-Whitney:  $p = 0,03$ , Fig. 3 y 4A). De hecho, se registraron frecuentemente en hembras niveles de base de cortisol por encima de los 100 ng/mL (más de 117 ng/mL en promedio durante PER). Estos niveles de cortisol nunca se observaron en machos, incluso en animales sometidos a múltiples estresores al momento de la captura (Capítulo I). El tratamiento de inmovilización produjo un incremento significativo en los niveles plasmáticos de cortisol en hembras capturadas durante ENR y PER (ANOVA de dos vías:  $F_{31,36} = 12,29$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 3). Se observó una significancia marginal para la interacción de los factores ( $p = 0,055$ ), lo cual indica que las hembras capturadas durante PER habrían respondido al estrés con incrementos de cortisol proporcionalmente mayores que las capturadas durante ENR (aunque la diferencia no es muy grande en magnitud). Por su parte, las concentraciones de cortisol de base y de estrés en hembras fueron significativamente más elevadas durante PER que en ENR (ANOVA de dos vías:  $F_{31,36} = 25,27$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 3).

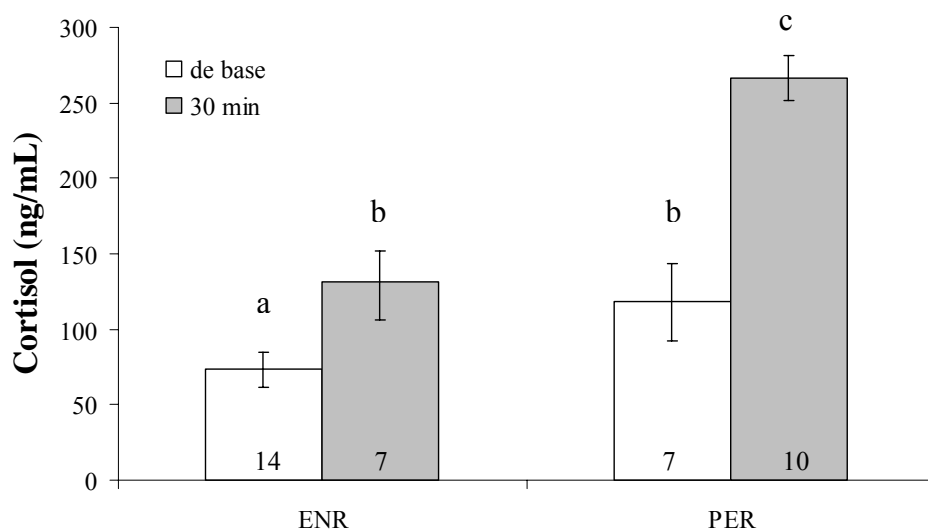
Los machos también mostraron un patrón estacional con mayores niveles de cortisol durante la estación reproductiva (Kruskal-Wallis:  $H = 13,51$ ;  $gl = 2$ ;  $p = 0,001$ ; Dunn:  $p < 0,05$ , Fig. 4A). Notablemente, este patrón de variación estacional contrasta con el patrón observado para 2007 (Capítulo I). Además, durante IER se registraron niveles de base de cortisol algo más elevados a los reportados para 2007 ( $70,05 \pm 2,63$  ng/mL).

Los niveles plasmáticos de testosterona en machos silvestres fueron extraordinariamente elevados (hasta 486 ng/mL) y mostraron un patrón estacional marcado con valores significativamente más elevados durante IER (Kruskal-Wallis:  $H = 10,79$ ;  $gl = 2$ ;  $p = 0,005$ , Dunn:  $p < 0,05$ , Fig. 4B). En promedio, los niveles de testosterona durante IER fueron 11,4 y 4,7 veces mayores a los registrados durante ENR y PER, respectivamente. Además, la variación interindividual en los niveles de testosterona en plasma fue muy importante, registrándose durante las diferentes estaciones animales con niveles bajos (incluso por debajo del límite de detección del ensayo) y otros con niveles muy elevados (Tabla 1). La varianza en los niveles de testosterona fue significativamente mayor durante IER que en ENR ( $F_{7,6} = 46,88$ ;  $p < 0,001$ ) y PER ( $F_{7,9} = 38,90$ ;  $p < 0,001$ ). Los niveles de testosterona mostraron una

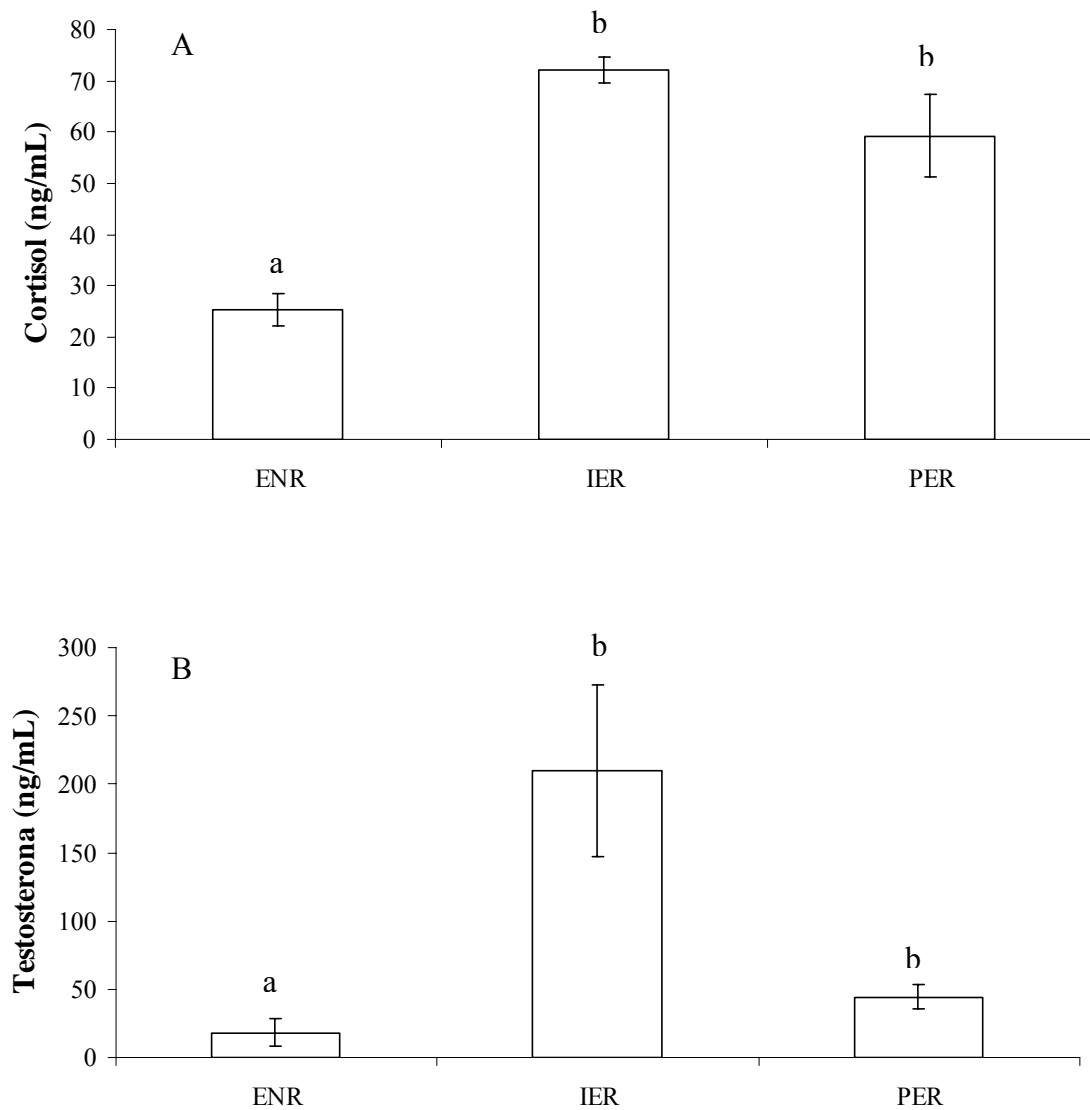
relación positiva con el peso corporal solamente durante el PER (testosterona = 1,04 peso - 113,86;  $R^2 = 0,56$ ;  $t = 2,77$ ;  $p = 0,032$ ), pero no para ENR ( $t = 0,25$ ;  $p = 0,81$ ) y IER ( $t = 1,83$ ;  $p = 0,12$ ).

Los niveles de progesterona no difirieron significativamente entre estaciones (datos de muestras tratadas con calor, ENR:  $10,26 \pm 4,93$  ng/mL; PER:  $9,29 \pm 4,18$  ng/mL; Mann-Whitney:  $p = 0,86$ ). Tampoco se registraron variaciones significativas en la varianza de los datos durante ambas estaciones ( $F_{8,8} = 1,39$ ;  $p = 0,32$ ).

La razón N:L se mantuvo en valores bajos para ambos sexos a lo largo de todo el ciclo reproductivo y no se observaron diferencias significativas entre estaciones para machos (ENR:  $0,21 \pm 0,09$ ; IER:  $0,26 \pm 0,07$ ; PER:  $0,29 \pm 0,08$ ; Kruskal-Wallis:  $H = 0,32$ ;  $p = 0,88$ ) ni hembras (ENR:  $0,28 \pm 0,06$ ; PER:  $0,25 \pm 0,07$ ; Mann-Whitney:  $p = 0,96$ ).



**Figura 3.** Niveles de cortisol en muestras de plasma de hembras de *C. talarum* tomadas dentro de 5 min de producidas las capturas (línea de base) y luego de 30 min de ser sometidas a inmovilización durante la estación no reproductiva (ENR) y el pico de la estación reproductiva (PER). Los tamaños muestrales se indican en la base de cada barra. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )



**Figura 4.** Niveles plasmáticos de cortisol (A) y testosterona (B) en machos de *Ctenomys talarum* capturados durante 2009 en la estación no reproductiva (ENR), inicio de la estación reproductiva (IER) y su pico (PER). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). El número de muestras es de 7, 8 y 10 para ENR, IER y PER, respectivamente.

**Tabla 1.** Variación interindividual en los niveles de testosterona en plasma (ng/mL) en los machos silvestres de *C. talarum* capturados en diferentes momentos del ciclo reproductivo.

Estación no reproductiva	Inicio estación reproductiva	Pico estación reproductiva
61,5	83,4	48,6
0	5,38	57,06
0	76,2	49,2
6,34	311,2	0
0	236,4	32,22
11,04	486	96
49,56	70,2	46,2
	406,8	0
		62,4
		49,8

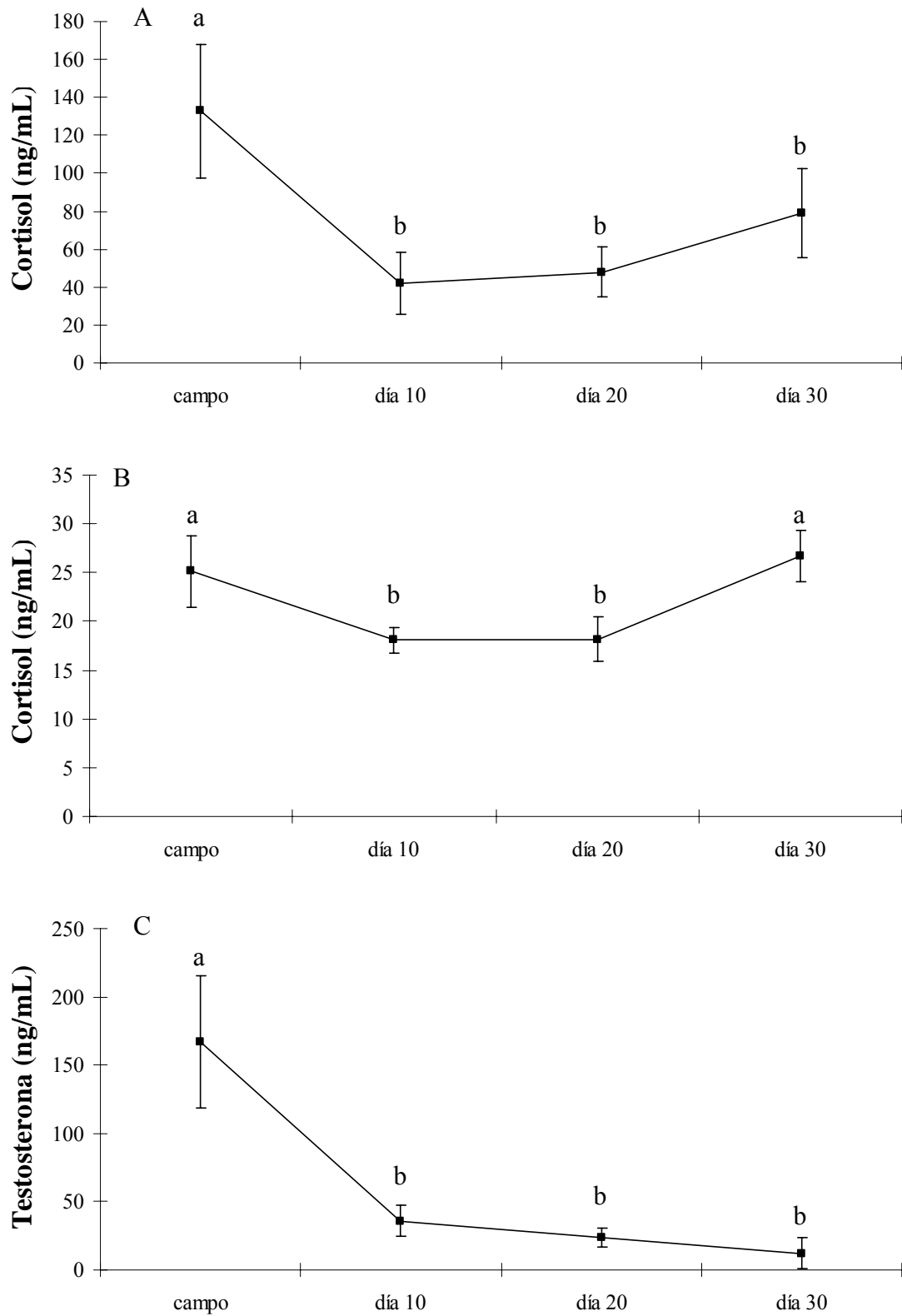
### 3.4 Efecto del cautiverio sobre los niveles de hormonas

Todas las hormonas medidas mostraron una notable disminución en sus niveles plasmáticos en condición de cautiverio. Los niveles de cortisol en las hembras disminuyeron significativamente al día 10 y luego permanecieron hasta el día 30 sin mostrar variaciones estadísticamente significativas (ANOVA de medidas repetidas:  $F_{15,23} = 4,87$ ,  $p = 0,015$ ; Holm-Sidak:  $p < 0,05$ ; Fig. 5A). En machos, los niveles de cortisol fueron significativamente menores a los registrados en el campo durante los días 10 y 20, pero no para el día 30 (ANOVA de medidas repetidas:  $F_{16,25} = 3,92$ ;  $p = 0,02$ ; Holm-Sidak:  $p < 0,05$ ; Fig. 5B). La disminución en los niveles de cortisol al día 10 fue proporcionalmente mayor para hembras que para machos (3,18 vs 1,40 veces, respectivamente), por lo cual las diferencias entre sexos se redujeron bajo condición de cautiverio (Fig. 5A y 5B).

Se registró una disminución de 5 veces en los niveles plasmáticos de testosterona durante los primeros 10 días de cautiverio respecto de los niveles en campo (campo:  $166,94 \pm 48,32$  ng/mL; día 10:  $35,60 \pm 11,37$  ng/mL; ANOVA de medidas repetidas:  $p < 0,05$ , Holm-Sidak:  $p < 0,05$ ; Fig. 5C). Posteriormente, entre los días 10 y 30 se observó una declinación mucho más gradual que, aunque no llega a ser significativa en el análisis estadístico, presumiblemente tenga relevancia biológica debido a que al día 30 los niveles llegaron a ser, en promedio, 13 veces inferiores a los

de campo (día 30:  $12,24 \pm 11,52$  ng/mL; Fig. 5C). Además, el cautiverio produjo una disminución significativa en la variabilidad de los niveles de testosterona (prueba de Levene para igualdad de varianzas:  $p = 0,003$ ). A pesar de las diferencias en la varianza, se realizó, como se indicó anteriormente, un análisis paramétrico para evaluar estadísticamente el efecto del cautiverio debido a que el poder estadístico es bajo para una prueba no paramétrica (Zar, 1984). Un ANOVA de medidas repetidas no paramétrico no es capaz de detectar diferencias significativas a pesar de que los cambios en los niveles de testosterona entre el campo y el día 30 de cautiverio fueron superiores a un orden de magnitud (Fig. 5C).

Los niveles de progesterona se encontraron por debajo del límite de detección en el 60 % de las muestras tomadas bajo condición de cautiverio y las restantes presentaron valores muy bajos (inferiores a 0,35 ng/mL en todos los casos). Agrupando todos los datos obtenidos de animales en cautiverio (y asignando un valor de 0,08 ng/mL a aquellas con valores no detectables) el promedio fue de  $0,11 \pm 0,02$  ng/mL. Aunque estos datos fueron tomados durante 2010 (mientras que los datos de progesterona en hembras silvestres se obtuvieron durante 2009), la diferencia entre hembras cautivas y silvestres fue muy considerable en magnitud. De esta forma, los resultados indican que las disminuciones producidas por el cautiverio son particularmente marcadas para las hormonas reproductivas.



**Figura 5.** Cambios en los niveles plasmáticos de cortisol en hembras (A) y machos (B) y de testosterona en machos (C) de *C. talarum* durante un período de 30 días en cautiverio en relación a los niveles de campo. Notar las diferentes escalas en eje de ordenadas de los paneles A y B. El número de individuos es de 7 machos y 6 hembras. Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas,  $p < 0,05$ ).

#### 4.1 Niveles de cortisol en hembras y machos silvestres

El presente trabajo muestra que las hembras de *C. talarum* tienen niveles plasmáticos de cortisol significativamente más elevados que los machos a lo largo de todo el ciclo reproductivo, lo cual indica que existen diferencias en la fisiología del eje HPA entre sexos en esta especie. En hembras reproductivas se registraron frecuentemente niveles de base de cortisol superiores a los 100 ng/mL; valores que nunca se observaron en machos, incluso bajo condiciones de estrés (Capítulo 1). Es esperable, por lo tanto, que niveles de cortisol entre 200-300 ng/mL sean patológicos en machos de *C. talarum*. Estos resultados sugieren que los mayores niveles en hembras serían necesarios para la supervivencia y/o el éxito reproductivo o bien que las mismas presentan mecanismos fisiológicos que hacen que sus tejidos blanco sean menos sensibles a la señal de cortisol (ver Romero et al., 2008). Tanto las hembras como los machos mostraron niveles incrementados de cortisol durante la época reproductiva, lo cual sugiere que se trató de un período energéticamente demandante para ambos sexos. Sin embargo, los niveles más elevados de cortisol en hembras sugieren que los costos energéticos de la reproducción asociados con la gestación y la lactancia exceden a las demandas energéticas que afrontan los machos vinculadas con la competencia por acceso a hembras. Esto coincide con las evaluaciones de tasas metabólicas de reposo (RMR) realizadas para esta especie, donde las hembras mostraron incrementos marcados durante los períodos de gestación y lactancia respecto de las hembras no reproductivas. Sin embargo, para los machos las RMR no presentaron diferencias entre individuos capturados durante la estación reproductiva y la no reproductiva (Antinuchi et al, 2007). Dantzer et al. (2010) reportaron para la ardilla *Tamiasciurus hudsonicus* mayores niveles de GC fecales en hembras reproductivas que en hembras no reproductivas.

Notablemente, el patrón de variación estacional en los niveles de cortisol reportado para los machos en el presente capítulo contrasta con el observado para el año 2007 (Capítulo I). Este es un resultado de interés en relación a los estudios comparativos de la fisiología del eje HPA en mamíferos, que muestran que el patrón de secreción estacional de GCs difiere según la especie considerada (Romero, 2002, Romero et al., 2008). Los presentes resultados indican la existencia de diferencias entre períodos anuales en el patrón de variación estacional en tuco-tucos. Para el caso

de los machos de *C. talarum*, esto sugiere que los factores ambientales que influyen los niveles de plasmáticos de cortisol (presumiblemente importancia relativa de interacciones sociales, condiciones ambientales microclimáticas de las cuevas y disponibilidad de alimento) variarían de un año a otro.

Estudios previos han reportado diferencias entre sexos en los niveles de GCs, aunque el patrón varía según la especie considerada. En ratas y ratones las hembras presentan mayores niveles basales de corticosterona que los machos (Spinedi et al., 1997; Atkinson y Waddell, 1997). En ardillas de tierra (*Spermophilus saturatus*) y lemmings (*Lemmus trimucronatus*) los niveles de corticosterona fueron 30 % y un orden de magnitud, respectivamente, superiores en hembras que en machos (Boswell et al., 1994; Romero et al., 2008). Sin embargo, Boonstra et al. (2001a) reportaron para ardillas de tierra del Ártico (*Spermophilus parryii*) mayores niveles plasmáticos de cortisol en machos, aunque las hembras respondieron a estrés puntual con mayores incrementos en los niveles de cortisol. Por otro lado, los niveles de GCs fueron similares entre sexos en el roedor caviomorfo *Octodon degus* (Kenagy et al., 1999), en el ratón rayado de África *Rhabdomys pumilio* (Schradin, 2008), en ardillas de tierra *Spermophilus beldingi*, *Spermophilus lateralis* (Nunes et al., 2006) y *Tamias amoenus* (*yellow-pine chipmunks*, Kenagy y Place, 2000; Place y Kenagy, 2000). Las razones de estas diferencias entre especies no se comprenden bien al presente. Los datos disponibles son escasos y se trata de especies que presentan diferencias en su historia de vida y organización social y que habitan ambientes con características diferentes. Por otro lado, el entendimiento de las diferencias en los niveles de GC entre sexos depende en buena medida de la determinación de niveles de GC libres (no unidos a la globulina de unión a GCs, CBG, Breuner y Orchinik, 2002), pero la mayoría de los estudios han reportado niveles totales de GCs. Desde el punto de vista de la regulación fisiológica del eje HPA, las diferencias entre sexos en *C. talarum* en condiciones silvestres podrían deberse a que las hembras secreten mayores niveles de adrenocorticotropina (ACTH) que los machos, ya sea debido a una mayor secreción de hormona liberadora de corticotropina (CRF) y/o arginina vasopresina (AVP) del hipotálamo y/o por mayor sensibilidad de la pituitaria a estas hormonas (Romero, 2006), ya que no se detectaron diferencias entre sexos en la sensibilidad de las glándulas adrenales a ACTH (Capítulo IV).

A pesar de los mayores niveles de cortisol en hembras, ambos sexos respondieron a estrés puntual incrementando los niveles plasmáticos de cortisol

aproximadamente al doble en relación a sus respectivos niveles de base (ver respuesta a estrés de los machos en Capítulo I). Esto sugiere que es el cambio relativo respecto a los niveles de base en un determinado momento el parámetro importante de la respuesta de estrés, no los niveles absolutos de la hormona. Nuevamente, las diferencias entre sexos en las respuestas a estresores dependen según la especie considerada. En ratas, en general, las hembras han mostrado mayores respuestas de corticosterona y ACTH que los machos expuestos a diversos estresores (Ferin, 2006). En ardillas *S. parryii* las hembras respondieron proporcionalmente más que los machos (Boonstra et al., 2001a) a la captura y manipulación mientras que en *T. amoenus* ambos sexos respondieron de manera similar a la captura y manipulación (Kenagy y Place, 2000; Place y Kenagy, 2000).

Los valores bajos en la razón N:L indican que la existencia de variaciones en niveles estrictamente basales de cortisol, reportada para machos en el Capítulo I, puede extenderse también para las hembras. Por lo tanto, los mayores niveles de cortisol en hembras durante el PER estarían reflejando los mayores requerimientos energéticos de la reproducción en un contexto de homeostasis (al menos hasta el mes de diciembre). Sería de interés la determinación de los niveles del cortisol y la razón N:L, conjuntamente con indicadores del balance energético (como peso corporal y niveles de leptina en plasma, Ahima et al., 1996) a fines de la estación reproductiva (febrero-marzo), luego de que las segundas camadas han alcanzado la edad de la dispersión. En este sentido, no se puede descartar que los costos energéticos acumulados de la gestación y lactancia de dos camadas consecutivas produzcan sobrecarga alostática y, por consiguiente, niveles “detectables” de estrés hacia fines de la época reproductiva.

Más allá del rol central de los GCs en la movilización de reservas de energía (Sapolsky et al., 2000), los niveles incrementados en hembras reproductivas pueden estar reflejando, en parte, otras funciones que presentan estas hormonas. Los GCs parecen tener un rol de importancia en la diferenciación de las células secretorias alveolares de la mama en las etapas finales de la lactogénesis. De hecho, se ha reportado que el amamantamiento estimula la secreción de ACTH (y por consiguiente de cortisol) y que las concentraciones de cortisol libre y el número de receptores de GCs se incrementan en tejido mamario durante la lactancia (Akers, 2002). Además, los GC presentan efectos estimulatorios sobre el consumo de alimento en vertebrados (Green et al., 1992; Dallman et al., 1999; Fleur, 2006). Es probable que las hembras deban incrementar el consumo de alimento durante la estación reproductiva para

satisfacer sus demandas energéticas, particularmente en las etapas finales de la lactancia (ver Bronson, 1989). Por lo tanto, los mayores niveles de GCs podrían estar asociados también con la estimulación del forrajeo en hembras reproductivas. En ratones y ratas la lactancia esta asociada con hiperfagia y el consumo de alimento se correlaciona positivamente con el tamaño de la camada (Bronson, 1989). En *C. talarum*, no se ha estudiado si existen incrementos en el consumo de alimento asociado al incremento en demandas energéticas durante la reproducción, aunque sí cambios en preferencias por ítems de alto contenido proteico (del Valle et al., 2001). Asimismo, se ha verificado que la composición corporal de las hembras varía entre ambos períodos, presentando niveles menores de lípidos durante la estación reproductiva (del Valle et al., 2006).

Finalmente, las interacciones del eje HPA con hormonas sexuales también pueden contribuir a las diferencias en los niveles de cortisol entre sexos en condiciones silvestres. Se ha visto que los esteroides sexuales son capaces de modular la actividad basal del eje HPA. El estradiol produce incrementos en los niveles basales de secreción de ACTH y cortisol en primates (Giussani et al., 2000), mientras que la amplitud de las oscilaciones circadianas y los niveles medios de cortisol se reducen luego de una ovariectomía (Smith y Norman 1987). En ratas, las respuestas de ACTH y corticosterona a diversos estresores (inmovilización, ambiente novedoso, shocks eléctricos) se reducen en hembras ovariectomizadas, pero aumentan nuevamente luego de la administración de estrógenos (Viau y Meaney, 1991; Burgess y Handa, 1992; Carey et al., 1995; Rivier, 1999). En contraste, los andrógenos exhiben generalmente efectos inhibitorios sobre el eje HPA. En ratas macho la castración incrementa la actividad basal del eje y las respuestas de ACTH y corticosterona a diversos estresores (Young 1995, Patchev y Almeida, 1998; Seale et al., 2004). En hamsters macho, la castración también aumenta los niveles de GCs (Gaskin y Kitay, 1971) y en monos los niveles de ACTH disminuyen luego de varios días de tratamiento con el andrógeno androstenediona (Giussani et al., 2000).

#### *4.2 Niveles de testosterona en machos silvestres*

Los niveles de testosterona en plasma reportados en este trabajo para machos silvestres de *C. talarum* (hasta 486 ng/mL, Tabla 1) son, probablemente, los más elevados que se han reportados para mamíferos. Estas concentraciones son entre 1 y 3

ordenes de magnitud superiores a los valores reportados para otras especies de roedores como ratas (Retana-Marquez, 2003), ratón (Zielinski y Vandenberg, 1993), ratón rayado africano *Rhabdomys pumilio* (Schradin, 2008), ardillas *Tamias amoenus* (Place y Kenagy, 2000), chanchitos de guinea *Cavia aperea* (Machatschke et al., 2008), el Degu *Octodon degus* (Soto-Gamboa et al., 2005) e incluso la rata desnuda *Spalax ehrenbergi*, que es una especie altamente agresiva (Gottreich et al., 2000). Niveles comparables (119 ng/mL) han sido reportados para murciélagos (Racey y Tam, 1974). Se sabe que altos niveles de testosterona tienen costos asociados como incrementos en el gasto de energía y tasa metabólica (Jewel, 1997; Buck y Barnes, 1999), inmunosupresión (Zuk y McKean 1996; Tanriverdi et al., 2003) y efectos negativos sobre la supervivencia (Jewell, 1997). Sin embargo, las RMR de machos y hembras no reproductivas no presentaron diferencias (Busch, 1989; Antenucci et al., 2007). Además, ambos sexos presentaron niveles similares de respuesta (título de anticuerpos) frente a un desafío inmunológico (inyección intraperitoneal de glóbulos rojos de oveja; Cutrera et al. 2010). Así, es probable que los niveles extremadamente elevados de testosterona en *C. talarum* se expliquen por baja sensibilidad de los tejidos blanco a la hormona (baja afinidad de unión con su receptor). De esta forma, estos resultados sitúan a la especie como un modelo potencial de resistencia a andrógenos. Además, estos datos sugieren una resistencia al *feedback* negativo que ejercen los esteroides sexuales a nivel de hipotálamo y/o pituitaria para ajustar la secreción de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y de gonodotrofinas (hormonas luteinizante o LH, y foliculoestimulante, o FSH, ver Taymans et al., 1997; Ferin, 2006). Sería de gran interés la determinación de niveles de testosterona en machos de otras especies de tuco-tucos. Asimismo, estudios histológicos comparativos entre *C. talarum* y otros roedores podrían aportar información valiosa. Por ejemplo, en marsupiales se ha observado correlación entre la secreción de testosterona y variaciones en el volumen de células Leydig en testículo (Todhunter y Gemmell, 1987).

La mayor parte de la testosterona circula en plasma específicamente unida a la globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG). En general, se considera que solo la fracción no unida a esta proteína transportadora es la disponible para interactuar con los receptores y ejercer su acción a nivel de los tejidos sensibles (Rosner, 1990). Los presentes resultados dan cuenta que *C. talarum* es un modelo interesante para el estudio de la regulación de la testosterona biodisponible a través de SHBG, ya que el

efecto de la hormona sobre los tejidos blanco podría limitarse por medio de elevados niveles de la globulina (Rosner, 1990, Soto-Gamboa, 2005; Buffenstein y Pinto, 2008). De hecho, los resultados presentados en el Anexo de esta tesis sugieren que los niveles de SHBG en machos de *C. talarum* son elevados. Por otro lado, los niveles extraordinarios de testosterona junto con concentraciones relativamente bajas de GCs en la especie plantean la posibilidad de que la testosterona pueda competir de manera significativa con los GCs por sitios de unión a CBG (ver Swett y Breuner, 2008). Durante IER los niveles de testosterona en plasma llegaron a ser 4-6 veces superiores a los de cortisol en algunos de los individuos capturados. Esto implica que, aunque la afinidad de unión de testosterona por CBG sea muy inferior a la del cortisol (posiblemente en el orden de 10 veces menor, Sweat y Breuner, 2008), una fracción significativa de la testosterona podría asociarse a la globulina de unión a GCs.

El patrón de variación estacional para la testosterona fue muy marcado con niveles incrementados durante el IER. Es remarcable que los mayores niveles de testosterona durante julio coincidieron con niveles incrementados de cortisol en los machos. Estos datos sugieren que la frecuencia de interacciones agonísticas entre machos habría alcanzado un pico durante el mes de julio, cuando las hembras comienzan a quedar preñadas (ver Fanjul et al., 2006). Aunque 4 de los animales capturados durante ENR fueron juveniles, la falta de diferencias significativas en los pesos de los individuos capturados durante IER y PER (todos fueron adultos), indica que el patrón de variación de la testosterona no es atribuible a diferencias en el peso de los animales. Por otro lado, no se observó correlación entre la testosterona y el peso corporal para ENR y PER y la misma fue débil para IER. Indudablemente, la determinación de niveles de testosterona libre (no unida SHBG) a lo largo del ciclo reproductivo brindaría información de relevancia acerca de la regulación estacional de este andrógeno (Soto-Gamboa, 2005).

La variación interindividual en sistemas endócrinos puede ser muy grande y, a pesar de ello, suele ser poco considerada (Williams, 2008). Para el caso de la testosterona en *C. talarum*, más allá de las variaciones significativas en los niveles medios, la variación interindividual observada en los niveles de la hormona en animales silvestres fue sumamente importante (por ej. diferencias de hasta 90 veces durante IER, Tabla 1). Durante las tres estaciones del ciclo reproductivo se registraron individuos con valores muy elevados y otros con niveles bajos; algunos por debajo del límite de sensibilidad del ensayo (0,05 ng/mL). De esta forma, muy pocos individuos

presentaron los niveles medios de la hormona. Por lo tanto, el análisis de esta variación es, posiblemente, más interesante aún que la evaluación de la significancia de las diferencias en los niveles medios de la hormona. Se pueden plantear algunas explicaciones para la remarcable variación en los niveles de testosterona en animales silvestres:

(1) Una posibilidad es que la variación interindividual en los niveles de testosterona en plasma no es funcionalmente significativa debido a que la regulación endócrina se produce principalmente por la regulación de la expresión de receptores hormonales y la acción de SHBG o vías de señalización intracelular (Norris, 1997; Ball y Balthazart, 2008). Sin embargo, existen numerosos estudios que indican que las variaciones interindividuales en los niveles de hormonas son funcionalmente significativas y producen variación fenotípica (Williams, 2008). (2) Dado que las determinaciones de hormonas en muestras de plasma son puntuales (es decir, se miden los niveles en el momento de la extracción), la variación interindividual podría ser sobreestimada si los niveles de cada individuo presentan variaciones importantes en el tiempo. Así, las determinaciones de los niveles de la hormona en plasma podrían no reflejar adecuadamente los niveles medios en una ventana temporal más amplia. La determinación de los niveles de testosterona en muestras de heces podría entonces brindar información pertinente ya que, en este caso, se obtiene información integrada sobre la secreción hormonal a lo largo de algunas horas (Touma et al., 2004; Soto-Gamboa et al., 2009). Más allá de esto, estudios previos muestran que hay muy buena correlación entre las determinaciones hormonales en muestras de plasma y heces (Cavigelli y Pareira, 2000, Sheriff et al., 2010) e, indudablemente, diferencias de tal magnitud no pueden ser meramente atribuidas a la técnica de muestreo empleada (3). Alternativamente, los individuos podrían presentar diferente sensibilidad a la testosterona, de tal forma que se requieran niveles diferentes de la hormona para mantener una función fisiológica o de comportamiento (Williams, 2008). (4) Finalmente, el establecimiento de relaciones de dominancia-subordinación en el campo podría contribuir a la variabilidad en los niveles de testosterona. Los machos de *C. talarum* establecen claras relaciones de este tipo en condiciones de semi-cautiverio (Zenuto et al., 2002). En este contexto, los individuos que establecen relaciones dominantes (y presumiblemente mantienen mayores niveles de agresión hacia otros machos y/o acceso a hembras) serían los que mantienen niveles elevados de la hormona, mientras que los que presentan niveles bajos serían subordinados con menor

o nulo acceso a las hembras (Muller y Wrangham, 2004). La mayor heterogeneidad en los niveles de testosterona durante IER (Tabla 1) podría estar entonces relacionada con establecimiento de relaciones de dominancia-subordinación entre machos en este momento del ciclo reproductivo. Las posibilidades planteadas anteriormente no son todas mutuamente excluyentes y, posiblemente, contribuyan en diferente grado a la variabilidad observada en los niveles de testosterona en machos silvestres de *C. talarum*.

Más allá de la importancia bien documentada de la testosterona en la regulación de comportamientos territoriales (Moore, 2007), estudios recientes indican que es conveniente tener en cuenta el posible rol de la dehidroepiandrosterona (DHEA). La DHEA es un precursor inactivo de esteroides sexuales que puede ser convertido a esteroides sexuales activos (andrógenos y/o estrógenos) en tejidos que expresan las enzimas adecuadas (por ej. cerebro, Labrie et al., 2005). De esta forma, es posible que esta pro-hormona pueda presentar algún rol en la regulación de comportamientos territoriales en etapas del ciclo reproductivo cuando los niveles de testosterona en plasma permanecen relativamente bajos, tal como ha sido reportado para ardillas rojas *Tamiasciurus hudsonicus* (Boonstra et al., 2008).

#### 4.3 Niveles de progesterona en hembras silvestres

En primera instancia, el incremento en la exactitud del ensayo luego de calentar las muestras de plasma sugiere que la interferencia observada es de naturaleza proteica. En hystricomorfos se han reportado niveles elevados de PBGs, los cuales reducen la tasa de metabolismo de la hormona circulante durante la gestación (Heap et al., 1981; Louw et al., 1992). Además, la identidad de las globulinas de unión a progesterona presentes en plasma (CBG y PBG) puede diferir en etapas tempranas y tardías de la gestación (Louw et al., 1992). Se ha comprobado que las globulinas de este tipo pueden producir interferencia en inmuno-ensayos (Slaats et al., 1987; Masters y Hähnel, 1989; Tate y Ward, 2004). El mecanismo de la interferencia se encuentra explicado en detalle en el Anexo para el caso de la testosterona. La misma ocurre cuando las concentraciones de las globulinas en las muestras exceden sustancialmente las de los estándares, lo cual produce subestimaciones en los niveles de la hormona medida (Masters y Hähnel, 1989). De esta forma, los incrementos significativos en los niveles medidos de progesterona al calentar las fracciones de plasma (Fig. 2)

concuerdan con un escenario de interferencia por elevados niveles de globulinas de unión a progesterona y sugieren que esta característica es compartida por hembras de *C. talarum*. La menor exactitud del RIA de progesterona respecto del ensayo de testosterona (ver Anexo) probablemente se deba a que el tratamiento con calor produjo una desnaturalización incompleta (o, al menos, insuficientemente) de la PBG. Se ha reportado para el puercoespín (*Hystrix africaeaustralis*) que CBG y PBG difieren en su resistencia al calor, siendo lábil la primera y resistente la segunda (Louw et al., 1992).

Los niveles de progesterona en plasma registrados en este trabajo para hembras silvestres de *C. talarum* son bajos en relación a los valores más elevados reportados durante la gestación para otros hystricomorfos (Heap et al., 1981). Los resultados de los ensayos de enriquecimiento indican que las subestimaciones de los niveles de progesterona no excederían el 25 %, por lo cual estas diferencias no parecen ser atribuibles a errores de medición de la hormona. Más allá de esto, se requieren estudios adicionales para obtener conclusiones de mayor robustez respecto de los niveles de progesterona en hembras silvestres. Dado el bajo tamaño muestral, no fue posible comparar los niveles de progesterona en hembras solo preñadas de las que amamantaban, y de esa forma distinguir si durante la preñez aumenta la progesterona pero luego disminuye durante la lactancia. Además, mayores esfuerzos deben realizarse para comprender el proceso de celo post parto en esta especie que involucra la superposición de ambos procesos y, por lo tanto, un posible compromiso en la dinámica de la progesterona. En *Cricetus cricetus*, Franceschini et al. (2007) reportaron niveles elevados durante la primera preñez, pero menores en situaciones donde la preñez y la lactancia se superponen y niveles más bajos aún bajo lactancia estricta.

#### *4.4 Efectos del cautiverio sobre los niveles de hormonas*

El cautiverio produjo marcadas disminuciones en los niveles de todas las hormonas medidas (cortisol, testosterona y progesterona, Fig. 5). La disminución en los niveles de cortisol en machos registrada en este capítulo puede parecer incongruente con la falta de efecto observada en el Capítulo I. Sin embargo, los datos recopilados en la presente tesis indican que esa diferencia se debe a que los niveles plasmáticos de cortisol disminuyen en individuos mantenidos en cautiverio a una línea

de base entre 15-20 ng/mL, por debajo de la cual, presumiblemente, ya no sería posible mantener un balance homeostático adecuado. Los niveles de base de cortisol en machos silvestres variaron, dependiendo del año y de la estación, entre 20 y 70 ng/mL. Esto implica que el efecto del cautiverio dependerá de los niveles del cortisol en la condición silvestre de origen. Si las concentraciones se sitúan por encima de los 15-20 ng/mL (hembras y machos del presente capítulo), se registra efectivamente el efecto mencionado. En cambio, si los niveles en el campo se encuentran en la mencionada línea de base, ya no se produce una disminución ulterior en los niveles de cortisol cuando los animales son llevados al laboratorio (Capítulo I). Los niveles promedio de cortisol en el campo para los machos utilizados en el presente trabajo para evaluar el efecto del cautiverio fueron de  $25,14 \pm 3,64$  ng/mL, mientras que en el caso del Capítulo I fueron de  $20,78 \pm 6,46$  ng/mL. Esta diferencia es pequeña (en otras estaciones los machos presentaron niveles más elevados) pero fue suficiente para resultar en una diferencia marginalmente significativa al compararse estadísticamente ambos grupos de datos (prueba de Mann-Whitney,  $p = 0,057$ ). Dado que las hembras presentan niveles más elevados de cortisol en el campo, el efecto que se observa sobre las mismas es proporcionalmente mayor (Fig. 5, ver también Capítulo IV). Estos resultados coinciden con la disminución observada en la corticosterona en condiciones de cautiverio en los Capítulos I y IV y también del cortisol en hembras en el Capítulo IV, por lo cual el efecto del cautiverio sobre ambos GCs es robusto. Este patrón es interesante ya que, en principio, se esperaría que los niveles de cortisol se vean incrementados en el cautiverio debido al estrés crónico asociado. Por lo tanto, para el caso de *C. talarum*, estrés puntuales y crónicos pueden producir respuestas opuestas del eje HPA, llegando a inhibirse eventualmente su actividad en el segundo caso. Rich y Romero (2005) reportaron para aves (*Sturnus vulgaris*) que los niveles basales de corticosterona, como así también los incrementos en respuesta a estresores puntuales, se encontraron disminuidos en individuos crónicamente estresados bajo condiciones de cautiverio. Por lo tanto, estados de estrés crónico no necesariamente se encuentran asociados a niveles incrementados de GCs. Estos resultados indican que los estudios que pretenden cuantificar niveles de estrés en poblaciones naturales no deben basarse únicamente en la medición de GCs.

La disminución abrupta en las concentraciones de testosterona durante los primeros 10 días de cautiverio también es atribuible al estrés crónico de los animales durante su aclimatación (ver capítulo II). Se encuentra bien documentado que estados

de estrés crónico producen inhibición en la secreción de hormonas reproductivas (Tilbrook et al., 2000; Ferin, 2006). Además, la falta de interacciones sociales con otros individuos durante el cautiverio puede contribuir a la disminución en la secreción de testosterona (Cavigelli y Pareira, 2000; Calisi y Bentley, 2009). Comportamientos como la defensa de territorios y la competencia por el acceso a hembras, que tienen lugar en el campo pero no en condiciones de cautiverio, ejercen una retroalimentación positiva sobre los niveles de testosterona (los cuales también influyen dichos comportamientos, Wingfield et al., 1990). Cambios en las características de la dieta, como el contenido de carbohidratos, proteínas, grasas y fibras, también pueden producir cambios en la secreción de testosterona (Anderson et al., 1987; Wang et al., 2005). Además, se observó una reducción en la variabilidad interindividual en los niveles de testosterona en condiciones de cautiverio, lo cual sugiere que las diferencias observadas en el campo efectivamente tendrían relevancia biológica.

Niveles basales de andrógenos permiten la función gonadal mientras que niveles mayores ejercen influencia sobre su desempeño territorial (agresión) y de cortejo. Aún cuando los niveles de testosterona bajen tanto al día 10 de cautiverio, esos niveles permitieron evaluar comportamiento de cortejo y cópula (Fanjul y Zenuto, 2008; Zenuto et al. 2007) así como territorial (Zenuto 2010).

La disminución observada en los niveles de progesterona en hembras trasladadas al laboratorio fue muy robusta, con niveles por debajo del límite de detección en la mayoría de las muestras y valores que resultaron, en promedio, mucho menores a los registrados para hembras silvestres. Así, la disminución en las concentraciones de hormonas reproductivas es un fenómeno común a ambos sexos en el laboratorio. Integralmente, estos resultados evidencian la disminución general en la secreción de hormonas esteroides en glándulas adrenales y gónadas y muestran que, desde el punto de vista endocrinológico, los animales son sumamente diferentes bajo condición de campo o cautiverio.

### *Conclusiones*

El presente trabajo muestra que (1) existen marcadas diferencias en los niveles plasmáticos de cortisol en hembras y machos de *C. talarum*, sugiriendo que la función reproductiva en hembras es un condicionante importante para la actividad del eje HPA. (2) Los niveles de testosterona en tuco-tucos macho son extremadamente elevados

(probablemente los más elevados que se han reportado para mamíferos), por lo cual estos resultados también sitúan a *C. talarum* como un modelo de interés para el estudio de la regulación de andrógenos. (3) La transferencia de especies silvestres a condiciones de cautiverio puede tener importantes efectos sobre la endocrinología de las mismas, particularmente sobre los ejes HPA y HPG. (4) Períodos de estrés crónico (cautiverio) pueden producir disminución en los niveles de GCs, efecto opuesto al de estresores puntuales. Por lo tanto, se sugiere que estudios que deseen evaluar niveles de estrés en poblaciones silvestres no deben limitarse únicamente a la medición de GCs

## Capítulo IV

Respuestas del cortisol y la corticosterona a adrenocorticotropina (ACTH) en individuos cautivos y silvestres de *Ctenomys talarum*.



Foto: A. Echeverría

## 1. Introducción

La síntesis y liberación de glucocorticoides (GCs) de la corteza de las glándulas adrenales son controladas por la hormona adrenocorticotropina (ACTH), producida en la glándula pituitaria. La ACTH, por su parte, es regulada por la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y arginina vasopresina (AVP) secretadas por el hipotálamo. Para roedores, dependiendo de la especie, el principal GC secretado puede ser el cortisol (ardillas de tierra del Ártico, Boonstra et al., 2001; Degu: Kenagy et al., 1999) o la corticosterona (ratas, Retana-Marquez et al., 2003; lemingos, Romero et al., 2008), o ambas pueden estar presentes (hamsters: Ottenweller et al., 1985; ardillas: Boswell et al., 1994; Place y Kenagy, 2000; Romero et al, 2008; tuco-tucos: Capítulo I).

La razón de la presencia de más de un GC en estas especies no se comprende bien al presente (Romero et al., 2008). En general, es ampliamente asumido que los roles fisiológicos del cortisol y la corticosterona se solapan y que su importancia relativa dependería de las concentraciones de cada una de éstas en plasma. No obstante, existen también trabajos que indican que ambas hormonas pueden presentar cierta diferenciación en sus roles fisiológicos (Schmidt et al., 2008; Schmidt et al., 2010). Se han reportado patrones diferentes de variación estacional para el cortisol y la corticosterona (Boswell et al., 2004; Capítulo I) y diferencias en la magnitud de sus respuestas a estrés puntual (Romero et al., 2008; Capítulo I). Se ha observado también que la relación entre ambas hormonas puede cambiar luego de la administración de ACTH (Venkateshu y Estergreen, 1970) y que las mismas pueden presentar diferente afinidad de unión a receptores de GCs y diferir en su abundancia relativa en distintos tejidos (Kloet et al., 2002; Schmidt et al., 2010).

Para *Ctenomys talarum* el cortisol y corticosterona mostraron diferentes patrones de variación en animales silvestres a lo largo del ciclo reproductivo y exhibieron diferentes respuestas a estrés puntual (el cortisol respondió y la corticosterona no, Capítulo I). Estos resultados, sugirieron que ambas hormonas muestran una diferenciación en sus roles fisiológicos en tuco-tucos. El hecho que el cortisol responda a positivamente estresores puntuales, pero no la corticosterona, sugiere que el primero sería sensible a la señal de ACTH de la pituitaria mientras que la segunda no, al menos dentro de los márgenes fisiológicos de concentraciones de ACTH de la especie.

Los objetivos del presente trabajo consistieron en: (1) comparar las respuestas del cortisol y la corticosterona a ACTH en individuos cautivos y silvestres de *C. talarum*, determinando si existen diferencias entre sexos, (2) evaluar la dosis de ACTH necesaria para producir una estimulación máxima de secreción de GCs, (3) evaluar la magnitud de los cambios en los niveles de GCs en respuesta a ACTH en relación a otras especies de mamíferos y (4) evaluar si la captura y manipulación de los animales producen una estimulación máxima de las glándulas adrenales a través de la prueba de estimulación con ACTH.

Hipótesis: (1) el cortisol responde en mayor medida que la corticosterona a ACTH, sin existir diferencias significativas entre sexos, (2) la captura seguida de la manipulación en el campo producen una estimulación máxima de la secreción de cortisol en *C. talarum*.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Respuestas del cortisol y la corticosterona a ACTH en cautiverio

Los animales fueron capturados durante mayo y junio de 2010 en la localidad de Mar de Cobo utilizando las trampas de captura viva descritas en el Capítulo III y posteriormente trasladados al laboratorio, donde permanecieron durante 10 días en aclimatación a las condiciones de cautiverio antes de ser utilizados en los experimentos.

Para evaluar en el laboratorio las respuestas del cortisol y la corticosterona en machos y hembras se llevó a cabo una prueba de estimulación de las glándulas adrenales con *cortrosyn*<sup>TM</sup> (*cosyntropin*). La misma es una subunidad sintética de la ACTH que contiene los primeros 24 residuos de aminoácidos de la ACTH natural (desde el N terminal), que son los responsables de la actividad biológica de la hormona. El *cortrosyn* es provisto liofilizado en manitol y debe ser previamente reconstituido en solución fisiológica antes de ser utilizado. A tiempo 0 se tomó una muestra de sangre del seno retro-orbital (en menos de 3 min) para determinar los niveles de base de cortisol y corticosterona en dos grupos de animales (grupo 1: 6 machos y 5 hembras, grupo 2: 4 machos y 3 hembras). Luego, los individuos fueron retornados a sus cajas habituales durante 150 min y, una vez transcurrido este tiempo, fueron inyectados intramuscularmente con dos dosis diferentes de *cortrosyn* (4 IU/kg y

8 IU/kg para los grupos 1 y 2, respectivamente). Luego de transcurridos 30 min de la inyección con *cortrosyn*, se procedió a tomar una segunda muestra de sangre (en menos de 3 min) para la determinación de los niveles post-tratamiento de cortisol para todos los casos y de corticosterona (para la dosis de 4IU/kg) en plasma. La determinación de corticosterona solo para animales inyectados con la dosis de 4IU/kg se debió a limitaciones logísticas relacionadas con la disponibilidad del kit para la medición de la hormona. Dosis de 4-8 IU/kg de ACTH han sido utilizadas en estudios previos en otras especies y han mostrado ser adecuadas para inducir una buena respuesta de secreción de GCs (Boonstra et al., 2001b; Soto-Gamboa et al., 2009; Dantzer et al., 2010). Para los análisis estadísticos, los datos de hembras y machos fueron agrupados ya que no hubo diferencias significativas en los niveles de cortisol ni corticosterona entre sexos bajo condición de cautiverio (ver Resultados).

Control de manipulación: se dispuso de un grupo control de 9 animales para evaluar el efecto de la extracción de la muestra inicial de sangre y la inyección intramuscular sobre los niveles de cortisol a los 180 min de iniciado el procedimiento. Para evaluar el efecto de la extracción inicial de sangre se obtuvo una muestra de sangre de 5 individuos (4 machos, 1 hembra), los cuales permanecieron luego durante 180 min en sus cajas habituales y posteriormente, se les tomó una segunda muestra de sangre para determinarse los niveles de cortisol en plasma. Asimismo, para determinar si la inyección produce algún cambio en los niveles de cortisol se dispuso de 4 animales (2 machos y 2 hembras) con los cuales se procedió de manera idéntica a la descrita para la prueba con *cortrosyn*, pero en este caso los animales fueron inyectados intramuscularmente con 100 µL de solución fisiológica.

## 2.2 Prueba de estimulación de las glándulas adrenales en el campo

La información que provee una prueba de estimulación de las glándulas adrenales realizada en condiciones de campo al momento de la captura de los animales es diferente a la que brinda la misma prueba realizada bajo condiciones de cautiverio (ver Romero 2006). Dado que no es posible evitar el efecto del estrés a lo largo de esta prueba en animales que son capturados en el campo, la prueba realizada bajo estas condiciones no indica la medida en que los animales responden a la dosis administrada de la hormona. En cambio, la misma indica si la captura y manipulación realizadas producen una estimulación máxima de las adrenales o si éstas tienen aún la capacidad

de seguir respondiendo a ACTH exógena (Romero, 2006). Por consiguiente, se puede evaluar también si existen diferencias entre sexos en la respuesta al estrés de la captura y la manipulación posterior. Esto se debe a que si uno de los sexos presenta la capacidad de seguir respondiendo a ACTH exógena mientras que el otro no, el primero no estará respondiendo al máximo mientras que el segundo si. Por lo tanto, esta prueba realizada en condiciones de campo puede brindar información complementaria a la realizada en condiciones de cautiverio.

El protocolo llevado a cabo en este caso fue similar al descrito anteriormente para animales en cautiverio. Se tomaron muestras de sangre de 2 grupos de animales (control: 4 machos y 3 hembras y tratamiento: 4 machos y 3 hembras) dentro de los 5 min de producidas la capturas para obtenerse los niveles de base de cortisol y corticosterona. Luego los animales fueron mantenidos durante 150 min dentro de tubos de PVC (40 cm de largo, 10 cm de diámetro) provistos con pastos del lugar de captura y posteriormente fueron inyectados intramuscularmente con 100  $\mu$ L de solución fisiológica (controles) o el mismo volumen conteniendo 4 IU/Kg de *cortrosyn*. Transcurridos 30 min de realizadas las inyecciones, se tomó a cada animal una segunda muestra de sangre para determinarse los niveles finales de cortisol y corticosterona en plasma. Nuevamente, por las limitaciones en la disponibilidad del kit de corticosterona, los niveles de esta hormona se determinaron solo para los animales tratados con *cortrosyn*. Los pesos de los animales al momento de la captura (necesarios para determinar la dosis correspondiente a cada animal) se determinaron utilizando una balanza Pesola. Los ensayos para la determinación del cortisol y la corticosterona fueron los mismos que los descritos en el Capítulo I. Asimismo, las extracciones de sangre se realizaron como se describe en el Capítulo I.

### 2.3 Análisis estadísticos

Dado que los datos se tomaron sobre los mismos individuos al inicio y al final de los experimentos, los efectos de las pruebas realizadas sobre los niveles de cortisol se evaluaron por medio de ANOVA de dos vías de medidas repetidas. Primeramente, se compararon los niveles de cortisol en machos y hembras al inicio y al final de las pruebas con *cortrosyn*. Los factores fueron “sexo”: (niveles: macho y hembra) y “muestra” (niveles: pre y post inyección). Dado que no hubo ningún tipo de diferencias entre sexos en condición de cautiverio (ver Resultados), los datos fueron

agrupados posteriormente. Para evaluar las respuestas del cortisol en las pruebas en condiciones de cautiverio, los factores fueron “dosis” (niveles: 4 y 8 IU/kg) y “muestra” (niveles: pre y post inyección). Para la prueba en condición de campo, los datos fueron estratificados por sexo debido a las diferencias en los niveles de cortisol en esta condición. Para evaluar las respuestas del cortisol en la prueba en condición de campo los niveles fueron “tratamiento” (niveles: sn. fisiológica y *cortrosyn*) y “muestra” (niveles: pre y post inyección). Los niveles al inicio y al final de los experimentos del cortisol en animales controles para la prueba de laboratorio y la corticosterona en la prueba con 4 IU/kg en laboratorio y en campo fueron comparados mediante pruebas de *t* apareadas (Zar, 1984). Los resultados se reportan como promedio  $\pm$  error estándar (ES).

### 3. Resultados

#### 3.1 Prueba de estimulación de las glándulas adrenales en cautiverio

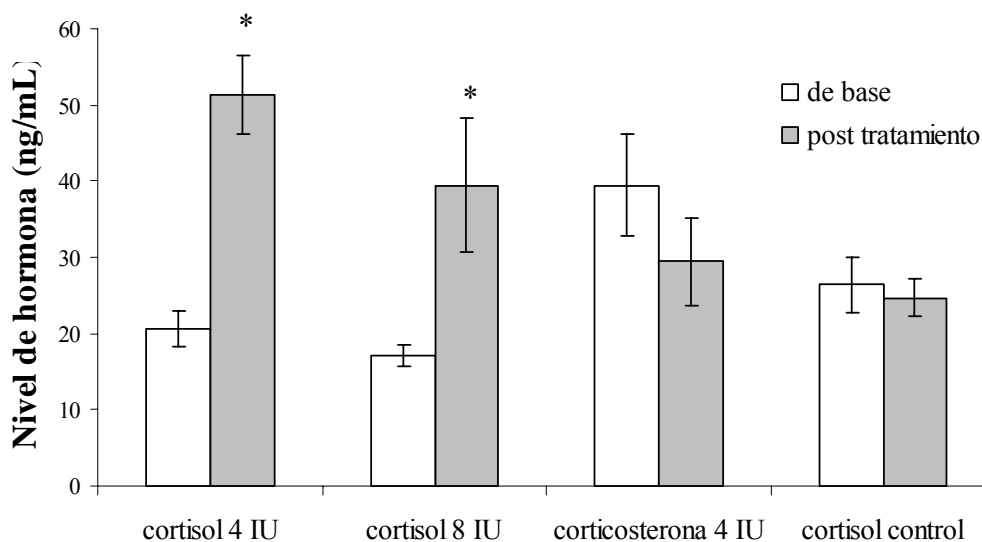
La extracción inicial de sangre no produjo ningún cambio detectable en los niveles de cortisol luego de 180 minutos de iniciado el procedimiento (prueba de *t* apareada:  $t = 0,86$ ;  $gl = 4$ ,  $p = 0,43$ , Fig. 1). Tampoco hubo diferencias significativas entre los niveles de cortisol iniciales y a los 180 min de iniciada la prueba en animales controles inyectados con solución fisiológica (prueba de *t* apareada:  $t = 0,43$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0,70$ , Fig. 1). Estos resultados indican que el protocolo utilizado permite evaluar adecuadamente en el laboratorio las respuestas de las glándulas adrenales a las 2 dosis utilizadas de *cortrosyn*.

No se observaron diferencias significativas entre sexos en los niveles de cortisol pre y post inyección de *cortrosyn* para ninguna de las dos dosis utilizadas (ANOVAs de dos vías de medidas repetidas: dosis de 4 IU/kg:  $F_{9,21} = 0,59$ ;  $p = 0,46$ ; dosis 8 IU/Kg:  $F_{5,13} = 2,93$ ;  $p = 0,15$ ), ni diferencias en la magnitud de la respuesta (no interacción entre “sexo” y “muestra”: dosis de 4IU/kg:  $F_{9,21} = 0,56$ ;  $p = 0,47$ ; dosis 8 IU/Kg:  $F_{5,13} = 3,27$ ;  $p = 0,13$ ). Por este motivo, los datos de machos y hembras fueron agrupados para los análisis posteriores.

Ambas dosis de *cortrosyn* produjeron incrementos significativos en los niveles de cortisol en plasma (ANOVA de dos vías de medidas repetidas:  $F_{16,35} = 42,14$ ;  $p < 0,001$ ). Sin embargo, los niveles de cortisol post inyección no presentaron diferencias

significativas entre las dosis de 4 y 8 IU/kg (ANOVA de dos vías de medidas repetidas:  $F_{16,35} = 1,99$ ;  $p = 0,17$ ). Los niveles de cortisol post inyección fueron 2,48 y 2,32 veces superiores a los iniciales para las dosis de 4 y 8 IU/kg, respectivamente. No se observó una interacción significativa entre “muestra” y “dosis” (ANOVA de dos vías de medidas repetidas:  $F_{16,35} = 1,17$ ;  $p = 0,29$ ).

Los niveles de corticosterona en este grupo de animales cautivos fueron notoriamente más elevados a los registrados en el Capítulo 1 (niveles pre-inyección:  $39,46 \pm 6,69$  ng/mL; rango: 7,2-62,7 ng/mL), debido a que los niveles de corticosterona en campo se encontraban muy elevados durante 2010 (ver más abajo) sin haber diferencias entre sexos (prueba t,  $p = 0,99$ ). De hecho, los niveles de corticosterona al inicio de la prueba fueron significativamente mayores a los de cortisol en este grupo de animales (prueba t apareada,  $t = 2,40$ ;  $gl = 7$ ;  $p = 0,047$ ). En contraste a lo observado para el cortisol, no se observó ningún efecto de la inyección *cortrosyn* sobre los niveles plasmáticos de corticosterona (prueba de t apareada,  $t = 1,23$ ;  $gl = 7$ ;  $p = 0,26$ , Fig. 1). De esta forma, se produjo un incremento de 4 veces en la relación cortisol/corticosterona en plasma luego de realizada la prueba (relación de 0,48 vs 1,92 pre y post inyección de *cortrosyn*, respectivamente).



**Figura 1.** Prueba de estimulación de las glándulas adrenales en *C. talarum* bajo condiciones de cautiverio. Se obtuvo una muestra de sangre a tiempo 0 para determinarse los niveles de base de cortisol y corticosterona en plasma y luego los animales fueron inyectados intramuscularmente con 4 u 8 IU/kg de *Cortrosyn* (análogo sintético de ACTH) o solución fisiológica (control). \* indica diferencias significativas,  $p < 0,05$ .

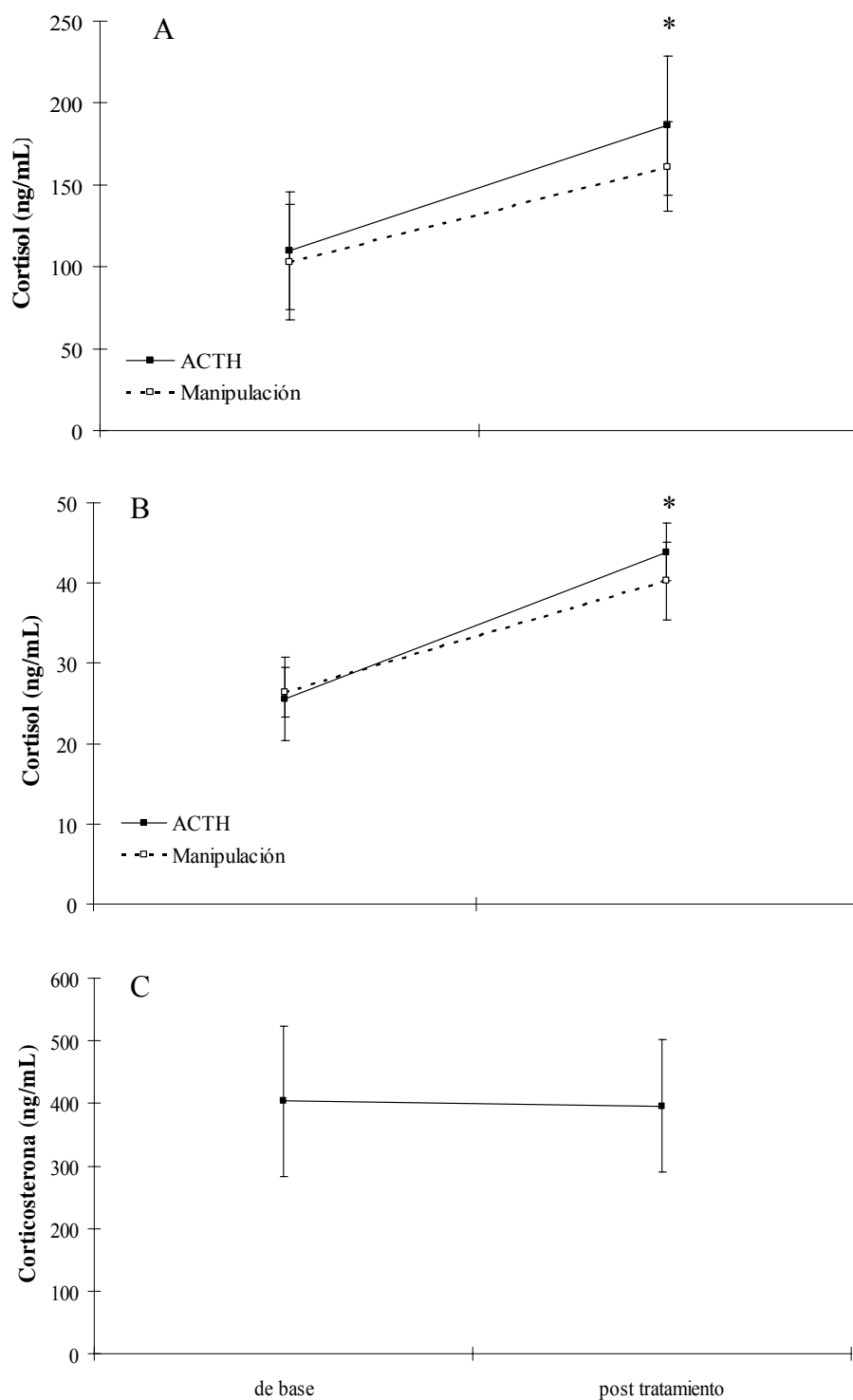
### 3.2 Prueba de estimulación de las glándulas adrenales en el campo

Como se esperaba, de acuerdo a lo reportado en el Capítulo III, los niveles de base de cortisol en plasma fueron significativamente mayores en hembras ( $106,77 \pm 23,3$  ng/mL) que en machos ( $24,14 \pm 3,17$  ng/mL; Mann-Whitney:  $p < 0,001$ ). Para las hembras, se registraron incrementos significativos en los niveles de cortisol en animales inyectados con *cortrosyn* y también con solución fisiológica (ANOVA de dos vías de medidas repetidas:  $F_{5,13} = 40,47$ ;  $p < 0,001$ , Fig. 2A). De hecho, los niveles de cortisol post-inyección no presentaron diferencias significativas entre hembras inyectadas con solución fisiológica u hormona (ANOVA de dos vías de medidas repetidas:  $F_{5,13} = 0,09$ ;  $p = 0,77$ ; Fig. 2A). Tampoco se detectó interacción entre ambos factores (ANOVA de dos vías de medidas repetidas:  $F_{5,13} = 0,71$ ;  $p = 0,44$ ), lo cual significa que las respuestas del cortisol en hembras tratadas con solución fisiológica y *cortrosyn* fueron similares en este contexto. Los resultados fueron los mismos para el caso de los machos. Los niveles de cortisol aumentaron significativamente para individuos inyectados con *cortrosyn* y con solución fisiológica (ANOVA de dos vías de medidas repetidas:  $F_{5,13} = 22,27$ ;  $p = 0,005$ ) y no se observaron diferencias significativas en los niveles post tratamiento en ambos casos ( $F_{5,13} = 0,07$ ;  $p = 0,79$ ; Fig. 2B). Tampoco se observó interacción entre factores ( $F_{5,13} = 0,42$ ;  $p = 0,54$ ). Estos resultados indican que la captura, seguida de la manipulación efectuada durante el ensayo, producen una estimulación máxima del eje HPA a las 3 hs de iniciado el estrés en ambos sexos, ya que la administración del análogo de ACTH no produjo mayores aumentos en los niveles de cortisol. A pesar de los mayores niveles de cortisol en hembras que en machos, la proporción de aumento respecto de los niveles de base fue similar para ambos sexos, tanto para individuos inyectados con el análogo de ACTH (hembras: 1,69; machos: 1,71), como para animales inyectados con solución fisiológica (hembras: 1,56; machos: 1,52).

Los niveles de corticosterona en plasma se encontraron sumamente incrementados respecto de los valores reportados para animales silvestres durante 2007 y 2008 (Capítulo I). Los niveles de base de corticosterona fueron de  $403,47 \pm 120$  ng/mL y no hubo diferencias significativas entre machos y hembras (prueba t,  $t = 0,40$ ;  $p = 0,70$ ). Teniendo en cuenta que los niveles de corticosterona reportados para animales silvestres en el Capítulo I variaron entre 15 y 25 ng/mL, esto supone aumentos de entre 16 y 27 veces las concentraciones esta hormona para los animales

capturados en 2010. Remarcablemente, uno de los machos capturados tuvo 980 ng/mL de corticosterona en plasma, el cual es un valor muy superior a todas las concentraciones registradas previamente para los dos GCs.

Los niveles de corticosterona previos a la administración de *cortrosyn* no fueron significativamente diferentes a los registrados luego de la inyección (prueba *t* apareada,  $t = 0,16$ ;  $gl = 6$ ;  $p = 0,87$ ). Esta falta de respuesta es particularmente significativa desde el punto de vista fisiológico, ya que además del tratamiento hormonal, múltiples estresores relacionados con la captura y manipulación durante el ensayo operaban sobre los animales a lo largo de esta prueba. La relación cortisol/corticosterona en plasma para hembras fue de 0,31 y 0,52 al inicio y al final de la prueba, respectivamente. Para el caso de los machos, esta relación tuvo valores sumamente bajos: 0,05 y 0,09 al inicio y al final de la prueba, respectivamente. De esta forma, aunque el cortisol respondiera positivamente en ambos sexos, los niveles de corticosterona post-tratamiento fueron 1,92 y 10,18 veces mayores a los de cortisol en hembras y en machos, respectivamente.



**Figura 2.** Prueba de estimulación de las glándulas adrenales realizada en el campo al momento de la captura. Se obtuvo una muestra de sangre a tiempo 0 para determinarse los niveles de base de cortisol y corticosterona y luego los animales fueron inyectados intramuscularmente con 4 IU/kg de  *cortrosyn* (análogo sintético de ACTH) o solución fisiológica (control de manipulación). Los datos se encuentran separados por sexo para el cortisol (hembras: panel A, machos: panel B) debido a las diferencias en los niveles de este GC en animales silvestres (notar cambio de escala en ejes y de ambos paneles). Para la corticosterona los datos de ambos sexos se encuentran agrupados (panel C). \* indica diferencias significativas,  $p < 0,05$ .

## Discusión

### 4.1 Pruebas de estimulación de las glándulas adrenales

Los resultados del presente trabajo muestran que en *C. talarum* el cortisol responde a la estimulación de las glándulas adrenales con ACTH mientras que la corticosterona no presenta ninguna respuesta. Este resultado, esperado teniendo en cuenta la falta de respuesta de la corticosterona a estrés puntual (Capítulo I), confirma que existen diferencias en la regulación fisiológica de ambas hormonas y suma evidencia adicional en favor de la diferenciación de roles de ambas hormonas en esta especie. Así, la regulación de los niveles de corticosterona en sangre se llevaría a cabo a través de la acción de otra/s hormona/s sobre las glándulas adrenales, diferente de la ACTH (ver más abajo *Niveles de corticosterona en animales silvestres durante 2010*),

En condiciones de cautiverio, la estimulación de las glándulas adrenales con 4 IU/Kg de *cortrosyn* mostró ser efectiva para inducir la secreción de cortisol, produciendo incrementos significativos a los 30 min de administrado (2,5 veces respecto de los niveles de base, Fig. 1). No se registraron mayores incrementos en los niveles de cortisol al duplicar la dosis administrada, lo cual indica que la dosis de 4 IU/Kg fue suficiente para producir una máxima respuesta de secreción de la hormona. Debido a que las determinaciones de cortisol y corticosterona fueron realizadas a partir de las mismas muestras de plasma, estos resultados muestran que los animales incrementaron los niveles de cortisol mientras que mantenían estables sus niveles de corticosterona. Las comparaciones de las respuestas del cortisol y la corticosterona a tratamientos con ACTH son escasas en la bibliografía. Esto se debe, al menos en parte, a que se asume generalmente que el GC predominante en plasma es el de mayor importancia fisiológica y los estudios se focalizan únicamente en éste. Venkateshu y Estergreen (1970) reportaron para bovinos una respuesta positiva del cortisol junto con disminuciones significativas en los niveles de corticosterona en plasma. En hurones (*Mustela putorius*) ambos GCs incrementaron significativamente sus niveles en respuesta a administración de ACTH y, aunque el cortisol fue predominante en plasma, la corticosterona respondió con incrementos proporcionalmente mayores (Rosenthal et al., 1993). Tomados en conjunto, estos resultados enfatizan la diferenciación en las respuestas exhibidas por el cortisol y la corticosterona luego de la estimulación con ACTH.

La falta de efecto de la manipulación sobre el cortisol (animales controles en laboratorio) indica que, en condición de cautiverio, los cambios observados en los niveles de cortisol son solo atribuibles a la ACTH administrada. En el Capítulo I se reportó la falta de respuesta de la corticosterona a estresores puntuales, por lo tanto, en el contexto de una respuesta fisiológica integral. Aún cuando se asume ampliamente que los cambios en los niveles de GCs durante una respuesta a estrés puntual están mediados únicamente por la ACTH, recientemente se han reportado que existen estímulos independientes de ACTH que pueden ejercer regulación de los GCs a nivel de las adrenales (Bornstein et al., 2008). Los mismos incluyen neuropéptidos, neurotransmisores, opioides, factores de crecimiento, citocinas, etc; para los cuales se han encontrado receptores en las células adrenocorticales. Por lo tanto, no se puede descartar que en el contexto de una respuesta fisiológica integral a estrés puntual los cambios en los niveles de cortisol sean mediados también por mecanismos independientes de ACTH.

Los resultados disponibles indican que la capacidad de las adrenales de responder a ACTH exógena con incrementos en los niveles de GCs es sumamente variable entre especies. Respuestas muy pronunciadas fueron reportadas recientemente para ratas (Campbell et al., 2009) y ñandúes (*Rhea americana*, Lèche et al., 2009) con incrementos en los niveles de corticosterona de hasta 40 y 60 veces, respectivamente, luego de la estimulación con ACTH. En bovinos se han reportado incrementos mucho más modestos en los niveles de cortisol (algo más del 200 %, Venkateseshu y Estergreen, 1970). Incrementos máximos en los niveles de cortisol libre, de 4 y 2 veces respecto de los niveles de base, fueron reportados para ardillas de tierra del Ártico (*Spermophilus parryii*, Boonstra et al., 2001b) y liebres (*Lepus americanus*, Boonstra et al., 1998), respectivamente. Para aves (*Passer domesticus*) las respuestas máximas de corticosterona fueron proporcionalmente menores a las observadas en *C. talarum* (Romero, 2006). De esta forma, *C. talarum* se encuentra entre los organismos que exhiben las respuestas más moderadas a la hormona. La mayoría de los estudios en mamíferos han utilizado la prueba de estimulación de las glándulas adrenales para validar protocolos de medición de metabolitos de GCs en heces (Hunt et al., 2004; Touma et al., 2005; Soto-Gamboa et al., 2009), por lo que no es adecuado comparar las respuestas obtenidas en el presente trabajo con los mismos.

Los resultados de la prueba de estimulación con *cortrosyn* en el campo muestran que la captura seguidas de la manipulación efectuada produjeron una estimulación

máxima del eje HPA. Esto se debe a que los animales inyectados con solución fisiológica incrementaron sus niveles de cortisol de forma similar los tratados con la dosis de 4 IU/Kg de *cortrosyn*.

#### 4.2 Niveles de corticosterona en animales silvestres durante 2010

Los niveles de corticosterona en plasma registrados para animales silvestres durante 2010 (hasta 980 ng/mL) constituyen un resultado absolutamente inesperado. Estos niveles excedieron a los del cortisol, en el caso de los machos más de un orden de magnitud, incluso luego de la estimulación con ACTH. De esta forma, estos resultados contrastan notablemente con los obtenidos para los años 2007-2008 y suman información de importancia a las variaciones estacionales registradas para ambos GCs a lo largo de la presente tesis. Particularmente, estos datos resaltan aspectos que no son tenidos en cuenta en estudios sobre la fisiología del eje HPA en animales silvestres, indicando que (1) la relación cortisol/corticosterona en plasma puede cambiar drásticamente para distintos períodos anuales en una especie dada, por lo cual las conclusiones que puedan obtenerse en relación a la importancia relativa y roles de ambas hormonas podrían llegar a diferir dependiendo del momento en el cual se realiza el estudio. Así, para los estudios que se llevan a cabo en campo es aconsejable el abordaje de escalas temporales más extensas a la de un ciclo reproductivo con el fin de poder cubrir la heterogeneidad que pueda tener lugar a lo largo de diferentes ciclos anuales. (2) No necesariamente el GC predominante en plasma presenta un rol en la respuesta a estrés puntual y es sensible a la estimulación por ACTH. Esto es algo que se asume ampliamente en estudios sobre especies silvestres (ver Kenagy y Place, 2000, Boonstra et al., 2010; Romero et al., 2008). De hecho, es posible que en el futuro la generalización de definir conjuntamente como “glucocorticoide” al cortisol y la corticosterona deba ser revisada ya que implica la equiparación de los roles de las dos hormonas (ver *Conclusiones Finales* de la presente tesis). (3) Teniendo en cuenta el cambio drástico en los niveles corticosterona, los datos sugieren que la hormona efectivamente presenta un rol de importancia en *C. talarum*, y que no se trata meramente de un subproducto de vías de biosíntesis de esteroides en las glándulas adrenales. De esta forma, estos datos enfatizan la importancia de profundizar sobre el estudio de la corticosterona en tuco-tucos y plantean las siguientes preguntas que merecen ser objeto de futuros estudios: (a) ¿Cual es/son el/los rol/roles de la

corticosterona en *C. talarum*? (b) ¿A que factor/factores ambientales responde? (c) ¿De que manera se lleva a cabo la regulación fisiológica de sus niveles? (d) ¿Presentan los tuco-tucos diferentes receptores para el cortisol y la corticosterona? (e) ¿Actúan el cortisol y la corticosterona específicamente a nivel de diferentes tejidos? y finalmente (f) ¿Son los niveles de corticosterona registrados durante 2007-2008 más o menos representativos para *C. talarum* que los registrados durante 2010?

(a-b) En el Capítulo I se mencionaron los posibles roles de la corticosterona en la regulación del apetito y como mineralocorticoide. Existen abundantes evidencias que indican que los GCs pueden estimular la absorción de sodio en distintas zonas de los túbulos renales e intestino (Agarwal y Mirshhi, 1999) y que también presentan efectos estimulatorios sobre el consumo de alimentos en roedores (Fleur, 2006), por lo que es factible que el rol de la corticosterona en *C. talarum* pueda relacionarse con una de estas funciones, o ambas.

(c) En el contexto del posible rol de la corticosterona en el balance hídrico y salino, puede esperarse que la misma sea regulada por el sistema renina-angiotensina. Se sabe que la angiotensina II, además de estimular la secreción de aldosterona, activa la secreción de cortisol y corticosterona de células de las zonas *fasciculata* y *reticularis* de las adrenales en ratas (Cade y Perenich, 1965) y bovinos (Bird et al., 1989; Rainey et al., 1991). Por su parte, se ha reportado que los GCs potencian efectos de la angiotensina II (como el aumento en el consumo de agua, Summers et al., 1991), por lo que funcionan cooperativamente para el mantenimiento de la homeostasis de los fluidos corporales, ejerciendo regulación positiva del sistema renina-angiotensina (Satura, 1996; Shelat et al, 1999). De hecho, la aldosterona es sintetizada directamente a partir de la corticosterona, por lo cual incrementos en la síntesis de la primera requieren de aumentos en la conversión de pregnenolona a corticosterona previamente (Nelson, 2005).

En el contexto del rol de la corticosterona en la estimulación del apetito, la misma podría ser regulada por interacciones con otras hormonas vinculadas con el balance energético. Una posibilidad es su regulación a través de la leptina (Ahima et al., 1996), ya que hay evidencias que indican esta hormona puede ejercer efectos sobre los niveles de GCs a nivel de las glándulas adrenales (Borstein et al., 1997).

Más allá de las posibilidades mencionadas previamente, las razones del incremento de 20 veces en los niveles de corticosterona en 2010 en animales silvestres no son obvias. Los pesos de los animales capturados cuando se realizó la prueba en el

campo fueron de  $172,70 \pm 7,31$  g y  $108,95 \pm 2,63$  g para machos y hembras, respectivamente y la condición general de los individuos era buena (F. Vera, observación personal), lo cual hace difícil pensar que los animales estaban padeciendo hambre. En el escenario alternativo, los cambios drásticos en los niveles de corticosterona estarían asociados a variaciones en los niveles de sodio y/o potasio en sangre. Para esta población de *C. talarum* una fuente posible de variación en la ingesta de sodio es el spray marino ya que se trata de una población situada a unos 200 metros de la línea de costa. De acuerdo con esta hipótesis, los cambios en los niveles de corticosterona podrían ser la consecuencia de variaciones en la ingesta de sodio ocasionada por la depositación del spray marino sobre la vegetación (así una ingesta importante de sodio produciría disminuciones en los niveles de corticosterona). Además, dado que estos animales obtienen el agua exclusivamente de la vegetación que consumen, variaciones en el contenido de agua de la vegetación podrían estar relacionadas con cambios en los niveles de la corticosterona.

(d-e) Los diferentes efectos fisiológicos del cortisol y la corticosterona pueden ocurrir si ambas hormonas se unen a diferentes receptores o inducen diferentes cambios conformacionales en el mismo receptor. Schmidt et al. (2010) examinaron las afinidades de unión del cortisol y la corticosterona a receptores de corticosteroides intracelulares (receptor de glucocorticoides: GR y de mineralocorticoides: MR) y asociados a membranas (mCR) en aves y encontraron que ambas hormonas presentan diferente afinidad de unión a estos receptores y que esto difiere según el tejido estudiado. Existen también trabajos que muestran que la identidad del GC predominante puede ser específica de cada tejido (Kloet et al., 2002; Schmidt y Soma, 2008; Schmidt et al., 2010). Considerando los resultados presentados en esta tesis, es factible que el cortisol y la corticosterona también difieran en su afinidad de unión con receptores específicos en tuco-tucos.

## Conclusiones

El presente trabajo indica la existencia de diferencias en la regulación fisiológica del cortisol y la corticosterona en *C. talarum*. Así, el cortisol presentó la respuesta esperada para un GC a la estimulación con ACTH (el incremento de su concentración), mientras que no se registró ninguna respuesta para el caso de la corticosterona. De esta forma, estos resultados aportan más información en favor de la diferenciación de los

roles fisiológicos de ambas hormonas en tuco-tucos. Por otro lado, los presentes resultados enfatizan la existencia de cambios muy remarcables en los niveles de corticosterona para diferentes períodos anuales, lo cuales producen variaciones igualmente importantes en la razón cortisol/corticosterona en plasma. Estos resultados indican que se deben realizar estudios que comprendan escalas temporales más extensas a la de un ciclo anual para obtenerse conclusiones confiables respecto de la presencia de ambas hormonas en las especies de interés.

**Anexo**  
**Capítulo III**

**Validación de un radioinmunoensayo (RIA) para la  
determinación de niveles de testosterona en muestras de  
plasma de *Ctenomys talarum*.**



## 1. Introducción

El uso de kits comerciales para la determinación de niveles de hormonas en muestras de plasma, tejidos o heces requiere de una validación especie-específica. Aunque estos kits están extensivamente validados por los fabricantes para su uso en humanos y animales de laboratorio, sustancias presentes en el plasma de especies no estudiadas pueden producir interferencia en los ensayos (Newman et al., 2008a; Newman et al., 2008b), incrementando o disminuyendo falsamente las concentraciones del analito de interés (Selby, 1999). Fuentes endógenas de interferencia en muestras de plasma incluyen hemólisis, lipemia, anticuerpos heterófilos, proteínas (como albúmina, fibrinógeno o globulinas transportadoras de esteroides) o sustancias con epítopes inmunoreactivos similares que disminuyen la especificidad del ensayo (Selby, 1999; Tate y Ward, 2004; Dimeski, 2008). Entre los procedimientos comúnmente utilizados para validar un ensayo se encuentran (a) la evaluación del paralelismo, (b) ensayos de enriquecimiento con cantidades conocidas de hormona para evaluar la exactitud del mismo y (c) extracciones con solventes para separar el analito medido de las moléculas que puedan generar interferencia (Newman et al., 2008a, Soto-Gamboa et al., 2009). Además, es deseable realizar también una validación fisiológica (esto es, medir la respuesta de la hormona a un tratamiento que afecta sus niveles) para demostrar que el ensayo es capaz de detectar cambios biológicamente relevantes en los niveles de la misma (Soto-Gamboa et al., 2009). Por otro lado, los niveles de la hormona a medirse pueden diferir considerablemente en animales silvestres en relación a humanos o animales de laboratorio. Esto puede resultar en cambios conjuntos en los niveles de componentes del plasma asociados con la hormona (como globulinas transportadoras), saturación del ensayo (si los niveles son comparativamente elevados) o baja capacidad del ensayo para distinguir variaciones finas, pero biológicamente relevantes, si los niveles son comparativamente bajos.

El objetivo del presente trabajo consistió en validar un radioinmunoensayo (RIA) para la determinación de los niveles de testosterona en muestras de plasma de *C. talarum*, como herramienta a utilizarse en estudios ecofisiológicos que permitan una integración entre el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), estacionalidad, comportamiento y hormonas reproductivas.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 RIA para testosterona

Se utilizó un RIA comercial (Coat-a-Count<sup>®</sup> Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, California) desarrollado para cuantificar niveles de testosterona en muestras de plasma y orina. Se trata de un RIA de fase sólida en el cual testosterona marcada con <sup>125</sup>I compete con la testosterona en la muestra por sitios de unión a anticuerpos específicos. Los tubos de calibración contienen 0; 0,2; 1; 4; 8 y 16 ng/mL. El límite de detección de ensayo es 0,05 ng/mL. La reactividad del anticuerpo utilizado con otras moléculas estructuralmente similares es muy baja.

### 2.2 Validación del ensayo

#### 2.2.1 Paralelismo

En primer término se examinó el paralelismo entre la curva estándar del ensayo y diluciones seriadas de 7 muestras de plasma. Cada una de estas muestras se obtuvo utilizando plasma de 2-4 individuos para lograr un volumen suficiente. Cuatro de estas muestras (muestras A-D) se obtuvieron a partir de plasmas de animales que habían permanecido en cautiverio durante 4-15 días, mientras que las restantes (muestras E-G) se obtuvieron a partir de muestras de plasma tomadas en el campo. Las diluciones fueron realizadas con buffer PBS (PH 7). Se realizó una determinación inicial del contenido de testosterona de las muestras y luego los porcentajes de dilución se calcularon para cada muestra en función de la cantidad de hormona medida.

Dado que 6 de las 7 diluciones seriadas mostraron desviaciones significativas respecto de un comportamiento paralelo, se sospechó la presencia de interferencia del plasma en el ensayo (ver Resultados). Para evaluar si el desempeño del ensayo podía mejorarse por medio del tratamiento de las muestras con calor, se calentaron 2 muestras de plasma (56° C, 30 min) y luego se realizaron diluciones seriadas de las mismas. Como controles se realizaron las mismas diluciones a alícuotas de estas muestras que no fueron tratadas con calor.

Además, se determinaron los niveles de testosterona en muestras de plasma obtenidas de 4 hembras al segundo día de cautiverio, pero estas concentraciones se encontraron por debajo del límite de detección del ensayo (0,05 ng/mL).

### *2.3 Ensayos de enriquecimiento y recuperación*

Se determinaron los porcentajes de recuperación de cantidades conocidas de testosterona que fueron agregadas a muestras de plasma previamente calentadas y diluidas 1:2. Las muestras fueron enriquecidas con dos soluciones de testosterona conteniendo 14 y 7 ng/mL (soluciones 1 y 2, respectivamente) y luego se determinaron los porcentajes de recuperación considerando las concentraciones de testosterona medidas en fracciones no enriquecidas de estas mismas muestras (también calentadas y diluidas 1:2). Brevemente, se diluyeron 4 g de testosterona (*Steraloids Inc*) en 4 mL de etanol absoluto y luego se realizaron diluciones seriadas con buffer PBS (PH 7) hasta obtener las soluciones mencionadas.

### *2.4 Análisis estadísticos*

El paralelismo de las diluciones seriadas de plasma respecto de la curva estándar del ensayo se evaluó por medio de pruebas de *t* para igualdad de pendientes (Zar, 1984). Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  ES.

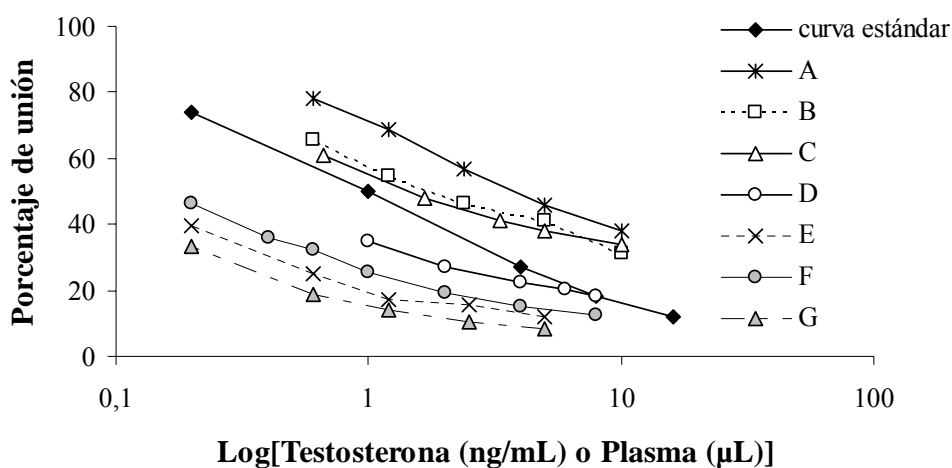
## **3. Resultados**

### *3.1 Paralelismo de muestras de plasma no calentadas*

(1) Se registraron concentraciones de testosterona elevadas en las 3 muestras de plasma obtenidas de animales silvestres. Dos de estas presentaron concentraciones en el límite superior de la curva estándar (muestras E y F con 14,64 y 15,42 ng/mL, respectivamente) y la restante por encima del calibrador más alto (muestra G, valor obtenido por extrapolación de la curva  $\sim$ 27,2 ng/mL, Tabla 1). Las muestras obtenidas utilizando plasma de animales que permanecieron en cautiverio durante 4-15 días presentaron valores entre 1,94 y 7,91 ng/mL (Tabla 1). Por lo tanto, la varianza de los datos fue alta, con una diferencia de 14 veces entre la muestra que presentó el valor de

concentración más alto y la que presentó el valor más bajo. Además, las concentraciones medidas fueron más altas en muestras tomadas en el campo en comparación con las tomadas en animales cautivos.

(2) Con una sola excepción (muestra A), las curvas de dilución obtenidas no presentaron un comportamiento paralelo respecto de la curva estándar del ensayo (valores  $p < 0,05$ ; Fig. 1, Tabla 1). Estas desviaciones del paralelismo se debieron a que las curvas tienden a volverse asintóticas hacia las fracciones con mayor contenido de plasma (Fig. 1), lo cual implica que los niveles de testosterona estimados de fracciones diluidas son mayores que los valores medidos en muestras plasma sin diluir (Tabla 2).



**Figura 1.** Paralelismo de 7 muestras de plasma respecto de la curva estándar del RIA de testosterona. Con la excepción de la muestra A, que muestra muy buen paralelismo, las curvas tienden a ser asintóticas hacia las fracciones con mayor contenido de plasma, alejándose significativamente de un comportamiento paralelo.

**Tabla 1.** Grado de paralelismo para las 7 muestras de plasma ensayadas, expresado como el valor p de una prueba *t* para igualdad de pendientes.

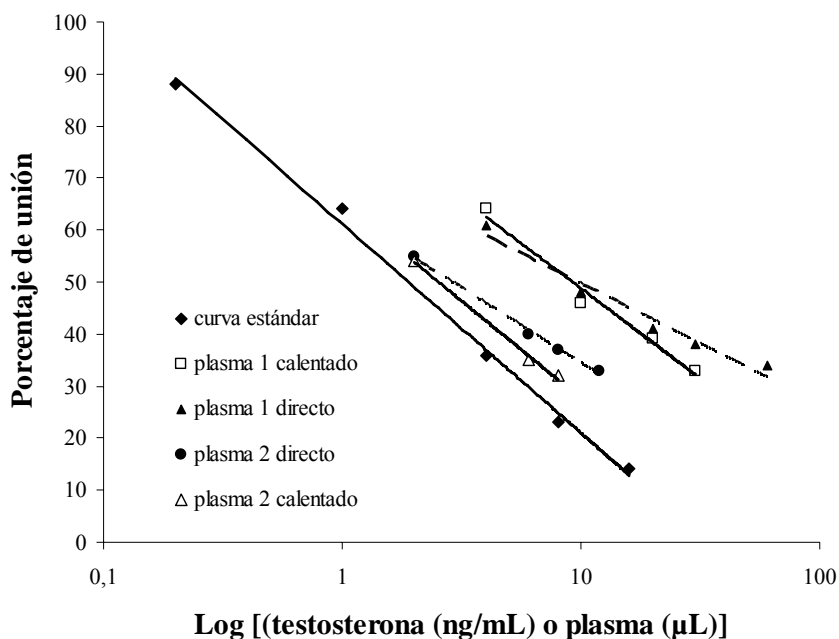
Plasma	T medida en muestra sin diluir (ng/mL)	p
A	1,94	0,98
B	3,1	0,03
C	4,28	0,02
D	7,91	$6,26 \cdot 10^{-04}$
E	14,64	$1,64 \cdot 10^{-03}$
F	15,42	0,01
G	27,2	$5,46 \cdot 10^{-03}$

**Tabla 2.** Concentraciones de testosterona estimadas a partir de diferentes diluciones de las muestras de plasma F y G, las cuales se toman como ejemplos.

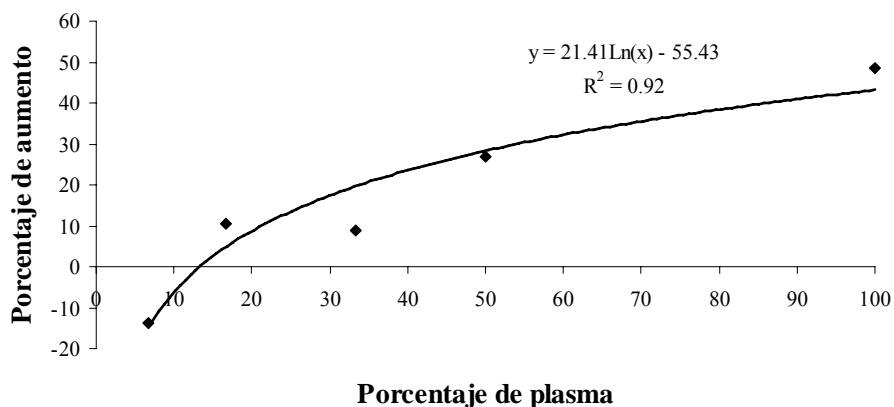
Muestra	Dilución	Testosterona (ng/mL)
F	ninguna	14,64
	1:2	21,6
	1:4	28,6
	1:8	34,96
	1:13	38,26
	1:20	46,0
	1:40	48,8
G	ninguna	27,2
	1:2	39,9
	1:4	48,56
	1:8	59,28
	1:25	68,25

### 3.2 Paralelismo luego de calentar las muestras de plasma

Nuevamente, las alícuotas no calentadas produjeron curvas de dilución no paralelas a la curva estándar (plasma 1: prueba  $t$  para igualdad de pendientes,  $t = 4,41$ ;  $gl = 6$ ;  $p = 0,004$ ; plasma 2:  $t = 5,75$ ;  $gl = 6$ ;  $p = 0,001$ ; Fig. 2). El calentamiento de estas muestras antes de preparar las diluciones restituyó el paralelismo completamente para el plasma 1, con un incremento de 47 veces en el valor  $p$  ( $t = 1,51$ ;  $gl = 5$ ;  $p = 0,19$ ), aunque no fue suficiente para alcanzar un resultado no significativo para el plasma 2 (el incremento en el valor  $p$  fue de 40 veces y aún fue significativo,  $t = 2,64$ ;  $gl = 6$ ;  $p = 0,04$ ). Al excluir de los análisis las fracciones de plasma puro de ambas curvas se produjo un incremento adicional en los valores  $p$ , resultando en el no rechazo del paralelismo entre la curva estándar y la obtenida a partir del plasma 2 (plasma 1:  $t = 0,77$ ;  $gl = 4$ ;  $p = 0,48$ ; plasma 2:  $t = 1,43$ ;  $gl = 5$ ;  $p = 0,21$ ). Por lo tanto, luego del tratamiento con calor y la dilución de las muestras de plasma se recuperó completamente el paralelismo en ambos casos (Fig. 2). Como se esperaba de la observación de la Fig. 1, esto resultó en mayores valores de testosterona medidos en la series calentadas (estadísticamente significativas para el plasma 1: prueba  $t$  apareada:  $t = 3,2$ ;  $gl = 3$ ,  $p < 0,05$ ; aunque no para el plasma 2:  $t = 1,72$ ;  $gl = 4$ ,  $p = 0,16$ ). La falta de significancia estadística para el plasma 2 se debe, muy probablemente, al bajo poder estadístico, teniendo en cuenta el gran incremento en el valor  $p$  registrado y el cambio en la forma de la curva de dilución luego del tratamiento con calor (Fig. 2). En este sentido, las curvas dejaron de sesgarse hacia las fracciones con mayor contenido de plasma luego del tratamiento con calor, lo cual significa que disminuyó el porcentaje de  $^{125}\text{I}$ -testosterona unida para un porcentaje dado de plasma en la muestra, aumentando el valor de testosterona medido en la muestra. Para el plasma 1, el porcentaje de aumento en los valores de testosterona medidos luego del tratamiento con calor mostró una relación logarítmica positiva con el contenido de plasma en la muestra ( $r^2 = 0,92$ ;  $p < 0,05$ ; Fig. 3). Así, a mayor proporción de plasma en la muestra, mayor fue el incremento en los niveles medidos de testosterona en relación a las fracciones no calentadas. La curva logarítmica interceptó al eje  $x$  en 12,6 %, implicando que a esta concentración de plasma en la muestra el calentamiento no produjo un efecto medible en el desempeño del ensayo.



**Figura 2.** Optimización del RIA de testosterona para *C. talarum* a través del calentamiento (56°C, 30 min) y dilución de las muestras de plasma. En las series de dilución de plasmas tratados con calor se excluyeron las fracciones de plasma puro.



**Figura 3.** Porcentaje de aumento en los niveles medidos de testosterona (ng/mL) luego de calentar el plasma como función del porcentaje de plasma en la muestra. La dilución también contribuye a eliminar la interferencia y por consiguiente, el efecto del calentamiento se hace menor.

### 3.3 Ensayos de enriquecimiento

El porcentaje de recuperación de testosterona agregada a muestras de plasma previamente calentadas y diluidas 1:2 fue de  $100,7\% \pm 3,2\%$  (rango = 86-123%, Tabla 3). La regresión entre los valores esperados y observados fue altamente significativa para las dos soluciones agregadas (solución 1:  $\text{Esp} = 1,02 \text{ Obs} - 0,058$ ,  $r^2 = 0,99$ ;  $p = 1,20 \times 10^{-04}$ ; solución 2:  $\text{Esp} = 0,96 \text{ Obs} + 0,084$ ;  $r^2 = 0,99$ ;  $p = 2,05 \times 10^{-04}$ ) y los interceptos con el eje de ordenadas no fueron diferentes de cero (solución 1:  $t = 0,19$ ;  $p = 0,86$ ; solución 2:  $t = 0,26$ ;  $p = 0,81$ ).

**Tabla 3.** Porcentajes de recuperación de testosterona en muestras de plasma de *C. talarum* calentadas (56 °C, 30 min) y diluidas 1:2. La solución 1 fue de 14 ng/mL y la solución 2 de 7 ng/mL. Nótese que al agregar estas soluciones sobre la muestra que contiene 15,42 ng/mL el efecto neto es de dilución de la concentración.

Muestra	Testosterona (ng/mL)	Solución agregada	Esperado (ng/mL)	Observado (ng/mL)	Recuperación %
A	3,82	1	5,44	5,21	96
		2	4,57	4,31	94
B	15,52	1	14,22	14,63	103
		2	13,34	12,98	97
C	0,35	1	3,13	3,47	111
		2	2,05	2,54	123
D	6,42	1	7,68	7,44	97
		2	6,61	6,49	98
E	1,98	1	4,34	4,46	102
		2	3,28	2,81	86

#### 4. Discusión

El presente estudio provee una validación analítica para la determinación de los niveles de testosterona por RIA (kit comercial Coat-A-Count) en muestras de plasma de *C. talarum*. Los resultados muestran que el ensayo no es adecuado para medir niveles de testosterona directamente en muestras de plasma puro debido a la presencia de interferencia y también a la saturación del mismo por altos niveles de la hormona en algunas muestras. Sin embargo, un tratamiento sencillo de las muestras de plasma (calentamiento y dilución) es suficiente para superar estos problemas. Luego de realizar este procedimiento, el paralelismo se restituyó completamente y los porcentajes de recuperación de testosterona agregada se encontraron en el rango presentado en estudios previos (Newman et al., 2008a; Soto-Gamboa et al., 2009). Asimismo, los análisis de regresión entre los valores esperados y observados fueron altamente significativos ( $r^2 = 0,99$ ) y la intersección con los ejes de ordenadas no fue diferente de cero, validando el ensayo para su uso bajo estas condiciones. Los datos reportados en el capítulo III, que muestran una disminución importante en los niveles testosterona asociada con un período de estrés crónico (aclimación al cautiverio), junto con niveles incrementados de la hormona al inicio de la estación reproductiva dan un soporte biológico adicional a la presente validación analítica.

La mayor parte de la testosterona circula en plasma específicamente unida a la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) e inespecíficamente unida a la albúmina, mientras que una proporción menor circula libre (Vermeulen et al., 1999). Las globulinas transportadoras pueden producir interferencia en inmunoensayos (Selby, 1999; Wada et al., 2007). De hecho, existen reportes que muestran interferencia de SHBG en el kit Coat-a-Count para testosterona (Slaats et al., 1987; Masters y Hähnel, 1989; Luppá y Neumeier, 1990) y otros kits comerciales (Cook y Read 1995; Boots et al., 1998). Masters y Hähnel (1989) mostraron que niveles elevados de SHBG producen subestimaciones importantes en las concentraciones de testosterona en el ensayo. Esto ocurre porque la  $^{125}\text{I}$ -testosterona no se une a SHBG en las muestras o estándares y por lo tanto, cuando la concentración de SHBG en la muestra es mucho mayor que en el estándar hay una mayor proporción de testosterona no marcada unida a SHBG. Por consiguiente, el porcentaje de testosterona marcada inmovilizada en los anticuerpos es mayor de lo que debería ser y las concentraciones de la hormona en las muestras son subestimadas. En pacientes humanos, SHBG no genera interferencia en el ensayo

debido a los bajos niveles de esta proteína (Luppa y Neumeier, 1990). Sin embargo, para el caso de los tuco-tucos nuestros resultados sugieren un escenario de interferencia por SHBG por diferentes razones:

(1) Aunque las concentraciones de SHBG no han sido medidas en *C. talarum*, es muy probable que las mismas excedan ampliamente las concentraciones en plasma humano teniendo en cuenta los niveles extraordinariamente altos de testosterona que presentan (ver Capítulo III). La relación entre niveles de testosterona libre y total ha sido escasamente estudiada en mamíferos silvestres. Estas globulinas han sido identificadas para *Callithrix jacchus* (Hodges et al., 1983) y *Bettongia gaimardi* (Rose y Bradley, 1991) y más recientemente se han medido niveles de testosterona libre en el roedor caviomorfo *Octodon degus* (Soto-Gamboa, 2005). No es adecuado inferir a partir de otras especies posibles niveles de SHBG en *C. talarum* teniendo en cuenta la grandes diferencias en los niveles totales de testosterona.

(2) El calentamiento de las muestras de plasma produjo una gran mejora en el paralelismo del ensayo con incrementos de 47 y 40 veces en los valores p para los plasmas 1 y 2, respectivamente y resultó en mayores valores medidos de testosterona en comparación con alícuotas no calentadas de las mismas muestras. Esto es justamente lo esperado bajo un escenario de interferencia por altos niveles de SHBG: el calor produce desnaturalización de las globulinas, los cocientes *testosterona unida a SHBG/testosterona libre* en las muestras y estándares se hacen similares y las concentraciones medidas de testosterona se incrementan en consecuencia (Masters y Hahnel, 1989). La desnaturalización de SHBG en las muestras muy presumiblemente no fue absoluta debido a que las curvas se tornaron paralelas en lugar de curvarse en la dirección opuesta (niveles muy bajos de SHBG producirían sobreestimación). Además, a pesar de la gran mejora en el paralelismo, el valor p para el plasma 2 aún fue marginalmente significativo. Calentar las muestras de plasma a temperaturas más altas o durante tiempos más prolongados no es recomendable ya que produce frecuentemente la coagulación de las mismas, impidiendo su utilización en el RIA (F. Vera, observación personal).

(3) La dilución de las muestras de plasma también mejoró el desempeño del ensayo. En primera instancia se observó que la desviación del paralelismo no ocurrió de manera aleatoria sino que, por el contrario, se registró el mismo patrón en todas las muestras (el aplanamiento de las curvas hacia las fracciones con mayor contenido de plasma, Fig. 1). Luego, cuando se evaluó el efecto del calentamiento del plasma, se

observó que al excluir las fracciones de plasma puro de las curvas se producían incrementos adicionales en el grado de paralelismo (Fig. 2). Más aún, la Fig. 3 muestra que a mayor proporción de plasma, mayor fue la subestimación de los niveles de testosterona en la muestra no calentada. A un porcentaje de 12 % de plasma en esta muestra el calentamiento no produjo ningún efecto detectable, lo que implica que la interferencia se perdió al diluir el plasma. De acuerdo con lo expuesto anteriormente, se sugiere que esto ocurre simplemente porque la concentración de SHBG disminuye al diluirse la muestra. De forma similar, Wada et al. (2007) optimizaron un protocolo para medir corticosterona en muestras de plasma de aves mediante una combinación de dilución y tratamiento de las muestras con un “buffer de desplazamiento de esteroides” para degradar globulinas; en este caso la globulina de unión a glucocorticoides (CBG). En nuestro caso, el calentamiento de las muestras permite la medición de testosterona en muestras de plasma diluidas 1:2 o en mayor proporción.

Debido a la remarcable varianza en los niveles de testosterona en muestras de plasma (ver Capítulo III) puede haber una o dos fuentes de subestimación si se realiza la medición directamente en muestras sin tratar: solo interferencia en aquellas con niveles de testosterona dentro del rango de los calibradores del kit y saturación e interferencia simultáneas en muestras con niveles de testosterona por encima del rango del ensayo. De hecho, los datos muestran que el denominado “efecto gancho” (saturación del ensayo debido a un gran exceso del analito medido, Selby 1999; Leboeuf et al., 2006) ocurre comúnmente en muestras de campo (Tabla 2). Esto produce incrementos muy abruptos en los niveles de testosterona cuando las muestras son diluidas (Tabla 2). Por estos motivos, este trabajo pone de manifiesto la necesidad de realizar validaciones de los kits para la determinación de niveles de hormonas cuando se aborda el estudio de especies silvestres que no han sido evaluadas anteriormente.

## Consideraciones Finales

El estudio de la fisiología del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) en especies silvestres ha ganado mucho interés en las últimas dos décadas. Entre las razones que explican el creciente interés en la temática se pueden mencionar la utilidad de los glucocorticoides (GCs) como indicadores de estrés en poblaciones naturales y las diferencias notables encontradas respecto de animales de laboratorio (ratones y ratas). Asimismo, estos estudios han evidenciado un importante grado de variabilidad entre especies en relación a la identidad del GC dominante, los niveles de GCs, los patrones de variación estacional, los mecanismos de regulación del eje (respuestas de globulinas a estresores, afinidad de unión de los GCs a sus receptores, niveles del eje en los cuales se ejerce la regulación de la liberación de GCs, etc.), entre otros aspectos. De esta forma, más allá de que el conocimiento de la fisiología del eje HPA en especies silvestres ha crecido sustancialmente, se ha hecho evidente una complejidad no esperada en primera instancia. De hecho, se trata de un campo de estudio aún pobremente entendido (Romero et al., 2008).

Los esfuerzos dirigidos en la presente tesis han pretendido realizar un aporte a este campo del conocimiento en desarrollo. En primera instancia, el trabajo realizado sitúa al roedor subterráneo *C. talarum* como un modelo de interés para el estudio de la fisiología del eje HPA en mamíferos. Los roedores del género *Ctenomys* han sido utilizados como modelos de estudio en diversas áreas del conocimiento tales como ecología del comportamiento, fisiología, genética de poblaciones, inmunología, entre otros. Los resultados aquí presentados indican que estos animales son también un modelo interesante para el estudio de los roles del eje HPA en las respuestas a estresores y el balance de energía en general. En segundo término, los resultados obtenidos aportan información que, en algunos casos, ha sido muy escasamente tenida en cuenta en estudios sobre especies silvestres. Particularmente, los distintos capítulos enfatizan (a) las diferencias existentes en los niveles de cortisol entre sexos, (b) la variabilidad estacional y anual en los niveles de GCs; incluso en la relación cortisol/corticosterona en plasma para *C. talarum* (Tabla 1), (c) las diferencias entre el cortisol y la corticosterona en sus patrones de variación estacionales y anuales, su respuesta a estresores puntuales y su regulación fisiológica, sugiriendo fuertemente una diferenciación en los roles de ambas hormonas (Tabla 1) y (d) la existencia de variaciones estacionales en los niveles de cortisol no atribuibles a estrés, es decir

cambios en los niveles basales de la hormona. Existen algunas consideraciones que se pueden realizar a partir de estos resultados:

1. La idea muy extendida de que el cortisol y la corticosterona son hormonas redundantes, en el sentido que cumplen las mismas funciones (básicamente movilización de reservas de energía durante las respuestas a estresores), no es válida para todas las especies y probablemente necesitará revisión en el futuro próximo. Recientemente, otros trabajos están indicando que la equiparación del cortisol y la corticosterona como dos alternativas para un mismo rol no es correcta (Schmidt et al., 2008; Schmidt et al., 2010). Así, el cortisol y la corticosterona han exhibido diferencias en sus patrones de variación estacional (Boswell et al., 1994), respuesta a estrés puntual (Romero et al., 2008), afinidad de unión a receptores de GCs y cambios en sus proporciones en diferentes tejidos (Schmidt et al., 2008; Schmidt et al., 2010). En el caso de *C. talarum*, la falta total de respuesta de la corticosterona a ACTH y estresores puntuales, lo convierten en un modelo adecuado para estudiar las diferencias entre ambas hormonas e investigar el rol fisiológico de la corticosterona.

2. Como se mencionó previamente, los estudios realizados a la fecha han enfatizado el importante grado de variabilidad interespecifica en los niveles de GCs, la relación cortisol/corticosterona, como así también la forma de la variación estacional de estas hormonas, respuestas a estresores del cortisol, la corticosterona y las globulinas de unión a GCs, entre otros aspectos. Sin embargo, en los mismos se asume muy comúnmente que la variabilidad intraespecífica (entre poblaciones e intrapoblacional en el tiempo) en todos estos aspectos es muy baja o nula. Es decir, que todas estas características se asumen constantes para cada especie. Más allá de que esta “estabilidad” bien puede ser válida para algunas especies, es posible también que esta visión sea consecuencia, al menos en parte, de la escasez de estudios a largo plazo. De hecho, se han reportado en la bibliografía desacuerdos entre distintos trabajos en la identidad del GC dominante en ardillas (ver Adams, 1972 y Boonstra et al., 2001) y también en el patrón de variación estacional de la testosterona en el Degu (ver Kenagy et al., 1999 y Soto-Gamboa et al., 2005), que se atribuyen a errores de medición en alguno de los mismos. Sin embargo, considerando los resultados reportados en esta tesis, se sugiere tener en cuenta que las discrepancias entre trabajos podrían deberse simplemente a que los mismos fueron realizados en momentos diferentes bajo condiciones de recursos o de ambientes físico o social distintos. Los datos aquí presentados muestran variación en el tiempo para una población de *C. talarum* en varios

de los aspectos mencionados, indicando que las conclusiones a las cuales se arriban pueden llegar a diferir dependiendo del momento en el que se realiza el estudio.

3. Los resultados previamente descriptos indican que la noción de que los niveles de GCs se correlacionan positivamente con los niveles de estrés (y por consiguiente, de manera negativa con el estado general de “salud”) en poblaciones naturales es una generalización demasiado simple. Los niveles basales de GCs también pueden variar significativamente en el tiempo, con diferencias entre sexos, estaciones y años. El estrés crónico (ejemplificado por la aclimación al cautiverio en esta tesis) puede producir inhibición de la secreción GCs, por lo cual individuos crónicamente estresados pueden presentar niveles inferiores a animales no estresados. Más aún, no necesariamente ambos GCs responden a estresores puntuales. Finalmente, teniendo en cuenta que los efectos de los GCs dependerán también de su regulación a través de los niveles de globulinas de unión a GCs, expresión de receptores de GCs, y probablemente también de su síntesis en tejidos específicos, el panorama se vuelve todavía más complejo. De hecho, la relación entre niveles de GCs y éxito reproductivo no es clara en especies silvestres (ver Bonier et al., 2009; Breuner et al., 2008). De esta forma, se necesita de una comprensión global de la fisiología del eje HPA y los GCs para cada especie antes de poder realizar conclusiones fiables acerca de los niveles de “estrés” o la “salud” de las poblaciones. Además, la determinación de niveles de GCs debería ser llevada a cabo en paralelo con la evaluación de otros indicadores de estrés con el fin de tener un panorama más completo sobre el estado general de los animales.

La determinación conjunta de hormonas reproductivas durante la presente tesis indicó también que *C. talarum* es un modelo interesante para estudiar la regulación de andrógenos. Particularmente, debido a los niveles extraordinariamente elevados de testosterona en machos, la especie se constituye en un modelo potencial de resistencia a andrógenos. Estos resultados enfatizaron también la importancia de considerar la variación individual en estudios en animales silvestres, además de los patrones generales de variación. En este sentido, los objetivos de los estudios en especies silvestres deberían considerar la importancia de comprender los procesos subyacentes a las variaciones entre individuos además de la explicación de los cambios en los niveles medios de las variables de interés (Williams, 2008).

Por otro lado, la posibilidad de utilizar a los niveles de glucosa en sangre como indicador de niveles de estrés (junto con los antecedentes previos sobre la temática en roedores hystricomorfos), condujo a la realización de experimentos que mostraron que

*C. talarum* presenta diferencias en su capacidad de regular sus niveles de glucosa en sangre respecto de otros hystricomorfos y mamíferos en general.

Finalmente, la presente tesis enfatiza la importancia de realizar conjuntamente experimentos en condiciones de campo y laboratorio cuando se aborda el estudio de la fisiología de especies silvestres. Ambas aproximaciones presentan puntos a favor y en contra y son complementarias (para una buena discusión al respecto ver Casini y Bentley, 2009). Por ejemplo, las pruebas controladas en laboratorio permitieron evaluar las respuestas del cortisol y la corticosterona al tratamiento con ACTH, mientras que en el campo las respuestas se valoraron en un contexto en el cual los animales inevitablemente responden a múltiples estresores, ya que han sido capturados y removidos de su ambiente natural. Por otro lado, la toma de datos únicamente en condición de cautiverio no hubiera permitido registrar las diferencias entre sexos en la fisiología del eje HPA, ya que en este contexto los niveles de GCs son similares en machos y hembras. Las pruebas de tolerancia a glucosa en animales cautivos evidenciaron baja capacidad de regulación en relación a otras especies de mamíferos, pero los datos tomados en campo mostraron que, bajo condiciones naturales, los tuco-tucos mantienen niveles absolutamente normales de glucosa en sangre. Es decir, que ambas aproximaciones son importantes en pos de una comprensión integral de la fisiología de especies silvestres. Por otro lado, los datos reportados en condición de cautiverio mostraron que la transferencia de animales silvestres a condiciones de cautiverio puede producir importantes efectos sobre los sistemas endocrinos. En este sentido, debería evaluarse si los efectos del cautiverio sobre los niveles de hormonas pueden ser reducidos por medio de la incorporación de mejoras en las condiciones de alojamiento de los animales de interés, en la medida de lo posible.

**Tabla 1.** Resumen de los niveles de cortisol y corticosterona en tuco-tucos silvestres y en condición de cautiverio entre 2007 y 2010. Para la corticosterona los datos de ambos sexos están agrupados, mientras que no para el cortisol, debido a las diferencias entre machos y hembras. Para el cortisol los datos son basales tomados en campo y en condición de cautiverio hasta el día 10. Como no se conoce a que factores responde la corticosterona, no se pueden definir como valores basales en este caso. \* indica variación estacional significativa dentro de cada período anual considerado ( $p < 0,05$ ). Los datos de campo que expresan un rango representan los valores promedio mínimos y máximos para las distintas estaciones del ciclo reproductivo en las que se tomaron datos. Los valores de cortisol de machos y hembras en cautiverio durante 2010 expresan un promedio de todos los datos disponibles en esta condición para dicho año (datos basales de individuos utilizados en pruebas de estimulación de las adrenales más los datos del día 10 para el grupo evaluado durante 1 mes en el laboratorio, Capítulos III y IV). Los patrones generales que se evidencian en la tabla son: (1) variaciones estacionales en los niveles de cortisol en ambos sexos, con mayores concentraciones en hembras que en machos, (2) depresión de los niveles de cortisol y corticosterona en cautiverio, (3) variación en los niveles de cortisol proporcionalmente más acotada que para la corticosterona (4) marcada disociación de las variaciones del cortisol y la corticosterona en animales silvestres, con cambios importantes en la razón cortisol/corticosterona en plasma para diferentes períodos anuales.

	Cortisol machos campo (ng/mL)	Cortisol hembras campo (ng/mL)	Cortisol machos cautiverio (ng/mL)	Cortisol hembras cautiverio (ng/mL)	Corticosterona campo (ng/mL)	Corticosterona cautiverio (ng/mL)
2007-2008	20-45*	-	20	-	15-25	< 3
2009	25-72*	73-118*	-	-	-	-
2010	25	107	19	27	400	39

## Bibliografía

- Abel, E.L., 1994. A further analysis of physiological changes in rats in the forced swim test. *Physiol. Behav.* 56, 795-800.
- Ackers, M., 2002. Lactation and the mammary gland. Ames: Iowa State Press.
- Admon, G., Weinstein, Y., Falk, B., Weintrob, N., Benzaquen, H., Ofan, R., Fayman, G., Zigel, L., Constantini, N., Phillip, M., 2005. Exercise with and without an insulin pump among children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Pediatrics* 116(3), 248-355.
- Agarwal, M.K., Mirshahi, M., 1999. General overview of mineralocorticoid hormone action. *Pharmacol. Therapeut.* 84, 273-326.
- Ahima, R.S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Qu, D., Lowell, B., Maratos-Flier, E., Flier, J.S., 1996. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382, 382250-382252.
- Ahima, R.S., Prabakaran, D., Flier, J.S., 1998. Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J. Clin. Invest.*, 101(5), 1020-1027
- Anderson, K.E., Rosner, W., Khan, M.S., New, M.I., Pang, S.Y., Wissel, P.S., Kappas, A., 1987. Diet-hormone interactions: protein/carbohydrate ratio alters reciprocally the plasma levels of testosterone and cortisol and their respective binding globulins in man. *Life Sci.* 40(18), 1761-1768.
- Antinuchi, C.D., Busch, C., 1992. Burrow structure in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Z. Säugetierkunde* 57, 163-168.

- Antenucci, C.D., Zenuto, R., Luna, F., Cutrera, A.P., Perisinotti, P., Busch, C., 2007. Energy budget in subterranean rodents: insights from the tuco-tuco *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae). Pp. 111-140 En: The quintessential naturalist: honoring the life and legacy of Oliver P. Pearson (Kelt, D. A., E. Lessa, J. A. Salazar-Bravo, and J. L. Patton, eds.). University of California Publications in Zoology.
- Astheimer, L. B., Buttemer, W. A., Wingfield, J. C., 1992. Interactions of corticosterone with feeding, activity and metabolism in passerine birds. *Ornis Scandinavica*, 23, 355-365.
- Atkinson, H.C., Waddell, B.C., 1997. Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: sexual dimorphism and changes across the estrous cycle. *Endocrinology* 138, 3842-3848.
- Axelrod, J., Reisine, T.D., 1984. Stress hormones: their interaction and regulation. *Science* 224, 452-459.
- Bajaj, M., Blundell, T.L., Horuk, R., Pitts, J.E., Wood, S.P., Gowan, L.K., Schwabe, C., Wollmer, A., Gliemann, J., Gammeltoft, S., 1986. Coypu insulin. Primary structure, conformation and biological properties of a hystricomorph rodent insulin. *J. Biochem.* 238, 345-351.
- Ball, G., Balthazart, J., 2007. Individual variation and the endocrine regulation of behaviour and physiology in birds: a cellular/molecular perspective. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 363, 1699-1710.
- Bartsh, S.S., Johnston, S.D., Siniff, D.B., 1992, Territorial behaviour and breeding frequency of male Weddell seals (*Leptonychotes weddelli*) in relation to age, size, and concentrations of serum testosterone and cortisol. *Can. J. Zool.* 70, 680-692.
- Baum, D., Porte, D. Jr., 1972. A mechanism for regulation of insulin release in hypoxia. *Am. J. Physiol.* 222(3), 695-699.

- Baum, M.J., 1992. Neuroendocrinology of sexual behaviour in the male. In Becker, J.B., Breedlove, S.M., Crews, D. (Eds.), Behavioral Endocrinology. MIT Press, London, pp. 97-130.
- Bennett, N.C., Jarvis, J.U.M., Davies, K.C., 1988. Daily and seasonal temperatures in the burrows of African rodent moles. South African J. Zool, 23. 189-195.
- Berger, J., Biswas, C., Vicario, P.P., Strout, V., Saperstein, R., Pilch, P.F., 1989. Decreased expression of the insulin-responsive glucose transporter in diabetes and fasting. Nature 340, 70–72.
- Bird, I.M., Meikle, I.A., Williams, I., Walker, B.C., 1989. Angiotensin II-stimulated cortisol secretion is mediated by a hormone-sensitive phospholipase C in bovine adrenal fasciculata/reticularis cells. Mol. Cell. Endocrinol. 64, 45-53.
- Blanchard, R.J., McKittrick, C.R., Blanchard, D.C., 2001. Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. Physiol. Behav. 73, 261–271.
- Bliesener, N., Albrecht, S., Schwager, A., Weckbecker, K., Lichtermann, D., Klingmüller, D., 2005. Plasma testosterone and sexual function in men receiving buprenorphine maintenance for opioid dependence. J. Clin. Endocrinol. Metab. 90(1), 203-206.
- Blottner, S., Rohleder, M., Zinke, O., Stuermer, I.W., 2000. Higher testicular activity in laboratory gerbils compared to wild Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). J. Zool. 250, 461– 466.
- Bonier, F., Martin, P.R., Moore, I.T., Wingfield, J.C., 2009. Do baseline glucocorticoids predict fitness? TREE 24, 634-642.
- Boonstra, R., Boag, P.T., 1992. Spring declines in *Microtus pennsylvanicus* and the role of steroid hormones. J. Anim. Ecol. 61, 339-352.

- Boonstra, R., Singleton, G.R., 1993. Population declines in the snowshoe hare and the role of stress. *Gen. Comp. Endocrinol.* 91, 126-143.
- Boonstra, R., Hik, D., Singleton, G.R., Tinnikov, A., 1998. The impact of predator-induced stress on the snowshoe hare cycle. *Ecol. Monographs* 68(3), 371-394.
- Boonstra, R., McColl, C.J., 2000. Contrasting stress response of male arctic ground squirrels and red squirrels. *J. Exp. Zool.* 268, 390-404.
- Boonstra, R., Hubbs, A.H., Lacey, E.A., McColl, C.J., 2001a. Seasonal changes in glucocorticoid and testosterone concentrations in free-living arctic ground squirrels from the boreal forest of the Yukon. *Can. J. Zool.* 79, 49-58.
- Boonstra, R., McColl, C.J., Karels, T.J., 2001b. Reproduction at all costs: the adaptive stress response of male arctic ground squirrels. *Ecology* 82(7), 1930-1946.
- Boonstra, R., 2005. Equipped for life: the adaptive role of the stress axis in male mammals. *J. Mamm.* 86(2), 236-247.
- Boonstra, R., Lane, J.E., Boutin, S., Bradley, A., Desantis, L., Newman, A.E.M., Soma, K.K., 2008. Plasma DHEA levels in wild, territorial red squirrels: Seasonal variation and effect of ACTH. *Gen. Comp. Endocrinol.* 158, 61-67.
- Bornstein, S.R., Engeland, W.C., Ehrhart-Bornstein M., Herman, J.P., 2008. Dissociation of ACTH and glucocorticoids. *TREE* 19, 175-180.
- Boswell, T., Woods, S.C., Kenagy, G.J., 1994. Seasonal changes in body mass, insulin and glucocorticoids of free-living golden-mantled ground squirrels. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 96, 339-346.
- Bourey, R.E., Korangi, L., James, D.E., Mueckler, M., Permutt, M.A., 1990. Effects of altered glucose homeostasis of glucose transporter expression of the rat. *J. Clin. Invest.* 86, 542-547.

- Bradley, A. J., 1987. Stress and mortality in the red-tailed phascogale, *Phascogale calura* (Marsupialia: Dasyuridae). *Gen. Comp. Endocrinol.* 67, 85-100.
- Breuner, C.W., Wingfield, J.C., 2000. Rapid behavioral response to corticosterone varies with photoperiod and dose. *Horm. Behav.* 37, 23-30.
- Breuner, C.W., Orchinik, M., 2001. Seasonal regulation of membrane and intracellular corticosteroid receptors in the house sparrow brain. *J. Neuroendocrinol.* 13, 412-420.
- Breuner, C.W., Orchinik, M., 2002. Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *J. Endocrinol.* 175, 99-112.
- Breuner, C.W., Patterson, S.H., Hahn, T.P., 2008. In search of relationships between the acute adrenocortical response and fitness. *Gen. Comp. Endocrinol.* 157, 288-295.
- Bronson, F.H., 1989. *Mammalian reproductive biology*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Bryant, N.J., Govers, R., James, D.E., 2002. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3, 267-277.
- Buck, C.L., Barnes, B.M., 1999. Annual cycle of body composition and hibernation in free-living arctic ground squirrels. *J. Mammal.* 80, 430-442.
- Buffenstein, R., 2000. Ecophysiological responses of subterranean rodents to an underground an underground habitat. *En Life Underground*. Eds. Lacey; Patton y Cameron. Chicago Univ. Press. Pg. 62-110.
- Buffenstein, R., Pinto, M., 2008. Endocrine function in naturally long-living small mammals. *Mol. Cell. Endocrinol.* 299(1), 101-111.

- Burgess, L.H., Handa, R.J., 1992. Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats. *Endocrinology*. 131(3), 1261-1269.
- Busch, C., Malizia, A.I., Scaglia, O.A., Reig, O.A., 1989. Spatial distribution and attributes of a population of *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *J. Mammal.* 70, 204-208.
- Busch C., Antinuchi, C.D., del Valle, J.C., Kittlein, M.J., Malizia A.I., Vassallo, A.I., Zenuto, R.R., 2000. Population ecology of subterranean rodents. En: Lacey E.A., Cameron G., Patton, J.L. (Eds.), *Life underground: the biology of subterranean rodents*. The University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA, pp 183-226.
- Cade, R., Perenich, T., 1965. Secretion of aldosterone by rats. *Am. J. Physiol.* 208, 1026-1030.
- Calisi, R.M., Bentley, E.B., 2009. Lab and field experiments: are they the same animal? *Horm. Behav.* 56, 1-10.
- Campbell, J.E., Rakhshani, N., Fediuc, S., Bruni, S., Riddell, M.C., 2009. Voluntary wheel running initially increases adrenal sensitivity to adrenocorticotrophic hormone, which is attenuated with long-term training. *J. Appl. Physiol.* 106(1), 66-72
- Carey, M.P., Deterd, C.H., de Koning, J., Helmerhorst, F., de Kloet, E.R., 1995. The influence of ovarian steroids on hypothalamic-pituitary-adrenal regulation in the female rat. *J. Endocrinol.* 144, 311-321.
- Cavigelli, S., 1998. Behavioural patterns associated with faecal cortisol levels in free-ranging female ring-tailed lemurs, *Lemur catta*. *Anim. Behav.* 57, 935-944.
- Cavigelli, S., Pereira, M., 2000. Mating season aggression and fecal testosterone levels in ring-tailed lemurs (*Lemur catta*). *Horm. Behav.* 37, 246-255.

- Cavigelli, S., Pareira, M., 2000. Mating season aggression and fecal testosterone levels in male ring-tailed lemurs (*Lemur catta*). *Horm. Behav.* 37, 246–255.
- Chan, S.J., Steiner, D.F., 2000. Insulin through the ages: phylogeny of a growth promoting and metabolic regulatory hormone. *Am. Zool.* 40, 213–222.
- Chrousos, G.P., Torpy, D.J., Gold, P.W., 1998. Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. *Ann. Inter. Med.* 129, 229-240.
- Conlon, J.M., 2001. Evolution of the insulin molecule: insights into structure-activity and phylogenetic relationships. *Peptides* 22(7), 1183-1193.
- Crespi, E.J., Vaudry, H., Denver, R.J., 2004. Roles of corticotropin-releasing factor, neuropeptide Y and corticosterone in the regulation of food intake in *Xenopus laevis*. *J. Neuroendocrinol.* 16(3), 279-288.
- Cutrerera, A.P., Antinuchi, C.D., 2004. Fur changes in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*: possible thermal compensatory mechanism. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 77, 235-242.
- Cutrerera, A.P., Lacey, E.A., Busch, C., 2005. Genetic structure in a solitary rodent (*Ctenomys talarum*): implications for kinship and dispersal. *Mol. Ecol.* 14, 2511-2523.
- Cutrerera, A.P., Antinuchi, C. D., Mora, M. S., Vassallo, A. I., 2006. Home-range and activity patterns of the South American subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *J. Mammal.* 87, 1183-1191.
- Cutrerera, A. P., Zenuto, R.R., Luna, F., Antenucci, C.D., 2010. Mounting a specific immune response increases energy expenditure of the subterranean rodent

- Ctenomys talarum* (tuco-tuco): implications for intraspecific and interspecific variation in immunological traits. *J. Exp. Biol.* 213, 715-724.
- Dahlquist, G.G., Blom, L.G., Persson, L.A., Sandström, A.I.M., Wall, S.G.I., 1990. Dietary factors and the risk of developing insulin dependent diabetes in childhood. *Br. Med.* 300, 1302–1306.
- Dalle, M., Delost, P., 1974. Changes in the concentrations of cortisol and corticosterone in the plasma and adrenal glands of the guinea-pig from birth to weaning. *J. Endocrinol.* 63, 483-488.
- Dallman, M.F., Akana, S.F., Strack, A.M., Hanson, E.S., Sebastian, R.J., 1995 The neural network that regulates energy balance is responsive to glucocorticoids and insulin and also regulates HPA axis responsivity at a site proximal to CRF neurons. *Ann. NY Acad. Sci.* 29; 730-742.
- Dallman, M.F., Akana, S.F., Bhatnagar, S., Bell, M.E., Choi, S., Chu, A., Horsley, C., Levin, N., Meijer, O., Soriano, L.R., Strack, A.M., Viau, V., 1999. Starvation: early signals, sensors, and sequelae. *Endocrinology* 140, 4015- 4023.
- Dallman MF, Warne JP, Foster MT, Pecoraro NC, 2007. Glucocorticoids and insulin both modulate caloric intake through actions on the brain. *J. Physiol.* 583, 431-436.
- Davis, A.K., Maney, D.L., Maerz, J.C., 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologist. *Funct. Ecol.* 22, 760-772.
- del Valle, J.C., Lohfelt, M.I., Comparatore, V.M., Cid, M.S., Busch, C., 2001. Feeding selectivity and food preference of *Ctenomys talarum* (tuco-tuco). *Mamm. Biol.* 66, 165-173.
- Delehanty, B., Boonstra, R., 2009. Impact of live trapping on the stress profile of Richardson's ground squirrel (*Spermophilus richardsonii*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 160, 176-182.

- Delville, Y., David, T., Taravosh-Lahn, K., Wommack, J.C., 2003. Stress and the development of agonistic behavior in golden hamsters. *Horm. Behav.* 44, 263-270.
- Dickens, M.J., Earle, K.A., Romero, L.M., 2009. Initial transference of wild birds to captivity alters stress physiology. *Gen. Comp. Endocrinol.* 160, 76-83.
- Djiane, J., Durand, P., 1977. Prolactin-progesterone antagonism in self regulation of prolactin receptors in the mammary gland. *Nature* 266, 641–643.
- Dufty, A. Jr., Clobert, J., Moller, A.P., 2002. Hormones, developmental plasticity and adaptation. *TREE* 17, 190-195.
- Dunlap, K.D., Pelczar, P.L., Knapp, R., 2002. Social interactions and cortisol treatment increase the production of aggressive electrocommunication signals in male electric fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *Horm. Behav.* 42, 97-108.
- Fanjul, M.S., Zenuto, R.R., Busch, C., 2006. Seasonality of breeding in wild tuco-tucos *Ctenomys talarum* in relation to climate and food availability. *Acta Theriol.* 51(3), 283-293.
- Fanjul, M.S., Zenuto, R., 2008. Copulatory pattern of the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Mammalia* 72, 102-108.
- Ferin M., 2006. Stress and the reproductive system. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 3rd Edition, Philadelphia, PA, Elsevier Press, 2627-2679 pp.
- Fletcher, Q. E., Boonstra, R., 2006. The impact of live-trapping on the stress response of the meadow vole (*Microtus pennsylvanicus*). *J. Zool.* 270, 473-478.
- Fleur, S., 2006. The effects of glucocorticoids on feeding behavior in rats. *Physiol. Behav.* 89, 110-114.

- Franceschini, C., Siutz, C., Palme, R., Millesi, E., 2007. Seasonal changes in cortisol and progesterone secretion in Common hamsters. *Gen. Comp. Endocrinol.* 152, 14-21.
- Gaskin, J.H., Kitay, J.I., 1971. Hypothalamic and pituitary regulation of adrenocortical function in the hamster: effects of gonadectomy and gonadal hormone replacement. *Endocrinology* 89, 1047-1053.
- Ghosh, P.R., Chowdhury, S., Maiti, B.R., 1983. Circadian rhythms in adrenal adrenaline and noradrenaline and in blood glucose levels in the bandicoot rat (*Bandicota bengalensis*). *Exp. Clin. Endocrinol.* 81(1), 98-100.
- Giussani, D.A., Farber, D.M., Jenkins, S.L., Yen, A., Winter, J.A., Tame, J.D., Nathanielsz, P.W., 2000. Opposing effects of androgen and estrogen on pituitary-adrenal function in nonpregnant primates. *Biol. Reprod.* 62, 1445-1451.
- Goodyear, L.J., King, P.A., Hirshman, M.F., Thompson, C.M., Horton, E.D., Horton, E.S., 1990. Contractile activity increases plasma membrane glucose transporters in absence of insulin. *Am. J. Physiol.* 258, E667-672.
- Gottreich, A., Zuti, I., Barel, S., Hammer, I., Terkel, J., 2000. Urinary testosterone levels in the male blind mole rat (*Spalax ehrenbergi*) affect female preference. *Physiol. Behav.* 69, 309-315.
- Goymann, W., East, M.L., Hofer, H., 2001. Androgens and the role of female “hyperaggressiveness” in spotted hyenas (*Crocuta crocuta*). *Horm. Behav.* 39, 83-92.
- Goymann, W., Wingfield, J.C., 2004. Allostatic load, social status and stress hormones: the costs of social status matter. *Anim. Behav.* 67, 591– 602.

- Green, P.K., Wilkinson, C.W., Woods, S.C., 1992. Intraventricular corticosterone increases the rate of body weight gain in underweight adrenalectomized rats. *Endocrinology* 130, 269-275.
- Gustafson, A.W., Shemesh, M., 1976. Changes in plasma testosterone levels during the annual reproductive cycle of the hibernating bat, *Myotis lucifugus lucifugus* with a survey of plasma testosterone levels in adult male vertebrates. *Biol. Reprod.* 15, 9-24.
- Halberg, F., Albrecht, P.G., Bittner, J.J., 1959. Corticosterone rhythm of mouse adrenal in relation to serum corticosterone and sampling. *Am. J. Physiol* 197, 1083-1085.
- Hayashi, T., Wostajzewski, J.F.P., Goodyear, L.J., 1997. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 273, E1039–E1051.
- Heap, R.B., Ackland, N., Weir, B., 1981. Progesterone-binding proteins in plasma of guinea pigs and other hystricomorph rodents. *J. Reprod. Fert.* 63, 477-489.
- Heiman, M.L., Ahima, R.S., Craft, L.S., Schoner, B., Stephens, T.W., Flier, J.S., 1997. Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress. *Endocrinology* 138, 3859-3863.
- Holloszy, J.O., 2003. A forty-year memoir of research on the regulation of glucose transport into muscle. *Am. J. Physiol.* 284, E453–E467.
- Hopkins, W.A., Mendonça, M.T., Congdon, J.D., 1997. Increased circulating levels of testosterone and corticosterone in southern toads, *Bufo terrestris*, exposed to coal combustion waste. *Gen Comp Endocrinol.* 108(2), 237-246.
- Hunt, K.E., Trites, A.W., Wasser, S.K., 2004. Validation of a fecal glucocorticoid assay for Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*). *Physiol Behav.* 80(5), 595-601.

- Hussein, M. F., Badir, N., El Ridi, R., El Deeb, S., 2005. Effect of seasonal variation on immune system of the lizard, *Scincus scincus*. *J. Exp. Zool.* 209(1), 91-96.
- Idstrom, J.P., Rennie, M.J., Schersten, T., Bylund-Fellenius, A.C., 1986. Membrane transport in relation to net uptake of glucose in the perfused rat hindlimb. Stimulatory effect of insulin, hypoxia and contractile activity. *Biochem J.* 233,131-137.
- Inui, A., Kitaoka, H., Majima, M., Takamiya, S., Uemoto, M., Yonenaga, C., Honda, M., Shirakawa, K., Ueno, N., Amano, K., Morita, S., Kawara, A., Yokono, K., Kasuga, M., Taniguchi, H., 1998. Effect of the Kobe earthquake on stress and glycemic control in patients with diabetes mellitus. *Arch. Intern. Med.* 158, 274–288.
- Jewell, P.A., 1997. Survival and behaviour of castrated Soay Sheep (*Ovis aries*) in a feral island population on Hirta, St. Kilda, Scotland. *J. Zool. Lond.* 243, 623-636.
- Kalantaridou, S.N., Makrigiannakis, A., Zoumakis, E., Chrousos G.P, 2004. Stress and the female reproductive system. *J. Reprod. Immunol.* 62, 61-68.
- Kanerek, R.B., Ho, L., 1984. Patterns of nutrient selection in rats, with streptozotocin-induced diabetes. *Physiol. Behav.* 32, 639–645.
- Kannan, G., Terill, T.H., Kouakon, B., Gazal, O.S., Gelaye, S., Amoah, E.A., Samake, S., 2000. Transportation of goats: Effects on physiological stress responses and live weight loss. *J. An. Sci.* 78, 1450-1457.
- Kenagy, G.J., Place, N.J., Veloso, C., 1999. Relation of glucocorticosteroids and testosterone to the annual cycle of free-living degus in semiarids central Chile. *Gen. Comp. Endocrinol.* 115, 236-243.
- Kenagy, G.J., Place, N.J., 2000. Seasonal changes in plasma glucocorticosteroids of free-living female yellow-pine chipmunks: effects of reproduction and capture and handling. *Gen. Comp. Endocrinol.* 117, 189-199.

- Kent, J.E., Ewbank, R., 1983. The effect of road transportation on the blood constituents and behavior of calves. I. Six months old. *Br. Vet. J.* 139, 228-235.
- Kim, J.J., Diamond, D.M., 2002. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature Reviews: Neuroscience* 3, 453-462.
- King, G.L., Kahn, C.R., 1981. Non-parallel evolution of metabolic and growth promoting functions of insulin. *Nature* 292, 644-646.
- King, G.L., Kahn, C.R., Heldin, C.H., 1983. Sharing of biological effect and receptors between guinea pig insulin and platelet-derived growth factor. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA* 80, 1308-1312.
- Kloet, E.R., Grootendorst, J., Karssen, A.M., Oitzl, M.S., 2002. Gene x environment interaction and cognitive performance: animal studies on the role of corticosterone. *Neurobiol. Learn. Mem.* 78(3), 570-577.
- Knapp, R., Moore, M.C., 1997. Male morphs in tree lizards have different testosterone responses to elevated levels of corticosterone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 107, 273-279.
- Kramer, B., Rochelle Buffenstein, R., 2004. The pancreas of the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*): an ultrastructural and immunocytochemical study of the endocrine component of thermoneutral and cold acclimated animals. *Gen. Comp. Endocrinol.* 139, 206-214.
- Krasnow, S.K., Steiner, R.A., 2006. Physiological mechanisms integrating metabolism and reproduction, Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*, 3rd Edition, Philadelphia, PA, Elsevier Press, 2553-2625 pp.
- Künzl, C., Kaiser, S., Meier, E., Sachser, N., 2003. Is a wild mammal kept and reared in captivity still a wild animal? *Horm Behav.* 43(1), 187-196.

- Labrie, F., Luu-The, V., Bélanger, A., Lin, S.X., Simard, J., Pelletier, G., Labrie, C., 2005. Is dehydroepiandrosterone a hormone?. *Endocrinology* 187(2), 169-196.
- Leavitt, W.W., Blaha, G.C., 1970. Circulating progesterone levels in the golden hamster during the estrous cycle, pregnancy and lactation. *Biol. Reprod.* 3, 353–361.
- Lèche, A., Busso, J.M., Hansen, C., Navarro, J.L., Marín, R.H., Martella, M.B., 2009. Physiological stress in captive Greater rheas (*Rhea americana*): Highly sensitive plasma corticosterone response to an ACTH challenge. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 162, 188-191.
- Lee, S., Miselis, R., Rivier, C., 2002. Anatomical and functional evidence for a neural hypothalamic-testicular pathway that is independent of the pituitary. *Endocrinology* 143, 4447-4454.
- Liang, H., Zhang, J., Zhibin, Z., 2004. Food restriction in pregnant rat-like hamsters (*Cricetulus triton*) affects endocrine, immune function and odor attractiveness of male offspring. *Physiol. Behav.* 82, 453-458.
- Linch, J.W., Ziegler, T.E., Strier, K.B., 2002. Individual and seasonal variation in fecal testosterone and cortisol levels of wild male tufted capuchin monkeys, *Cebus apella nigrinus*. *Horm. Behav.* 41, 275-287.
- Louw, A.I., van Wyk, V., van Aarde, R.L., 1992. Properties of proteins binding progesterone in pregnant Cape porcupines (*Hystrix africaeaustralis*). *J. Reprod. Fert.* 96, 117-125.
- Luger, A., Deuster, P.A., Kyle, S.B., Gallucci, W.T., Montgomery, L.C., et al., 1987. Acute hypothalamic-pituitary-adrenal responses to the stress of treadmill exercise. *N Engl J Med* 316, 1309-1315.

- Luna, F., Antinuchi, C.D., Busch, C., 2000. Ritmos de actividad locomotora y uso de las cuevas en condiciones seminaturales en *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). Rev. Chil. Hist. Nat. 73, 39-46.
- Luna, F., Antinuchi, C.D., 2003. Daily movements and maximum speed in *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae) in artificial enclosures. J. Mammal. 84(1), 272-277.
- Machatschke, I.H., Bauer, B.E., Schrauf, C., Dittami, J., Wallner, B., 2008. Conflict-involvement of male guinea pigs (*Cavia aperea f. porcellus*) as a criterion for partner preference. Behav. Ecol. Sociobiol. 62, 1341-1350.
- Malisch, J.L., Breuner C.W., Gomes, F.R., Chappell, M.A., Garland, T. Jr., 2008. Circadian pattern of total and free corticosterone concentrations, corticosteroid-binding globulin, and physical activity in mice selectively bred for high voluntary wheel-running behavior. Gen. Comp. Endocrinol. 156, 210-217.
- Malizia, A. I., Busch, C., 1991. Reproductive parameters and growth in the fossorial rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). Mammalia 55, 293-305.
- Malizia, A.I., Zenuto, R., Busch, C., 1995. Demographic and reproductive attributes of dispersers in two populations of the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (tuco-tuco). Can. J. Zool 73, 732-738.
- Malizia, A.I., Kittlein, M.J., Bush, C., 2000. Influence of the subterranean herbivorous rodent *Ctenomys talarum* on vegetation and soil. Z. Säugetierkunde 65, 172-182.
- Martin, L.B., Stress and immunity in wild vertebrates: Timing is everything. Gen. Comp. Endocrinol. 163, 70-76.
- Martino, N., Zenuto, R.R., Busch, C., 2007. Nutritional responses to different diet quality in the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (tuco-tucos). Comp. Biochem. Physiol. A 174, 974-982.

- Masters AM, Hähnel, 1989. Investigation of sex-hormone binding globulin interference in direct radioimmunoassays for testosterone and estradiol. *Clin. Chem.* 35, 979-84.
- Mastrángelo, M., Schleich, C., Zenuto, R., 2009. Short term effects of an acute exposure to predatory cues on the spatial working and reference memory performance in the tuco-tuco, *Ctenomys talarum*. *Anim. Behav.* 77, 685-692.
- McDonald, I.R., Lee, A.K., Than, K.A., Martin, R.W, 1986. Failure of glucocorticoid feedback in males of a population of small marsupials (*Antechinus swainsonii*) during the period of mating. *J. Endocrinol.* 108, 63-68.
- McDonald, I.R., Lee, A.K., Than, K.A., Martin, R.W, 1988. Concentrations of free glucocorticoids in plasma and mortality in the Australian bush rat (*Rattus fuscipes* Waterhouse). *J. Mammal.* 69: 740-748.
- Mikics, E., Kruk, M.R., Haller, J., 2004. Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids on aggressive behavior in male rats, *Psychoneuroendocrinology* 29, 618–635.
- Moberg, G.P., 1985. *Animal stress*. American Physiological Society. 324 pp.
- Moore, I.T., 2007. Advancing the Challenge Hypothesis. *Horm. Behav.* 51, 461-462.
- Mormède, P., Andanson, S., Aupérin, B., Beerda, B., Guémené D., Malmkvist, J., et al., 2007. Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol. Behav.* 92, 317-339.
- Möstl, E., Palme, R., 2002. Hormones as indicators of stress. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23, 67-74.

- Muggeo, M., Ginsberg, B.H., Roth, J., Neville, D.M., De-Meyts, P., Kahn, C.R., 1979. The insulin receptor in vertebrates is functionally more conserved during evolution than insulin itself. *Endocrinology* 104, 1393-1402.
- Muller, M.N., Wrangham, R.W., 2004. Dominance, aggression and testosterone in wild chimpanzees: a test of the "Challenge Hypothesis". *Anim. Behav.* 67, 113-123.
- Munck, A., Guyre, P., and Holbrook, N., 1984. Physiological functions of glucocorticoids during stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr. Rev.* 5, 25-44.
- National Diabetes Data Group, 1979. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 28, 1039-1057.
- Nelson, R., 2005. An introduction to behavioral endocrinology. Third edition. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts. 822 pp.
- Nesher, R., Karl, I.E., Kipnis, D.M., 1985. Dissociation of effects of insulin and contraction on glucose transport in rat epitrochlearis muscle. *Am. J. Physiol.* 249, C226-232.
- Neville, R.J.W., Weir, B.J., Lazarus, N.R., 1973. Insulin of hystricomorph rodents. *Diabetes* 22, 851-853.
- Neylan, T.C., 1998. Hans Selye and the field of stress research. *Neuropsychiatry Classics* 10(2), 230-231.
- Nicholson, J.R., Akil, H., Watson Jr. S.J., 2002. Orphanin FQ-induced hyperphagia is mediated by corticosterone and central glucocorticoid receptors. *Neuroscience* 115, 637-643.
- Nishi, M., Steiner, D.F., 1990. Cloning of complementary DNAs encoding islet amyloid polypeptide, insulin and glucagon precursors from a new world rodent, the degu, *Octodon degus*. *Mol. Endocrinol.* 4, 1192-1198.

- Norris, D.O., 1997. Vertebrate endocrinology. San Diego, CA, Academic Press.
- Nunes, S., Pelz, K.M., Muecke, E.M., Holekamp, K.E., Zucker, I., 2006. Plasma glucocorticoid concentrations and body mass in ground squirrels: seasonal variation and circannual organization. *Gen. Comp. Endocrinol.* 146, 131-138.
- Oglesbee, B.L., 1996. Enfermedades de las aves y de los animales exóticos de compañía. In: Birchard, S.J., Sherding, R.G., (Eds.), *Manual Clínico de Pequeñas especies*. McGraw Hill Interamericana, Mexico, pp 1481-1687.
- Opazo, J.C., Soto-Gamboa, M., Bozinovic, F., 2004. Blood glucose concentration in caviomorph rodents. *Comp. Biochem. Physiol. A* 137, 57-64.
- Opazo, J.C., Palma, R.E., Melo, F., Lessa, E.P., 2005. Adaptive evolution of the insulin gene in caviomorph rodents. *Mol. Biol. Evol.* 22(5), 1290-1298.
- Ostner, J., Kappeler, P., Heistermann, M., 2008. Androgen and glucocorticoid levels reflect seasonally occurring social challenges in male redfronted lemurs (*Eulemur fulvus rufus*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 62, 627-638.
- Ottenweller, J.E., Tapp, W.N., Burke, J.M., Natelson, B.H., 1985. Plasma cortisol and corticosterone concentrations in the golden hamster. *Life Sci.* 37, 1551-1558.
- Oyegbile, T.O., Marler, C.A., 2005. Winning fights elevate testosterone levels in California mice and enhances future ability to win fights. *Horm. Behav.* 48, 259-267.
- Pacak, K., Palkovits, M., Yadid, G., Kvetnansky, R., Kopin, I.J., Goldstein, D.S., 1998. Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 275:R1247-R1255.

- Pacak, K., Palkovits, M., 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr. Rev.* 22 (4), 502-548.
- Palme, R., Rettenbacher, S., Touma, C., Möstl, E., 2005. Stress Hormones in Mammals and Birds: Comparative Aspects Regarding Metabolism, Excretion, and Noninvasive Measurement in Fecal Samples. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1040, 162-171.
- Patchev, V.K., Almeida, O.F.X., 1998. Gender specificity in the neural regulation of the response to stress: new leads from classical paradigms. *Mol. Neurobiol.* 16, 63-77.
- Pecoraro, N.C., Roy, M., Dallman, M.F., 2005. Glucocorticoids dose-dependently remodel energy stores and amplify incentive reality effects. *Psychoneuroendocrinology* 30, 815-825.
- Pecoraro, N., Dallman, M.F., Warne, J.P., Ginsberg, A.B., Laugero, K.D., la Fleur, S.E., Houshyar, H., Gomez, F., Bhargava, A., Akana, S.F., 2006. From Malthus to motive: how the HPA axis engineers the phenotype, yoking needs to wants. *Prog. Neurobiol.* 79, 247-340.
- Philippe, J., Giordano, E., Gjinovci, A., Meda, P., 1992. cAMP prevents glucocorticoid-mediated inhibition of insulin gene expression in rodent islet cells. *J. Clin. Invest.* 90, 2228-2233.
- Place, N.J., Kenagy, G.J., 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.
- Place, N.J., Veloso, C., Visser, G.H., Kenagy, G.J., 2002. Energy expenditure and testosterone in free-living male yellow-pine chipmunks. *J. Exp. Zool.* 292, 460-467.

- Ploug, T., Galbo, H., Richter, E.A., 1984. Increased muscle glucose uptake during contractions: no need for insulin. *Am. J. Physiol.* 247, E726-731.
- Pride, R.E., 2005. High faecal glucocorticoid levels predict mortality in ring-tailed lemurs (*Lemur catta*). *Biol. Lett.* 1(1), 60-63.
- Racey. P.A., Pam, W.H., 1974. The reproductive cycle in the male pipistrelle bat, *Pipistrellus pipistrellus*. *J. Zool.* 172, 101.
- Rainey, W.E., Byrd, E.W., Sinnokrot, R.A., Carr, B.R. 1991. Angiotensin-II activation of cAMP and corticosterone production in bovine adrenocortical cells: Effects of nonpeptide angiotensin-II antagonists. *Mol. Cell. Endocrinol.* 81, 33-41.
- Randall, D., Burggren, W., French, K., 2001. Eckert Animal physiology: Mechanisms and adaptations. 5<sup>th</sup> ed. W. H. Freeman and Company. New York.
- Reeder, D.M., Kramer, K.M., 2005. Stress in free-ranging mammals: integrating physiology, ecology and natural history. *J. Mammal.* 86(2), 225-235.
- Reig, O., Busch, C., Ortells, M., Contreras, J., 1990. An overview of evolution, systematics, population biology, cytogenetics, molecular biology and speciation in *Ctenomys*. In: Nevo, E., Reig, O. (Eds.), *Evolution of subterranean mammals at the organismal and molecular levels*, A.R. Liss-Wiley, New York, pp.71-96.
- Retana-Marquez, S., Bonilla-Jaime, H., Vázquez-Palacios, G., Martínez-Gracia, R., Velázquez-Moctezuma, J., 2003. Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. *Horm. Behav.* 44, 327-337.
- Rich, EL., Romero, L.M., 2005. Exposure to chronic stress downregulates corticosterone responses to acute stressors. *Am J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288, R1628-R1626.

- Richter, E.A., Garetto, L.P., Goodman, M.N., Ruderman N.B., 1982. Muscle glucose metabolism following exercise in the rat: increased sensitivity to insulin. *J. Clin. Invest.* 69, 785-793.
- Rivier, C., 1999. Gender, sex steroids, corticotrophin releasing factor, nitric oxide and the HPA axis response to stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 64, 739-751.
- Romero, L.M., Wingfield, J.C., 1999. Alterations in hypothalamic-pituitary-adrenal function associated with captivity in Gambel's white-crowned sparrows (*Zonotrichia leucophrys gambelii*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 122, 13-20.
- Romero, L.M., Wikelski, M., 2001. Corticosterone levels predict survival probabilities of Galápagos marine iguanas during El Niño events. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA* 98, 7366-7370.
- Romero, L.M., 2002. Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* 128, 1-24.
- Romero, L.M., 2004. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *TREE* 19(5), 249-255.
- Romero, L.M., 2006. Seasonal changes in hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitivity in free-living house sparrows (*Passer domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 149, 66-71.
- Romero, L.M., Meister, C.J., Cyr, N.E., Kenagy, G. J., Wingfield, J.C., 2008. Seasonal glucocorticoid responses to capture in wild free-living mammals. *Am. J. Physiol.* 294, R614- R622.
- Rommerts, F., 1998. Testosterone: an overview of biosynthesis, transport, metabolism and nongenomic actions. In: Nieschlag, E., Behre, H. (Eds.). *Testosterone. Action-Deficiency-Substitution*, 2<sup>nd</sup> edition. Springer, Berlin, pp 1-31.

- Rosenthal, K.L., Peterson, M.E., Quesenberry, K.E., Lothrop, C.D. Jr., 1993. Evaluation of plasma cortisol and corticosterone responses to synthetic adrenocorticotrophic hormone administration in ferrets. *Am. J. Vet. Res.* 54(1), 29-31.
- Rosner, W., 1990. The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone binding globulin: recent advances. *Endocr. Rev.* 11, 80-91.
- Roy, B.N., Wynne-Edwards, K.E., 1995. Progesterone, estradiol, and prolactin involvement in lactation, including lactation following a postpartum mating, in the Djungarian Hamster (*Phodopus campbelli*). *Biol. Reprod.* 52, 855–863.
- Sands, J., Creel, S., 2004. Social dominance, aggression and faecal glucocorticoid levels in a wild population of wolves, *Canis lupus*. *Anim. Behav.* 67, 387-396.
- Sapolsky, R. M., 1983. Endocrine aspects of social instability in the olive baboon (*Papio anubis*). *Am. J. Primatol.* 5, 365-379.
- Sapolsky, R. M., 1986. Endocrine and behavioral correlates of drought in the wild baboons. *Am. J. Primatol.* 11, 217-226.
- Sapolsky, R.M., 1992. *Stress, the Aging Brain, and the Mechanisms of Neuron Death*. Cambridge, MA: MIT press.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., Munck, A.U., 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory and preparative actions. *Endocr. Rev.* 21, 55-89.
- Schmidt, K.L., Malisch, J.L., Breuner, C.W., Soma, K.K., 2010. Corticosterone and cortisol binding sites in plasma, immune organs and brain of developing zebra finches: Intracellular and membrane-associated receptors. *Brain Behav. Immun.* 24, 908-918.

- Schmidt, K.L., Soma, K.K., 2008. Cortisol and corticosterone in the songbird immune and nervous systems: local vs. systemic levels during development. *Am. J. Physiol.* 295, 103-110.
- Schradin, C., 2008. Seasonal changes in testosterone and corticosterone levels in four social classes of a desert dwelling sociable rodent. *Horm. Behav.* 53, 573-579.
- Schriock, E.D., Murai, J.T., Siiteri, P.K., 1982. Squirrel monkey: possible model for steroid hormone resistance. The Endocrine Society, Program and Abstracts, San Francisco, California: 64<sup>th</sup> annual meeting.
- Seale, J.V., Wood, S.A., Atkinson, H.C., Bate, E., Lightman, S.L., Ingram, C.D., Jessop, D.S., Harbuz, M.S., 2004. Gonadectomy reverses the sexually diergic patterns of circadian and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in male and female rats. *J Neuroendocrinol.* 16(6), 516-524.
- Selvage, D., Rivier, C., 2003. Importance of the paraventricular nucleus of the hypothalamus as a component of a neural pathway between the brain and the testes that modulates testosterone secretion independently of the pituitary. *Endocrinology* 144, 594-598.
- Selye, H., 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents. 138, 32-35.
- Selye, H., 1956. *The stress of life.* McGraw-Hill, New York.
- Shams, I., Avivi, A., Nevo, E., 2005. Oxygen and carbon dioxide fluctuations in burrows of subterranean blind mole rats indicate tolerance to hypoxic–hypercapnic stresses. *Comp. Biochem. Physiol. A* 142, 376-382.
- Shelat, S.G., Flanagan-Cato, L.M., Fluharty, S.J., 1999. Glucocorticoid and mineralocorticoid regulation of angiotensin II type 1 receptor binding and inositol triphosphate formation in WB cells. *J. Endocrinol.* 162, 381-391.

- Shepherd, P.R., Gnudi, L., Tozzo, E., Huanming, Y., Leach, F., Kahn, B.B., 1993. Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 268, 22243-22246.
- Sheriff, M.J., Krebs, C.J., Boonstra, R., 2010. Assessing stress in animal populations: Do fecal and plasma glucocorticoids tell the same story?. *Gen. Comp. Endocrinol.* 166, 614-619.
- Sinervo, B., Miles D.B., Frankino W.A., Klukowski, M., DeNardo, D.F., 2000. Testosterone, endurance, and Darwinian fitness: natural selection and sexual selection on the physiological bases of alternative male behaviors in side-Blotched lizards. *Horm. Behav.* 38, 222-233.
- Slaats, E.H., Kennedy, J.C., Kruijswijk, H., 1987. H. Interference of sex-hormone binding globulin in the "Coat-A-Count" testosterone no-extraction radiounmunoassay. *Clin. Chem.* 33, 300-302.
- Smith, C.J., Norman, R.L., 1987. Influence of the gonads on cortisol secretion in female rhesus macaques. *Endocrinology* 121(6), 2192-2198.
- Smith, C.L., Hammond, G.L., 1992. Hormonal regulation of corticosteroid-binding globulin biosynthesis in the male rat. *Endocrinology* 130, 2245-2251.
- Smith, L.F., 1966. Species variation in the aminoacid sequence of insulin. *Am. J. Med.* 40, 662-666.
- Smith, M.S., Grove, K.L., 2002. Integration of the regulation of reproductive function and energy balance: lactation as a model. *Front. Neuroendocrinol.* 23, 225-256.
- Soto-Gamboa, M., Villalón, M., Bozinovic, F., 2005. Social cues and hormone levels in male *Octodon degus* (Rodentia): a field test of the Challenge Hypothesis. *Horm. Behav.* 47, 311-318.

- Soto-Gamboa, M., Gonzalez, S., Hayes L.D., Ebensperger, L., 2009. Validation of a radioimmunoassay for measuring fecal cortisol metabolites in the hystricomorph rodent *Octodon degus*. J. Exp. Zool. 311, 496-503.
- Spinedi, E., Chisari, A., Pralong, F., Gaillard, R.C., 1997. Sexual dimorphism in the mouse hypothalamic-pituitary-adrenal axis function after endotoxin and insulin stresses during development. Neuroimmunomodulation 4, 77-83.
- Spinedi, E., Gaillard, R.C., 1998. A regulatory loop between the hipotalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis and circulating leptin: a physiological role of ACTH. Endocrinology 139, 4016-4020.
- Strier, K.B., Ziegler, T.E., Wittwer, D.J., 1999. Seasonal and Social Correlates of Fecal Testosterone and Cortisol Levels in Wild Male Muriquis (*Brachyteles arachnoides*). Horm. Behav. 35, 125-134.
- Strier, K.B., Lynch, J.W., Ziegler, T.E., 2003. Hormonal changes during the mating and conception seasons of wild northern muriquis (*Brachyteles arachnoides hypoxanthus*). Am. J. Primatol. 61(2), 85-99.
- Šumbera, R., Chitaukali, W. N., Elichová, M., Kubová, J., Burda, H., 2004. Microclimatic stability in burrows of an Afrotropical solitary bathyergid rodent, the silvery mole-rat (*Heliophobius argenteocinereus*). J. Zool. Lond. 263, 409-416.
- Sumners, C., Gaulta, T.R., Freglya, M.J., 1991. Potentiation of angiotensin II-induced drinking by glucocorticoids is a specific glucocorticoid Type II receptor (GR)-mediated event. Brain Research 552, 283-290.
- Surwit, R.S., van Tilburg, M., Zucker, N., McCaskill, C.C., Parekh, P., Feinglos, M.N., Edwards, C.L., Williams, P., Lane, J.D., 2002. Stress management improves long-term glycemic control in type 2 diabetes. Diabetes Care 25, 30-34.

- Swett, M.B., Breuner, C.W., 2008. Interaction of testosterone, corticosterone and corticosterone binding globulin in the white-throated sparrow (*Zonotrichia albicollis*). *Comp. Biochem. Physiol.* 151(2), 226-231.
- Tanriverdi, F., Silveira, L.F.G., MacColl, G.S., Bouloux, P.M.G., 2003. The hypothalamic–pituitary–gonadal axis: immune function and autoimmunity. *J. Endocrinol.* 176, 293–304.
- Tataranni, P.A., Larson, D.E., Snitker, S., Young, J.B., Flatt, J.P., Ravussin, E., 1996. Effects of glucocorticoids on energy metabolism and food intake in humans. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 271(2), E317-E325.
- Tate, J., Ward, G., 2004. Interferences in Immunoassay. *Clin. Biochem. Rev.* 25(2), 105-120.
- Taymans, S.E., DeVries, A.C., DeVries M.B., Nelson, R.J., Friedman, T.C., Castro, M., Detera-Wadleigh, S., Carter, C.S., Chrousos, G.P., 1997. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis of prairie voles (*Microtus ochrogaster*): evidence for target tissue glucocorticoid resistance. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106(1), 48-61.
- Tilbrook, A.J., Turner, A.I., Clarke, I.J., 2000. Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. *Rev. Reprod.* 5, 105-113.
- Todhunter, R., Gemmell, R. T., 1987. Seasonal changes in the reproductive tract of the male marsupial bandicoot *Isodon macrourus*. *J. anat.* 154, 173-186.
- Touma, C., Palme, R., Sachser, N., 2004. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Horm. Behav.* 45, 10-22.
- Touma, C.; Palme, R., 2005. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: The importance of validation. *Ann. NY Acad. Sci.* 1046, 54-74.

- Tucker, H.A., 1994. Lactation and its hormonal control. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*, vol. 2. Raven Press, New York, pp. 1065–1098.
- Venkataseshu, G.K., Estergreen, V.L., Jr., 1970. Cortisol and corticosterone in bovine plasma and the effect of adrenocorticotropin. *J. Dairy Sci.* 53, 480-483.
- Viau, V., Meaney, M.J., 1991. Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. *Endocrinology* 129, 2503-2511.
- Vleck, D., 1979. The energy costs of burrowing by the pocket gopher *Thomomys bottae*. *Physiol. Zool.* 52, 122-136.
- Wade, J.N.; Schneider, J.E., 1992. Metabolic fuels and reproduction in female mammals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 16 (2), 235-272.
- Wallberg-Henriksson H., Holloszy, J.O., 1985. Activation of glucose transport in diabetic muscle: responses to contraction and insulin. *Am. J. Physiol.* 249, C233-237.
- Wallberg-Henriksson, H., Holloszy, J.O., 1984. Contractile activity increases glucose uptake in severely diabetic rats. *J. Appl. Physiol.* 57: 1045-1049.
- Wang, C., Catlin, D.H., Starcevic, B., Heber, D., Ambler, C., Berman, N., Lucas, G., Leung, A., Schramm, K., Lee, P.W.N, Hull, L., Swerdloff, R.S., 2005. Low-fat high-fiber diet decreased serum and urine androgens in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90(6), 3550-3559.
- Wang, C., Catlin, D.H., Starcevic, B., Heber, D., Ambler, C., Berman, N., Lucas, G., Leung, A., Schramm, K., Lee, P.W.N, Hull, L., Swerdloff, R.S., 2005. Low-fat high-fiber diet decreased serum and urine androgens in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90(6), 3550-3559.
- Weir, B.J., 1974. Reproductive characteristics of Hystricomorph rodents. *Symp. Zool., Soc. Lond.* 34, 265-301.

- Weiss, J.M., 1968. Effects of coping responses on stress. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 65, 251-260.
- Wikelski, M., Ricklefs, R.E., 2001. The physiology of life histories. *TREE* 16, 479-481.
- Williams, T.D., 2008. Individual variation in endocrine systems: moving beyond the "tyranny of the golden mean". *Phil. Trans. R. Soc. B* 363, 1687-1698.
- Wingfield, J.C., Hegner, R.E., Dufty A.M. Jr., and Ball, G.F., 1990. The "Challenge Hypothesis": theoretical implications for patterns of testosterone secretion, mating systems, and breeding strategies. *Am. Nat.* 136(6), 829-846.
- Wingfield, J.C., Jacobs J., Hillgarth, N., 1997. Ecological constraints and the evolution of hormone-behavior interrelationships, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 807, 22-41.
- Wingfield, J. C., Jacobs, J. D., Tramontin, A. D., Perfito, N., Meddle, S., Maney, D. L., Soma, K., 2000. Toward an ecological basis of hormone-behavior interactions in reproduction of birds: En: Wallen, K., Schneider, J. (Eds.). *Reproduction in context*, pp. 85-128. MIT Press, Cambridge.
- Young, E.A., 1995. The role of gonadal steroids in hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation. *Crit. Rev. Neurobiol.* 9, 371-381.
- Zar, J.H., 1984. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Zenuto, R., 2010. Dear enemy relationships in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*: the role of memory of familiar odours. *Anim. Behav.* 79, 1247-1255.
- Zenuto, R., Lacey, E.A., Busch, C., 1999. DNA fingerprinting reveals polygyny in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Mol. Ecol.* 8, 1529-1532.
- Zenuto, R., Estavillo, C., Fanjul, M.S., 2007. Familiarity and mating behavior in the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (tuco-tuco). *Can. J. Zool.* 85, 944-955.

- Zenuto, R., Vassallo, A.I., Busch, C., 2001. A method for studying social and reproductive behavior of subterranean rodents in captivity. *Acta Theriol.* 46, 161-170.
- Zenuto, R., Vassallo, A., Busch, C., 2002. Comportamiento social y reproductivo del roedor subterráneo *Ctenomys talarum* en condiciones de semicautiverio. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 75,165-177.
- Zielinski, W.J., Vandenberg, J.G., 1993. Testosterone and competitive ability in male house mice, *Mus musculus*: laboratory and field studies. *Anim. Behav.* 45, 873-891.
- Zimmerman, A.E., Moule, M.L., Yip, C.C., 1974. Guinea pig insulin. II. Biological activity. *J. Biol. Chem.* 249, 4026-4029.
- Zucker, I., 2001. Circannual rhythms: mammals. In: Takahashi, J., Turek, F.W., Moore, R.Y., (Eds.), *Handbook of Behavioral Neurobiology, Circadian clocks*, vol. 12. Kluwer Academic/Plenum, New York, pp. 509-528.
- Zuk, M., McKean, K.A., 1996. Sex differences in parasite infections: patterns and process, *Int. J. Parasitol.* 26, 1009–1124.
- Zuri, I., Gottreich, A., Terkel, J., 1998. Social stress in neighboring and encountering blind mole-rats (*Spalax ehrenbergi*). *Physiol. Behav.* 64(5), 611-620.