

“Respuestas antipredatorias y
comportamientos defensivos frente a
señales indicativas de la presencia de un
predador en el roedor subterráneo
Ctenomys talarum”



Tesis presentada para optar por el título de Doctora en Ciencias, Área Biología

Lic. Valentina Brachetta

DIRECTORES DE TESIS

- Director: Dr. Cristian Schleich
- Codirectora: Dra. Roxana Zenuto

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis es el resultado de un hermoso trabajo de casi 5 años, durante esta etapa me acompañaron varias personas leyendo, escuchando, aconsejando, corrigiendo, teniéndome paciencia, y por sobre todo, dándome ánimo en todo momento.

Particularmente, agradezco mucho:

- A Cris (Dr. Cristian Schleich) y Ro (Dra. Roxana Zenuto) por haber confiado en mí nuevamente, por estar siempre presentes, por ayudarme, por la paciencia, por la dedicación para la dirección de este trabajo.
- A mis compañeros Laboratorio por la ayuda, por los mates infaltables de cada día y por hacerme sentir muy cómoda en todo este tiempo.
- A mis viejos Hugo y Antonieta por ser mi mayor ejemplo y apoyarme incondicionalmente en todas las etapas de mi vida.
- A mis hermanos Pedro, María, Georgina, Camilo, Ciro, Patricio y Dante, por ser mis 7 personas favoritas en el mundo y mi compañía eterna.
- A toda mi gran familia compartir este camino conmigo.
- A Fede por las soluciones técnicas de último momento siempre, por ayudarme y acompañarme en todo.
- A mis amigos y amigas de toda la vida gracias por compartir todo conmigo, por estar presentes y darme ánimo siempre.
- A July y Bel, pero por sobre todo a sus gatitos.
- A las instituciones que hicieron posible este trabajo a través de becas para mi formación doctoral: la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); y a través de subsidios otorgados a los Directores del laboratorio: CONICET y ANPCyT.
- A los Jurados Dra. Verónica Valentinuzzi, Dr. Aldo Vassallo y Dr. Rubén Muzio por sus correcciones y por enriquecer este trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN GENERAL	7
<u>CAPÍTULO 1: RESPUESTA DE ANSIEDAD A CORTO PLAZO FRENTE A LA EXPOSICIÓN A OLORES DE UN PREDADOR</u>	14
INTRODUCCIÓN	15
MATERIALES Y MÉTODOS	17
RESULTADOS	23
DISCUSIÓN	31
<u>CAPÍTULO 2: EFECTO DE LA INTENSIDAD Y LA FRECUENCIA DE LA EXPOSICIÓN A LAS PISTAS DE UN PREDADOR EN LA APARICIÓN Y EXTINCIÓN DE RESPUESTAS DEFENSIVAS</u>	37
INTRODUCCIÓN	38
MATERIALES Y MÉTODOS	41
RESULTADOS	44
DISCUSIÓN	52
<u>CAPÍTULO 3: RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE GLUCOCORTICOIDES DE ORIGEN ENDÓGENO Y EXÓGENO Y LA RESPUESTA ANTI-PREDATORIA</u>	58
INTRODUCCIÓN	59
MATERIALES Y MÉTODOS	63
RESULTADOS	68
DISCUSIÓN	75
<u>CAPÍTULO 4: EXPOSICIÓN MATERNAL A PISTAS DIRECTAS DE UN PREDADOR: EFECTOS SOBRE EL COMPORTAMIENTO, FISIOLOGÍA E INMUNIDAD EN LAS CRÍAS</u>	81
INTRODUCCIÓN	82
MATERIALES Y MÉTODOS	86
RESULTADOS	93
DISCUSIÓN	99

<u>CAPÍTULO 5: COMPORTAMIENTO DE ALIMENTACIÓN BAJO RIESGO PREDATORIO: INFLUENCIA DEL ESTADO NUTRICIONAL Y LA EXPERIENCIA RECIENTE FRENTE A PISTAS DE UN PREDADOR</u>	<u>106</u>
INTRODUCCIÓN	107
MATERIALES Y MÉTODOS	110
RESULTADOS	114
DISCUSIÓN	117
<u>DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS</u>	<u>122</u>
<u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>129</u>

RESUMEN

La predación representa una importante fuerza evolutiva modelando adaptaciones específicas que permiten a los organismos presa reconocer, evitar y defenderse de los predadores. Más allá de los efectos letales de la predación, ha surgido un creciente interés con relación a los efectos no letales sobre la supervivencia y reproducción de las especies presa. En esta Tesis se evalúa la respuesta comportamental y fisiológica del roedor subterráneo *Ctenomys talarum*, frente a un factor de estrés natural, como las pistas indicativas de la presencia de predadores (orina, olor de piel de gato, inmovilización). Los resultados obtenidos revelan que la exposición de los tuco-tucos a estas pistas genera un estado de ansiedad e induce cambios comportamentales asociados a la disminución de la actividad locomotora y generación de conductas de evitación. Además, los olores de la piel resultaron más ansiogénicos que la orina. Los resultados evidencian que la intensidad del olor del predador natural tiene un rol en la aparición de comportamientos defensivos, aunque no se observó una relación directa entre la intensidad del olor del predador y los niveles de ansiedad. Por otro lado, la exposición repetida a las pistas de un predador generó una clara habituación de los tuco-tucos a ella. Por lo tanto, estos resultados proporcionan evidencia valiosa de que los tipos de olor del predador, junto con la frecuencia de exposición, son determinantes importantes de la aparición, intensidad y disminución de comportamientos defensivos en tuco-tucos. Asimismo, se encontró que, frente al olor de la piel, -y en mayor medida- a la inmovilización, los tuco-tucos responden fisiológicamente mediante la secreción de cortisol. A su vez, esta respuesta fue acompañada por una respuesta comportamental asociada a la aparición de estados de ansiedad, principalmente en los individuos inmovilizados. Sin embargo, la misma no fue notoria cuando se incrementó el cortisol plasmático por vía exógena. Por otro lado, este trabajo muestra la influencia del estrés prenatal asociado a la presencia de pistas del predador en el desarrollo de respuestas comportamentales de la descendencia, que muestran un claro estado de ansiedad y cambios comportamentales asociados con la disminución de la actividad locomotora y comportamientos de evitación. Por lo tanto,

estos individuos expuestos prenatalmente a señales predatorias muestran adaptaciones comportamentales que pueden contribuir a evitar los predadores en la vida adulta. Por ultimo, los tuco-tucos mostraron una clara preferencia por alimentarse en áreas donde estaban presentes las pistas de un herbívoro y no en áreas asociadas a pistas de un predador. Este evitamiento fue aún mayor luego de experimentar estrés por predación. Conjuntamente, los resultados obtenidos en esta tesis brindan un aporte al estudio de las respuestas de animales silvestres a situaciones estresantes cotidianas en su ambiente, en este caso, el riesgo de predación. Particularmente, el modelo *Ctenomys talarun* resulta de interés en el estudio de la fisiología y el comportamiento de roedores silvestres.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La predación ha sido considerada como una de las fuerzas de selección más importantes, afectando una inmensa variedad de características biológicas tales como las estructuras socio-espaciales de las comunidades, la organización social, los sistemas de apareamiento, el comportamiento y la homeostasis fisiológica de los individuos (Voelkl *et al.* 2016). Sin embargo, inicialmente, el mayor interés en el estudio de la predación fue focalizado sobre los efectos letales de la misma, esto es, sobre los efectos de la remoción de las presas en la demografía de las poblaciones, y a través de una diversidad de interacciones (ej. relaciones tróficas, parasitismo), en la estructura y dinámica de la comunidad (Lima 1998, Preisser *et al.* 2005, Boonstra 2013). Solo recientemente varios estudios han comenzado a analizar los efectos no letales (también denominados “indirectos”, “no mediados por el consumo” o “riesgo”) de la presencia de predadores o de las pistas indicadoras de su cercanía, los cuales se originan cuando las presas modifican su comportamiento en respuesta a la presencia de predadores (Clinchy *et al.* 2013, Moll *et al.* 2017). Estos efectos no letales de la predación han sido descritos en una gran variedad de especies, sugiriendo que los resultados finales del impacto no letal de los predadores serían, en términos probabilísticos, inclusive de mayor magnitud demográfica que los producidos por la muerte de las presas, involucrando además efectos transgeneracionales (Clinchy *et al.* 2013).

Una característica destacable de las interacciones predador-presa es que la predación actúa como una fuerza selectiva fuerte, conduciendo a diversas adaptaciones en las especies presa (Kats y Dill 1998, Lima 1998). Los organismos presa exhiben adaptaciones primarias o pasivas que contribuyen a evitar a los predadores, así como mecanismos secundarios que les permiten defenderse de los mismos. Los mecanismos defensivos incluyen características morfológicas (espinas), fisiológicas (toxinas), morfológicas-fisiológicas (cripsis y mimetismos), de historia de vida (retraso en la reproducción) o comportamentales (Kavaliers y Choleris 2001, Apfelbach *et al.* 2005). En conjunto, los efectos de estas estrategias se centran en la reducción de la probabilidad de encuentro con el predador, así como en la disminución del éxito de ataque sobre la presa localizada. Si bien el beneficio sobre la supervivencia resulta

evidente, el desarrollo de los mismos depende tanto de los compromisos y costos asociados, como de las capacidades de evaluación del riesgo (Kavaliers y Choleris 2001, Hegab *et al.* 2014).

En diversas especies de mamíferos, la defensa antipredatoria implica la detección y respuesta a señales químicas específicas que producen los predadores, tales como los olores originados en el pelaje, orina, heces y secreciones glandulares, variando el tipo de respuesta desencadenada de acuerdo a las características de la señal de predador detectada (Apfelbach *et al.* 2005). En este punto, cabe destacar que, en estudios de comunicación animal, se hace una distinción fundamental entre utilización del término señales, las cuales han evolucionado específicamente para alterar el comportamiento o la fisiología de un receptor, y pistas, que son fuentes de información incidentales detectadas por receptores sin intencionalidad (Jamie 2017, Maynard Smith y Harper 2003). Aunque esta última definición sería la más correcta para referirse a los olores de los predadores, en gran cantidad de estudios ambos términos se utilizan de manera indistinta.

Los comportamientos antipredatorios generados en presencia de olores de un predador han sido investigados en varias especies de mamíferos, tanto en laboratorio como en la naturaleza. En el laboratorio, la exposición a un predador o al olor del mismo produce disminuciones en la actividad locomotora, reducciones en los comportamientos no defensivos (ej. acicalamiento), y búsqueda de refugio donde protegerse del predador y monitorear sus movimientos. En el campo, otros efectos comportamentales, como alteraciones en los patrones de actividad, disminución del tiempo dedicado al forrajeo y la alimentación, y cambios de hábitat, son también frecuentemente observados (Dielenberg y McGregor 2001, Apfelbach *et al.* 2005, Staples 2010). Frente a una situación de riesgo predatorio, la ansiedad constituye una reacción de valor adaptativo, logrando evaluar el riesgo potencial de ese encuentro, así como generar una respuesta autonómica y comportamental que permita resolver esa situación estresante en forma exitosa. A diferencia del miedo, que ha sido descrito como el estado de un animal durante el contacto o inminente contacto con un predador, la ansiedad corresponde al estado del animal durante un ataque predatorio potencial (Craske *et al.* 2009). En conjunto, varias de estas modificaciones comportamentales, que les permiten a las presas estimar la ubicación, identidad y

peligro asociado al predador (evaluación de riesgo), poseen una gran similitud con varias psicopatologías humanas, en particular con desordenes de ansiedad, por lo que el riesgo predatorio ha resultado en un modelo de interés biomédico (Blanchard *et al.* 2006, Clinchy *et al.* 2013).

Así mismo, estas alteraciones comportamentales pueden estar acompañadas por cambios fisiológicos asociados a la respuesta de estrés. La respuesta generalizada involucra la liberación de la hormona adrenocorticotropica (ACTH) y glucocorticoides (GCs: cortisol y/o corticosterona, dependiendo de la especie) como resultado de la activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA). En paralelo al eje HPA, se produce la activación del eje simpático-médulo-adrenal (SMA) como parte de la reacción de lucha/huida, lo cual desencadena la liberación de catecolaminas (noradrenalina y adrenalina) al torrente sanguíneo (Wingfield *et al.* 1998, Reeder y Kramer 2005, Armario 2006). A pesar de que la respuesta inmediata de estrés es considerada como adaptativa, se sabe que la activación prolongada o crónica del eje HPA y, por lo tanto, concentraciones elevadas de GCs, pueden generar efectos deletéreos para las presas, afectando tanto su condición nutricional como su capacidad reproductiva y de supervivencia (Sapolsky 1992, Boonstra *et al.* 1998, Sheriff *et al.* 2009a, Sheriff *et al.* 2011). Así mismo, estos efectos pueden extenderse a generaciones siguientes, dado que se ha observado que la exposición materna a las pistas de predadores tiene un efecto negativo sobre el comportamiento maternal y la ansiedad de las crías (Mashoodh *et al.* 2009, Bauer *et al.* 2015, Bian *et al.* 2015). A diferencia de los factores de estrés reactivos (aquellos que involucran desafíos que comprometen la homeostasis sin requerir procesamiento cognitivo, como el frío, dolor, hemorragias), los de tipo anticipatorio representan amenazas que comprometen tanto la supervivencia como la pérdida de homeostasis, con la particularidad de incluir una base psicológica. El riesgo predatorio se incluye en esta última, donde la presa potencial responde a un estímulo basado en una evaluación que incluye un componente de respuesta innata, así como la memoria de experiencias anteriores (Boonstra 2013). Recientemente, diversos autores describieron estos cambios en las presas con el término “ecología del miedo” (Brown *et al.* 1999, Clinchy *et al.* 2013), destacando que el contacto con las pistas de la presencia de un predador natural representa una

situación de riesgo para los organismos presa y puede tener consecuencias importantes en su vida.

Una de las relaciones entre predador-presa más estudiadas es la existente entre felinos y roedores, la cual evolucionó durante milenios y condujo a desarrollar en los roedores respuestas antipredatorias frente a la presencia de señales de predador. Las evidencias disponibles dan cuenta de que muchas especies de roedores responden rápidamente y en una multiplicidad de formas, tanto a los predadores como a las pistas indicativas de su presencia en su ambiente natural (Apfelbach *et al.* 2005, 2015). Sin embargo, la mayoría de los estudios han sido realizados con especies modelo, esto es, con animales que son fáciles de mantener y reproducir en laboratorio y que presentan ciertas ventajas experimentales, como, por ejemplo, la existencia de variedades genéticas controladas dentro de la misma especie. Sin embargo, estos organismos no solo sufren una importante reducción en la variación genética y fenotípica, sino que los factores de estrés a los que se les somete experimentalmente no se corresponden con aquellos a los que están sujetos sus contrapartes silvestres, como son las restricciones alimentarias, predación, patógenos o interacciones agonísticas (Kolhaas *et al.* 1997). Por el contrario, son menos frecuentes los estudios que involucran la respuesta comportamental y fisiológica asociada en especies silvestres, representando los desafíos que los organismos encuentran en la naturaleza. Los reportes disponibles en relación a roedores silvestres expuestos a olores provenientes de sus predadores naturales se restringen a pocas especies e incluyen reportes sobre modificaciones en su actividad locomotora, de alimentación y uso del espacio en *Microtus oeconomus*, *Microtus agrestis*, *Microtus arvalis*, *Clethrionomys glareolus* (Calder y Gorman 1991; Borowski 1998a,b; Borowski y Owadowska 2001), efectos sobre la reproducción y desarrollo de crías en *Microtus unguiculatus*, *Mesocricetus auratus* y *Phodopus campbelli* (Vasilieva *et al.* 1999, 2001).

Ctenomys talarum (tuco tuco de los Talas, Thomas, 1898) es un roedor silvestre solitario, que se encuentra en suelos arenosos costeros de la provincia de Buenos Aires (Argentina). Ambos sexos en todas las edades (excepto las crías hasta el momento de dispersión) son sedentarios y mantienen territorios exclusivos (Busch *et al.* 1989). El sistema de cuevas de esta especie tiene una estructura compleja de galerías cerradas paralelas a la superficie del suelo, caracterizadas generalmente por un túnel axial

principal y un número variable de ramas laterales y túneles de alimentación, todos ellos conectados (Antenuchi y Busch 1992, Busch *et al.* 1989, 2000). El tamaño del home-range varía entre los sexos, con los machos ocupando áreas más grandes que las hembras. Esta diferencia se ha atribuido a variaciones en las demandas energéticas entre machos y hembras, siendo los machos más grandes que las hembras y requiriendo así mayores áreas de forrajeo (Cutrera *et al.* 2006). Además, se ha relacionado con el sistema de apareamiento de esta especie, una poliginia por defensa de recursos (Zenuto *et al.* 1999).

El sistema subterráneo de túneles en cual que habitan los tuco-tucos, además de ofrecer protección de las fluctuaciones ambientales extremas existentes en la superficie), se ha propuesto también como un amortiguador contra la predación, debido a que la cueva en sí misma representa una adaptación que les permite evitar a los predadores (Nevo 1995, Reig *et al.* 1990). Aún cuando la mayor parte de las actividades ocurre en el ambiente subterráneo, *C. talarum* realiza excursiones frecuentes a la superficie mientras busca alimento o durante la dispersión (Malizia *et al.* 1995, Busch *et al.* 2000). Aunque esta especie utiliza el olfato durante la excavación en la ubicación de parches de alimento (Schleich y Zenuto, 2007), la mayor parte de la recolección ocurre en la superficie, cuando los animales emergen a cortas distancias de las cuevas para cortar la vegetación que crece en el suelo y luego vuelven hacia las cuevas donde posteriormente consumen las hojas y tallos (Busch *et al.* 2000). Durante estos breves períodos en la superficie, los tuco-tucos se vuelven vulnerables a los predadores aéreos y terrestres, entre los que se encuentran principalmente los búhos, zorros y gatos salvajes (Vassallo *et al.* 1994, Busch *et al.* 2000, Canepuccia 2005). Además, en las áreas periurbanas también se han detectado eventos predatorios por perros y gatos domésticos (C. E. Schleich, com. pers). Recientemente, en un estudio de la dieta de felinos Sudamericanos, se encontró que el porcentaje de *Ctenomys* en la misma fue mayor que el de otras especies de roedores caviomorfos (Zapata *et al.* 2015).

Estudios previos en esta especie de roedor subterráneo demostraron que la exposición a señales de un predador natural ejerce un fuerte impacto sobre sus habilidades cognitivas. Estas habilidades son particularmente relevantes para *C. talarum*, ya que, un gran desarrollo de la orientación espacial y de la capacidad de

aprender y memorizar un sistema de túneles le permitiría lograr con éxito la obtención de alimento, reproducirse y defender el territorio de sus cuevas subterráneas (Antinuchi y Schleich 2003). Dentro de las cuevas, la orientación espacial se basa en información sensorial restringida, debido al uso limitado de las señales auditivas y olfativas, y a la imposibilidad de usar señales visuales para la orientación (Reichman y Smith 1990). En consecuencia, esta restricción de estímulos sensoriales requiere el desarrollo de mecanismos de orientación eficientes dentro de las cuevas. Estudios previos mostraron que esta habilidad espacial puede estar modulada por el riesgo de predación. Por ejemplo, se observó que la exposición puntual a señales directas de un predador (inmovilización y orina de un gato) genera una respuesta de estrés que produce un efecto negativo a corto plazo sobre la expresión de la memoria espacial de referencia (que es adquirida por la repetición de ensayos de una tarea, y persiste por días o meses) mientras que no afecta la formación de la memoria espacial de trabajo (se forma y expresa dentro de una sesión de una tarea) (Mastrángelo *et al.* 2009). Así mismo, se ha observado que el aprendizaje espacial es afectado en gran medida por la presentación puntual o crónica de señales de la presencia de predadores (Brachetta *et al.* 2014). Por lo tanto, *C. talarum* resulta un modelo interesante para investigar el desarrollo de comportamientos defensivos antipredatorios tendientes a evitar, no solo las consecuencias deletéreas de un ataque directo de los predadores, sino también las consecuencias de ataques fallidos, tales como alteraciones en la actividad y el uso del hábitat, la tasa de forrajeo, el crecimiento y la reproducción (Preisser y Bolnick 2008). Por lo tanto, el objetivo general de esta Tesis es evaluar la respuesta comportamental y fisiológica de un roedor silvestre subterráneo, *C. talarum*, frente a pistas indicativas de la presencia de un predador utilizadas como indicadores de riesgo potencial de predación.

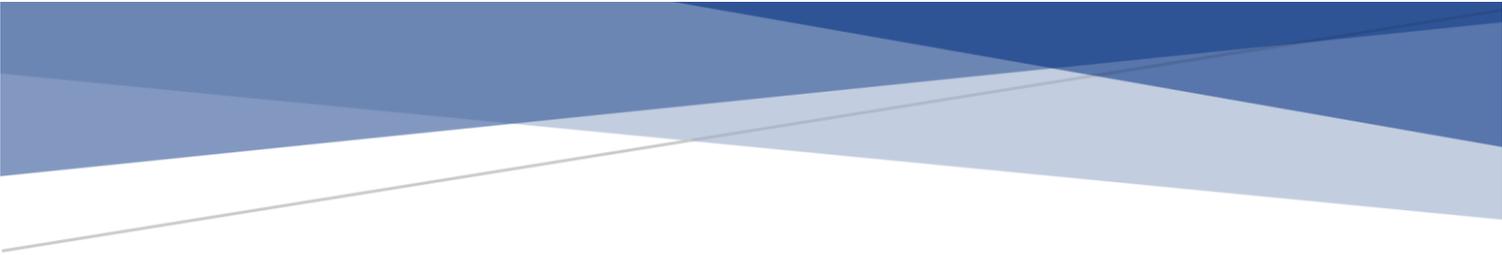
En particular, se desarrollaron los siguientes objetivos:

- 1): evaluar si el olor de un predador –gato- (orina o pelaje) induce variaciones a corto y largo plazo en los niveles de a) ansiedad b) actividad locomotora c) exploración y d) comportamientos defensivos; y la activación del eje pituitaria-adrenales. **(Capítulo 1).**
- 2): evaluar el efecto de la intensidad y repetición de la señal sobre la aparición y extinción de los comportamientos defensivos. **(Capítulo 2).**

3): evaluar a) la influencia de la naturaleza, y el mecanismo de evaluación de pistas indicativas de la presencia de un predador, sobre la generación de la respuesta comportamental y fisiológica a estrés por predación b) la respuesta comportamental asociada a tratamientos que inducen incrementos endógenos de GCs, exógenos, así como la inhibición de receptores de GCs. **(Capítulo 3).**

4): evaluar si la exposición prenatal a las señales de la presencia de un predador –gato- (orina, piel + inmovilización) induce variaciones en los niveles de a) ansiedad b) actividad locomotora c) exploración y d) comportamientos defensivos, así como en las respuestas fisiológicas e inmunológicas en crías. **(Capítulo 4).**

5): evaluar la respuesta comportamental asociada a actividades de alimentación frente a olores derivados de predadores utilizados como indicadores de riesgo potencial de predación en el roedor subterráneo *C. talarum*. **(Capítulo 5).**



CAPÍTULO 1

Respuesta de ansiedad a corto plazo frente a la
exposición a olores de un predador.

El contenido de este Capítulo ha sido publicado como:

Brachetta V., Schleich C.E. and Zenuto R.R. 2015. Short-term anxiety response of the subterranean rodent *Ctenomys talarum* to odors from a predator. *Physiology and Behavior*, 151, 596–603.

CAPÍTULO 1: RESPUESTA DE ANSIDAD A CORTO PLAZO FRENTE A LA EXPOSICIÓN A OLORES DE UN PREDADOR.

INTRODUCCIÓN

Como fue descrito anteriormente, muchas especies de mamíferos muestran respuestas fisiológicas y comportamentales a las señales de los predadores, tales como el olor de la piel, orina, heces, saliva y secreciones glandulares, particularmente de la glándula anal (Apfelbach *et al.* 2005, Takahashi *et al.* 2005). En roedores, la exposición a predadores naturales o sus olores generalmente induce estados de ansiedad, caracterizados por modificaciones a nivel comportamental (disminución de la actividad locomotora o inmovilización, supresión de comportamientos no defensivos, exploración, evitación de la fuente de peligro) y fisiológica (asociada principalmente a la activación del eje HPA-hipotalámico-pituitaria-adrenal; Adamec y Shallow 1993, Berton *et al.* 1998, Blanchard y Blanchard 1990, Dielenberg *et al.* 1999, Kavaliers *et al.* 1994, Zangrossi y File 1992). En el plano neural, diferentes exposiciones a olores de un predador inducen la activación de genes tempranos, como genes *c-fos* y/o $\Delta FosB$, que participan en los cambios en la actividad neuronal del sistema nervioso central (Hegab y Wei 2014).

La expresión comportamental de la ansiedad, si no es controlada, puede fácilmente consumir una parte desproporcionada de los presupuestos de energía y tiempo de cada animal, en detrimento de otros comportamientos cruciales (Blanchard *et al.* 2008). Recientemente, y como producto del cambio del foco de interés hacia los efectos no letales de los predadores sobre la demografía de la presa, el riesgo de predación ha sido indicado como un factor clave afectando no sólo las capacidades cognitivas de la presa, sino también un conjunto de variables fuertemente asociadas a la supervivencia y la reproducción, como la condición física, el comportamiento parental, la eficiencia de forrajeo, y hasta el daño cromosómico, que comprenden en conjunto la "ecología del miedo" (Clinchy *et al.* 2013).

Aunque los individuos presa muestran respuestas defensivas innatas cuando son expuestos al olor de un predador, estas varían de acuerdo a la fuente de olor detectado. Los olores derivados de la orina o las heces generalmente no solo persisten mucho tiempo después de que el predador abandona el lugar, sino que además estos defecan de forma selectiva en lugares donde no cazan. Por lo tanto, el valor predictivo respecto de una amenaza predatoria es bajo, provocando, en consecuencia, una respuesta comportamental débil. Por el contrario, los olores derivados de la piel o del pelaje de los predadores indican su proximidad y riesgo inmediato, generando un comportamiento defensivo más fuerte (Staples 2010, Blanchard *et al.* 2003a).

Si bien los mamíferos responden a los olores de los predadores en una diversidad de formas, la evidencia disponible en roedores silvestres se restringe a unas pocas especies e incluye reportes sobre las modificaciones en la actividad locomotora, la alimentación y el uso del espacio en varias especies de cricétidos (*Microtus oeconomus*, *Microtus agrestis*, *Microtus arvalis*) y el topillo rojo (*Clethrionomys glareolus*; Calder y Gorman 1991, Borowski 1998,b, Borowski y Owadowska 2001), así como efectos en la reproducción y el desarrollo de las crías en cricétidos (*Microtus unguiculatus* y *Mesocricetus auratus*) y el hámster enano (*Phodopus campbelli*, Vasilieva *et al.* 1999, 2001). Sullivan y colegas (1988) informaron que las tuzas norteamericanas (*Thomomys talpoide*) evitaron el TMT -2,4,5 trimetilazolina, olor sintético de las heces de zorro- en el laboratorio, pero no la orina de diversos predadores. Sin embargo, la evidencia presentada destaca que hay poca información disponible acerca de las respuestas comportamentales a estas situaciones amenazantes en roedores silvestres.

Ctenomys talarum constituye un modelo interesante para explorar los aspectos fisiológicos y comportamentales previamente mencionados. Como fue detallado en la introducción, este roedor silvestre se expone frecuentemente a varios predadores durante sus excursiones en superficie buscando alimento. Además de los efectos directos obvios y perjudiciales de un evento predatorio, un ataque fallido también presenta fuertes consecuencias para el fitness de la presa. En el caso particular de esta especie de tuco-tuco, la exposición a señales de predador afecta notoriamente las habilidades espaciales, claves para un animal que desarrolla la mayor parte de sus actividades en extensos y complejos túneles subterráneos (Mastrángelo *et al.* 2009, Brachetta *et al.* 2014). Por lo tanto, es esperable que frente a una situación de riesgo

predatorio, las presas experimenten un estado de ansiedad que les permita evaluar el riesgo potencial de este encuentro y generar una respuesta comportamental que permita resolver esta situación estresante con éxito. En el caso particular de *C. talarum*, la afectación de las habilidades cognitivas causada por el contacto con un predador podría evitarse mediante el desarrollo de comportamientos defensivos anti-predatorios. En consecuencia, el objetivo general de este capítulo consiste en evaluar la respuesta comportamental y fisiológica de individuos de *C. talarum* expuestos a los olores de predadores utilizados como indicadores de riesgo potencial de predación. En particular, evaluaremos en el tuco-tuco de los talas, si el olor de un predador (orina o piel/pelaje de un gato) induce: 1) cambios en la respuesta comportamental, así como 2) activación del eje pituitario-adrenal.

Se predice que señales de un predador, determinarán en individuos de *C. talarum*, aumentos en sus niveles de ansiedad y la aparición de comportamientos defensivos expresados como una disminución en la actividad locomotora y exploratoria. Tales cambios comportamentales serán acompañados de variaciones en parámetros fisiológicos relacionados al estrés tales como mayores niveles plasmáticos de glucosa, cortisol y proporción de neutrófilos-linfocitos. Estos efectos comportamentales y fisiológicos serán más evidentes ante la presentación de las pistas olfativas de piel/pelaje debido al carácter de inmediatez de un potencial ataque que estas representan en relación a la orina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y condiciones de laboratorio

Se capturaron adultos de ambos sexos (41 machos y 63 hembras), entre junio de 2013 y septiembre de 2014. Los animales fueron capturados en Mar de Cobo (37° 46'S, 57° 26'W, provincia de Buenos Aires, Argentina) utilizando un set de trampas plásticas de captura viva (de malla metálica, diámetro 10 cm) colocadas en el interior de los túneles asociados a montículos de superficie frescos. A continuación, los individuos fueron transportados al laboratorio y alojados en cajas de plástico individuales (30 × 40 × 25 cm) provistas de virutas de madera. La temperatura en el bioterio se mantuvo

constante a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ (termoneutralidad) y un fotoperíodo de LO 12:12. La comida fue suministrada diariamente y consistió en batatas, lechuga, maíz, pastos mixtos y semillas de girasol. Después de 7 días de aclimatación al laboratorio, los animales fueron utilizados en los diferentes experimentos. Al finalizar los mismos se devolvieron todos los animales al sitio de captura en buenas condiciones de salud.

En esta Tesis se realizó la captura, manejo y mantenimiento en cautiverio de todos los animales de acuerdo con las pautas aprobadas por la Sociedad Americana de Mastozoología (Sikes *et al.* 2016) y las leyes actuales de Argentina. Una vez conformado el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la FCEyN de la UNMDP, se tramitó la aprobación de los protocolos utilizados (CICUAL 2555-06-14 RD 141/15).

Exposición a señales de predadores

Los tuco-tucos fueron expuestos a dos señales olfativas diferentes que indican la presencia de un predador: virutas de madera impregnadas con orina de un gato macho adulto (obtenidas 24 hs antes de los experimentos) y un paño de tela (6 cm x 6 cm) impregnado con olor de la piel del gato (obtenido después de permitir que un gato use la tela para descansar sobre ella durante un período de 7 días antes del experimento). Las diferentes muestras se almacenaron (tiempo máximo 24 hs) a -20°C en bolsas plásticas selladas hasta su uso.

Para comparar los efectos de la exposición de los individuos a los olores de un predador, los individuos del grupo control fueron expuestos a agua inodora o aceite de citronela concentrado, que comúnmente se utiliza como olor control en muchos estudios, ya que se ha demostrado que no presenta ningún efecto de valor emocional o hedónico para las ratas (Williams *et al.* 2005, Kemble y Bolwahn 1997). Para ello, se colocó 1 μl de citronela en un papel adsorbente que se mezcló durante 1 minuto con 10 g de virutas de madera y posteriormente se conservaron en bolsas de plástico selladas hasta su uso. Dado que no se observó diferencia estadística entre el agua o la citronela (ver *resultados*), los datos de ambas condiciones de control se agruparon.

Procedimiento

Todos los procedimientos experimentales se realizaron a última hora de la mañana. El comportamiento exploratorio de los tuco-tucos se registró en dos pruebas utilizadas comúnmente para evaluar ansiedad en roedores: el *campo abierto* (Manaf *et al.* 2003, Montiglio *et al.* 2010) y el *laberinto en cruz elevado* (Pellow *et al.* 1985, Rodgers y Dalvi 1997, Holmes *et al.* 2000). Los individuos fueron utilizados sólo una vez en una de las pruebas a lo largo del estudio.

Campo abierto (CA, Fig. 1)

El dispositivo de campo abierto consiste en una caja de acrílico oscuro (100 cm × 100 cm × 35 cm altura) dividida en 25 cuadrados iguales marcados por líneas en el piso. Los cuadrados se nombran consecutivamente empezando del izquierdo inferior (A1) hasta el cuadrado superior derecho (E5). Los individuos ingresan en el campo abierto por una abertura cerca del cuadrado A3, mientras que la fuente de olor se coloca en el medio del cuadrado E3. Las muestras con olores del predador y controles se presentan a los individuos en soportes de plástico estandarizados (diámetro: 11 cm) cubiertos con una malla metálica. El comportamiento de los tuco-tucos se registra usando una cámara de video por un período de 10 min y, luego, se determinan los siguientes parámetros a partir de los registros: distancia total recorrida (cm), tiempo en movimiento (% tiempo total), latencia para llegar y tiempo en el área cerca de la fuente olor (% tiempo total en cuadrados E2 a E4 y D2 a D4), número de contactos con la fuente de olor, tiempo rascando paredes cercanas o distantes a la fuente de olor (s), y número de veces que los individuos orinan en el campo abierto. Al finalizar cada experimento, el dispositivo se lava con agua y detergente sin olor, se limpia con etanol y luego se seca al aire para que no permanezcan los olores de los tratamientos previos. Para manipular los animales y el aparato se utilizan guantes de latex para evitar transferir el olor humano.

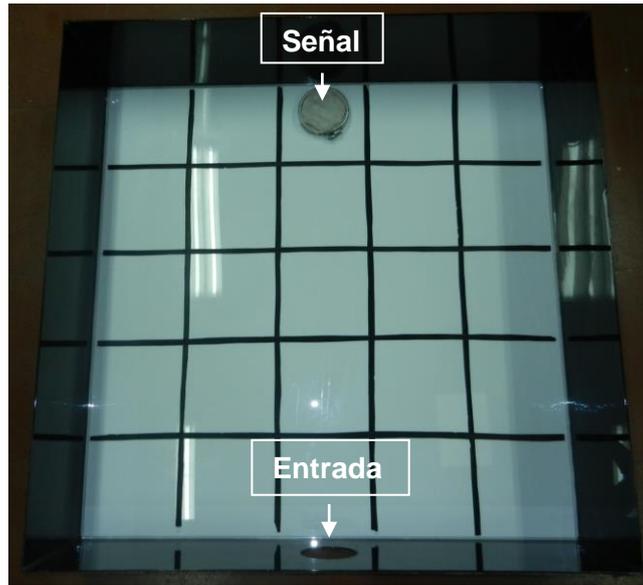


Fig 1. Dispositivo de campo abierto.

Procedimiento experimental: los animales fueron previamente asignados al azar a 4 grupos de acuerdo con el tipo de olor del predador usado: G1 control (7 machos y 9 hembras), G2 orina (9 machos y 11 hembras), G3 tela impregnada con olor de la piel del gato (6 machos y 9 hembras) y G4 control citronela (2 machos y 4 hembras).

Laberinto en cruz elevado (LE, Fig. 2)

El mismo consiste en una cruz de acrílico con dos brazos opuestos con paredes transparentes y dos con paredes oscuras (25 cm de altura). La longitud de los brazos es de 45 cm y se extiende desde una plataforma central de 10 cm x 10 cm. El laberinto se eleva 70 cm del nivel del piso con un soporte de madera. El comportamiento de los tuco-tucos se registra utilizando una cámara de video durante 5 minutos y, luego, se determinan los siguientes parámetros a partir de los registros: distancia total (cm), número de entradas a los brazos, número de entradas a los brazos transparentes (% total), tiempo de permanencia en los brazos transparentes (% tiempo total), el tiempo rascando las paredes en los brazos transparentes (% tiempo total) y el número de veces que los individuos orinan o defecan en el laberinto. Después de cada experimento, el laberinto se limpia como se explicó anteriormente.



Fig. 2. Laberinto en cruz elevado.

Procedimiento experimental: previo a empezar los experimentos, los animales fueron expuestos en sus cajas a las diferentes fuentes de olor del predador o muestras control durante un período de 60 minutos: G1 controles (7 machos y 7 hembras), G2 orina (6 machos y 10 hembras), G3 tela impregnada con el olor de la piel (6 machos y 9 hembras) y G4 control citronela (2 machos y 4 hembras). De manera similar al experimento anterior, las diferentes muestras se presentaron a los individuos en soportes de plástico cubiertos con una malla metálica durante un período de una hora antes de los experimentos. Luego, los animales fueron llevados al laberinto y colocados en la plataforma central para comenzar el experimento.

Medidas de estrés fisiológico

Al finalizar cada experimento, se tomó una muestra de sangre de cada animal a partir del seno retroorbital. El muestreo de sangre no tardó más de 3 min para garantizar que los niveles de glucocorticoides no fueron afectados por el procedimiento de extracción (Vera *et al.* 2011). Luego se determinaron los siguientes parámetros fisiológicos a partir de muestras de sangre: hematocrito, glucosa en sangre, cortisol en plasma y relación N/L; siendo que los últimos tres parámetros suelen cambiar durante la respuesta al estrés (Armario 2006, Johnstone *et al.* 2012) y se utilizaron en estudios

anteriores en *C. talarum* (Brachetta *et al.* 2014, Vera *et al.* 2008, 2011, Cutrera *et al.* 2010, Schleich *et al.* 2015).

Hematocrito: los niveles de hematocrito, informativos de la condición fisiológica de un organismo (Johnstone *et al.* 2012), se obtuvieron por centrifugación capilar durante 15 min a 14.000 rpm.

Glucosa: los niveles de glucosa en sangre, que varían en respuesta a factores de estrés de nivel intermedio (Armario *et al.* 1986), se determinaron utilizando un glucómetro (Accu-Chek Active Roche Diagnostics, rango de medición del sistema: 10-600 mg/dL).

Cortisol: dado que en *C. talarum* se encontró que el cortisol, y no la corticosterona, varía en respuesta a la exposición a factores de estrés (Vera *et al.* 2011), los valores de esta hormona se obtuvieron utilizando un kit DRG™ (Cortisol ELISA EIA-1887, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas en fase sólida).

Neutrófilos/Linfocitos: el número de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos se determinó mediante un microscopio a 450X, a partir de extendidos de sangre fijados en metanol al 70% durante 10 min y teñidos con May-Grunwald-Giemsa. Se contaron todos los tipos de celulares en un total de 200 leucocitos y luego se calculó la relación N/L. La relación N/L es un parámetro de estrés que aumenta con la secreción de glucocorticoides particularmente asociada al estrés crónico (Davies *et al.* 2008), pero más recientemente Müller y colegas (2011) propusieron que la relación N/L y los GCs indicarían diferentes condiciones de estrés. En *C. talarum*, se han verificado aumentos en la relación N/L durante situaciones estresantes puntuales (inmovilización breve, Vera *et al.* 2011) y crónicas (por ejemplo, cautiverio, Vera *et al.* 2008 y restricción alimentaria, Schleich *et al.* 2015).

Análisis estadístico

Se utilizó el test ANOVA de dos vías (sexo y exposición como factores) para evaluar si los diferentes parámetros fisiológicos y comportamentales de estrés difirieron entre tuco-tucos hembra y macho expuestos o no a olores del predador (orina y tela

impregnada con el olor de la piel del gato). Cuando se observaron efectos estadísticamente significativos de los factores, se utilizó el test de *Tukey* para identificar diferencias entre grupos.

RESULTADOS

Control: agua vs citronela

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos expuestos a agua o citronela: *test de campo abierto*; distancia total recorrida (test de t, $n = 22$; $gl = 20$, $t = -0.634$, $p = 0.533$), tiempo en movimiento (test de t, $n = 22$; $gl = 20$, $t = -0.366$, $p = 0.719$), latencia en llegar a la fuente de olor (test de t, $n = 22$; $gl = 20$, $t = 0.158$, $p = 0.876$), tiempo en el área cercana a la fuente de olor (test de t, $n = 22$; $gl = 20$, $t = -1.289$, $p = 0.212$), número de contactos con la fuente de olor (test de t, $n = 22$; $gl = 20$, $t = -1.146$, $p = 0.265$), tiempo rascando paredes en la zona cercana (test de Mann-Whitney, $n = 22$; $T = 116.5$, $p = 0.100$) o lejana (test de t, $n = 22$; $gl = 20$, $t = -0.0277$, $p = 0.978$) a la fuente de olor; medidas de estrés fisiológico: hematocrito (test de t, $n = 22$; $gl = 20$, $t = 0.629$, $p = 0.537$), cortisol (test de Mann-Whitney, $n = 22$; $T = 86.000$, $p = 0.707$), glucosa (test de Mann-Whitney, $n = 22$; $T = 75.500$, $p = 0.101$) y relación N/L (test de t, $n = 22$; $gl = 20$, $t = -0.595$, $p = 0.558$). *Test de laberinto en cruz elevado*: distancia total recorrida (test de Mann-Whitney, $n = 18$; $T = 58.000$, $p = 0.963$), número de entradas a los brazos (test de Mann-Whitney, $n = 18$; $T = 57.000$, $p = 0.963$), número de entradas a los brazos transparentes (test de t, $n = 18$; $df = 16$, $t = -0.0608$, $p = 0.952$), tiempo de permanencia en brazos transparentes (test de t, $n = 18$; $gl = 16$, $t = 1.662$, $p = 0.116$), tiempo rascando paredes en brazos transparentes (test de t, $n = 18$; $gl = 16$, $t = 0.887$, $p = 0.388$); medidas de estrés fisiológico: hematocrito (test de t, $n = 18$; $gl = 16$, $t = -0.276$, $p = 0.786$), cortisol (test de Mann-Whitney, $n = 18$; $T = 58.000$, $p = 0.963$), glucosa (test de t, $n = 18$; $gl = 16$, $t = -0.365$, $p = 0.720$) y relación N/L (test de Mann-Whitney, $n = 18$; $T = 52.000$, $p = 0.673$).

Test de campo abierto

– *Distancia total recorrida (cm)*: la distancia total recorrida no difirió entre los tratamientos (ANOVA, $n = 52$; $gl = 2$, $F = 1.611$, $p = 0.211$) ni entre sexos (ANOVA, $n = 52$; $gl = 1$, $F = 0.0130$, $p = 0.910$).

– *Tiempo en movimiento (% tiempo total)*: la presencia de olores del predador disminuyó el porcentaje de tiempo en movimiento en individuos expuestos (ANOVA, $n = 52$; $gl = 2$, $F = 24.301$, $p < 0.001$, Fig. 3a) aunque no se encontraron diferencias entre sexos (ANOVA, $n = 52$; $gl = 1$, $F = 0.786$, $p = 0.380$). Tests de *Tukey* revelaron que los grupos expuestos fueron diferentes a los controles (control vs G2: $p < 0.001$; control vs G3: $p < 0.001$), sin embargo, no se encontraron diferencias entre G2 y G3 ($p = 0.599$).

– *Latencia para llegar a la fuente de olor*: el tiempo empleado hasta hacer contacto con la fuente de olor no difirió entre los grupos expuestos y el control (ANOVA, $n = 52$; $gl = 2$, $F = 0.918$, $p = 0.407$) ni entre sexos (ANOVA, $n = 52$; $gl = 1$, $F = 0.854$, $p = 0.360$).

– *Tiempo en el área cercana a la fuente de olor (% tiempo total)*: no se encontraron diferencias entre los tratamientos (ANOVA, $n = 52$; $gl = 2$, $F = 0.230$, $p = 0.796$) ni entre sexos (ANOVA, $n = 52$; $gl = 1$, $F = 1.245$, $p = 0.270$).

– *Número de contactos con la fuente de olor*: el número de contactos no difirió significativamente entre los grupos control y expuestos a las diferentes fuentes de olor (ANOVA, $n = 52$; $gl = 2$, $F = 0.516$, $p = 0.600$) ni entre sexos (ANOVA, $n = 52$; $gl = 1$, $F = 1.741$, $p = 0.194$).

– *Tiempo rascando paredes en la zona cercana a la fuente de olor (s)*: el tiempo rascando las paredes en la zona cercana a la fuente de olor difirió significativamente entre los grupos control y tratamiento (ANOVA, $n = 52$; $gl = 2$, $F = 3.853$, $p = 0.028$; Fig. 3b). Test de *Tukey* revelaron que los valores de los grupos control fueron mayores que los observados en el grupo G2 ($p = 0.028$). No se encontraron diferencias entre sexos (ANOVA, $n = 52$; $gl = 1$, $F = 0.209$, $p = 0.650$).

– *Tiempo rascando paredes en la zona lejana a la fuente de olor (s)*: similarmente, el tiempo rascando paredes en la zona lejana a la fuente de olor difirió entre los grupos control y tratamiento (ANOVA, $n = 52$; $gl = 2$, $F = 6.571$, $p = 0.003$; Fig. 3c). Tests de *Tukey* revelaron que los valores de los grupos control fueron mayores que los observados en el grupo G2 ($p < 0.001$) y G3 ($p < 0.001$). No se observaron diferencias entre sexos (ANOVA, $n = 52$; $gl = 1$, $F = 0.442$, $p = 0.510$).

– *Orina y heces*: debido a que solo 12 hembras 8 machos orinaron, mientras que 17 hembras y 15 machos defecaron en el campo abierto, este parámetro no fue analizado.

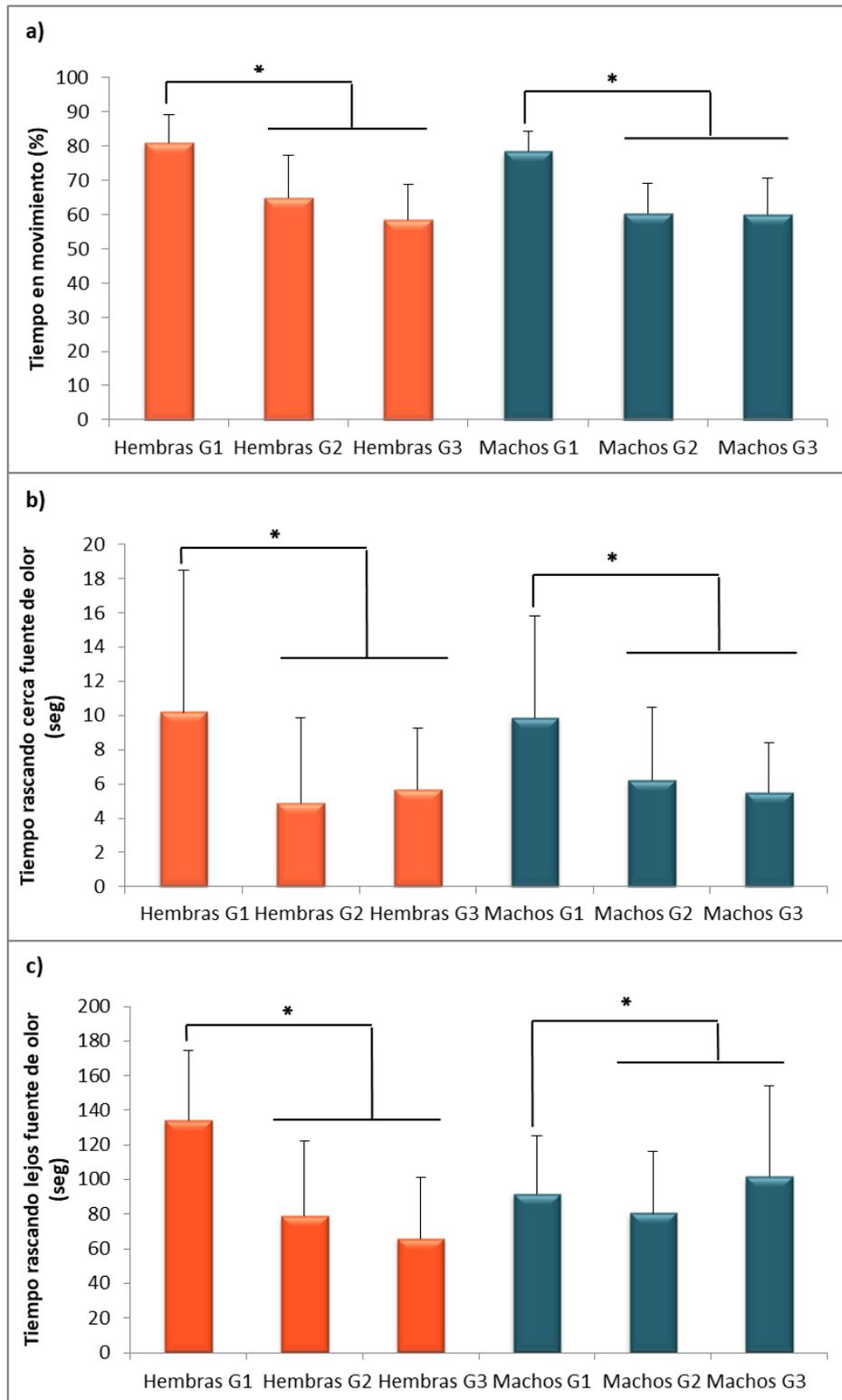


Fig. 3. Tiempo en movimiento (% total) (Media \pm DE) (a), tiempo rascando las paredes cerca (b) y lejos (c) la fuente de olor (seg) (Media \pm DE) en el campo abierto (hembras y machos, controles (G1) y expuestos a estrés (G2: orina y G3: olor de piel de gato). Las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el control y los grupos expuestos.

Medidas de estrés fisiológico

– *Hematocrito*: el hematocrito no difirió entre los grupos tratamiento y control (ANOVA, $n = 52$; $gl = 2$, $F = 0.168$, $p = 0.846$). Se detectaron valores de hematocrito mayores en machos que en hembras (ANOVA, $n = 52$; $gl = 1$, $F = 20.651$, $p < 0.001$, Tabla 1).

– *Niveles de glucosa en sangre*: los niveles de glucosa en sangre no difirieron entre los grupos tratamiento y control (ANOVA, $n = 52$; $gl = 2$, $F = 0.410$, $p = 0.667$), y tampoco se observaron diferencias entre sexos (ANOVA, $n = 52$; $gl = 1$, $F = 1.692$, $p = 0.199$, Tabla 1).

- *Niveles de cortisol plasmático*: los niveles de cortisol no difirieron entre los tratamientos y los grupos control (ANOVA, $n = 52$, $gl = 2$, $F = 0.0893$, $p = 0.915$), pero se observaron diferencias significativas en los niveles de cortisol entre los sexos, con valores mayores observados en las hembras (ANOVA, $n = 52$, $gl = 1$, $F = 13.309$, $p < 0.001$, Tabla 1).

– *Relación neutrófilos/linfocitos (N/L)*: a pesar de que se observó una tendencia a mayores proporciones en el grupo 3 en ambos sexos, no se observaron diferencias en la relación N/L entre los grupos control y tratamiento (ANOVA, $n = 52$, $gl = 2$, $F = 2.425$, $p = 0.100$), mientras que difieren entre sexos, con valores más altos observados en machos (ANOVA, $n = 52$; $gl = 1$, $F = 7.494$, $p = 0.009$, Tabla 1).

Tabla 1: hematocrito (media \pm desvío estándar), niveles de glucosa en sangre (mg/ml) (media \pm desvío estándar), relación neutrófilos/linfocitos (media \pm desvío estándar) y niveles plasmáticos de cortisol (ng/ml) en machos y hembras de *Ctenomys Talarum* (n =52) en grupo control (G1) y grupos expuestos a olores de predadores (G2: orina y G3: olor de piel de gato).

	Campo abierto					
	G1		G2		G3	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Hematocrito	44.2 \pm 2	48.14 \pm 4	42.09 \pm 3	49.55 \pm 5	44.67 \pm 5	48.5 \pm 3
Niveles de glucosa en sangre(mg/ml)	75 \pm 12	94 \pm 32	93.6 \pm 23	80.71 \pm 26	104.67 \pm 32	85.2 \pm 25
Niveles de cortisol plasmático (ng/ml)	33.91 \pm 22	9.80 \pm 4	31.94 \pm 30	14.01 \pm 9	24.18 \pm 17	13.88 \pm 5
Relación neutrófilos/linfocitos	1.15 \pm 1	1.17 \pm 1	1.02 \pm 1	1.9 \pm 1	2.56 \pm 5	4.87 \pm 3

Test de laberinto en cruz elevado

- *Distancia total recorrida (cm)*: la distancia total recorrida fue menor en individuos expuestos a olores de predadores, aunque este resultado fue sólo marginalmente significativo (ANOVA, n = 46, gl = 2, F = 2.800, p = 0.079, Fig. 4a). No se observaron diferencias entre sexos (ANOVA, n = 46; gl = 1, F = 0.884, p = 0.353).

- *Número de entradas a los brazos*: no se observaron diferencias entre los grupos control y los grupos expuestos (ANOVA, n = 46, gl = 2, F = 2.313, p = 0.112) ni entre machos y hembras (ANOVA, n = 46; gl = 1, F = 1.071, p = 0.307).

- *Número de entradas a los brazos transparentes (% total)*: los individuos expuestos a olores de un predador ingresaron menos veces a los brazos transparentes que los controles (ANOVA, n = 46; gl = 2, F = 4.753, p = 0.014, Fig. 4b). El test de *Tukey* reveló diferencias entre los grupos G1 vs. G2 (p = 0.029) y G1 vs. G3 (p = 0.030), pero no se encontraron diferencias entre G2 y G3 (p = 1.000). El número de entradas no difirió entre sexos (ANOVA, n = 46; gl = 1, F = 1.167, p = 0.286).

- *Tiempo de permanencia en los brazos transparentes (% del tiempo total)*: se observó un efecto significativo de la exposición de los individuos a olores de un predador (ANOVA, n = 46; gl = 2, F = 7.226, p = 0.002), con tuco-tucos expuestos permaneciendo

menos tiempo en los brazos transparentes que los controles (test de *Tukey*, G1 vs. G2: $p = 0.013$; G1 vs. G3: $p = 0.003$), pero no se encontraron diferencias entre G2 y G3 ($p = 0.844$). No se observaron diferencias entre machos y hembras en este parámetro (ANOVA, $n = 46$; $gl = 1$, $F = 2.648$, $p = 0.112$, Fig. 4c).

- *Tiempo rascando las paredes en los brazos transparentes (% del tiempo total)*: se observó un efecto global significativo de exponer a los individuos a olores de un predador (ANOVA, $n = 46$; $gl = 2$, $F = 4.204$, $p = 0.022$, Fig. 4d). El test de *Tukey* reveló que los tuco-tucos expuestos al olor de piel de gato rascaban menos tiempo que los individuos del grupo control mientras estaban en los brazos transparentes ($p = 0.017$), pero no se encontraron diferencias entre G2 y G3 ($p = 0.410$). Nuevamente, no se detectaron diferencias entre machos y hembras (ANOVA, $n = 46$; $gl = 1$, $F = 0.852$, $p = 0.362$).

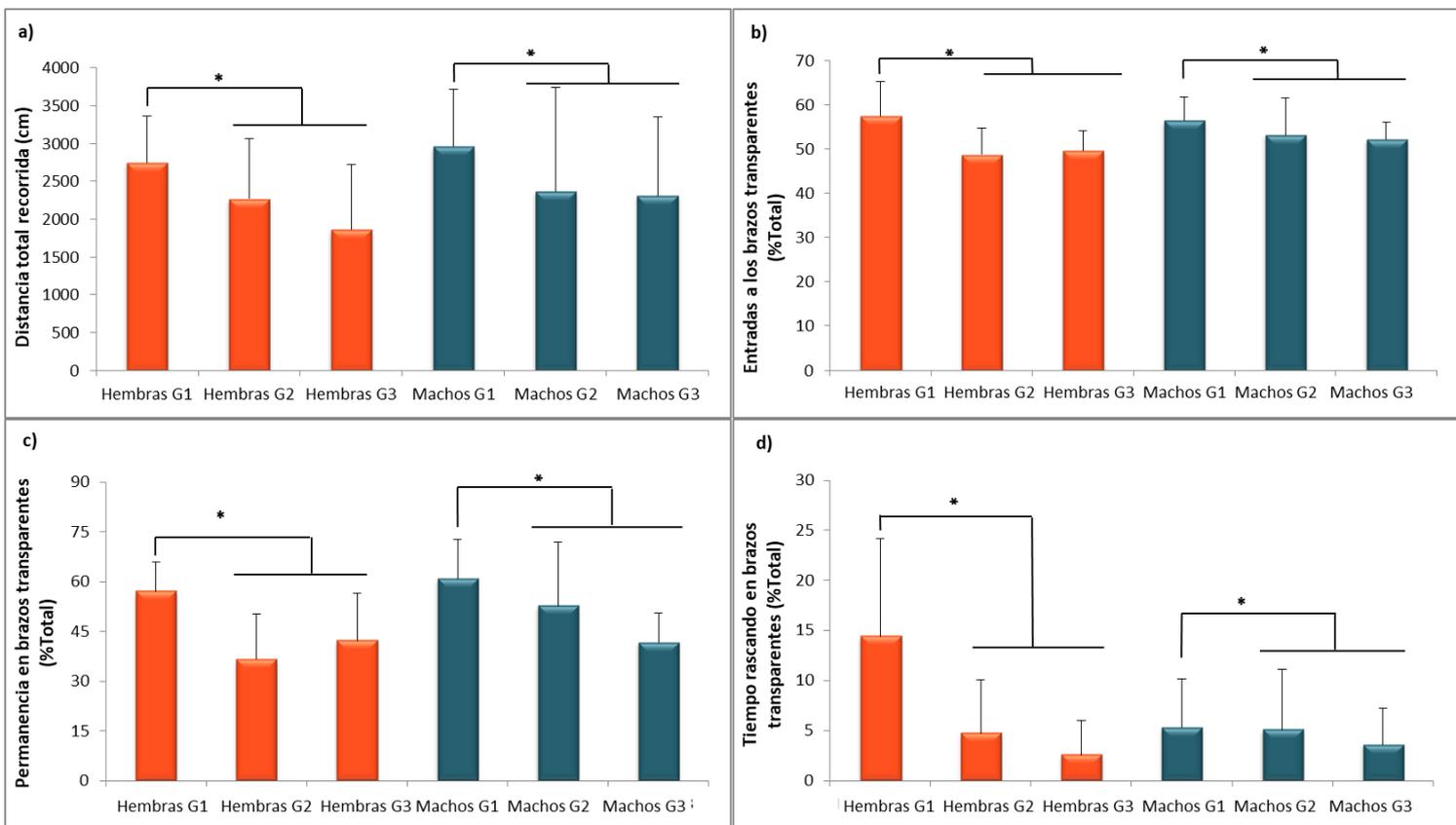


Fig. 4. Distancia total recorrida (cm) (Media \pm DE) (a) y número de entradas a los brazos transparentes (%) (Media \pm DE) (b), tiempo en los brazos transparentes (% total) (Media \pm DE) y el tiempo rascando las paredes en los brazos transparentes (% total) (Media \pm DE) (d) en el laberinto elevado (hembras y machos, controles y expuestos al estrés). Las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el control y los grupos expuestos.

Medidas de estrés fisiológico

- *Hematocrito*: se detectaron valores de hematocrito superiores en los grupos tratados que en los controles (ANOVA, $n = 46$; $gl = 2$, $F = 3.703$, $p = 0.033$). El análisis *a posteriori* reveló diferencias significativas entre G1 y G3 ($p = 0.042$), pero no se encontraron diferencias entre G1 y G2 ($p = 0.939$) y entre G2 y G3 ($p = 0.087$). Se observaron diferencias entre sexos, con valores más altos en machos (ANOVA, $n = 46$; $gl = 1$, $F = 27.256$, $p < 0.001$, Tabla 2).

- *Niveles de glucosa en sangre*: no se observaron diferencias entre los grupos tratados y control (ANOVA, $n = 46$; $gl = 2$, $F = 0.359$, $p = 0.701$) o entre sexos (ANOVA, $n = 46$; $gl = 1$, $F = 1.946$, $p = 0.171$, Tabla 2).

- *Niveles de cortisol plasmático*: los niveles de cortisol no difirieron entre los grupos tratamiento y control (ANOVA, $n = 46$; $gl = 2$, $F = 1.113$, $p = 0.339$), sin embargo, se observaron valores más altos en las hembras (ANOVA, $n = 46$; $gl = 1$, $F = 4.733$, $p = 0.036$, Tabla 2).

- *Relación Neutrófilos/Linfocitos (N/L)*: en el test del laberinto elevado no se observaron diferencias entre los grupos control y tratamiento (ANOVA, $n = 46$; $gl = 2$, $F = 0.123$, $p = 0.884$) ni entre sexos (ANOVA, $n = 46$; $gl = 1$, $F = 2.374$, $p = 0.131$, Tabla 2).

Tabla 2: hematocrito (media \pm desvío estándar), niveles de glucosa en sangre (mg/ml) (media \pm desvío estándar), relación neutrófilos/linfocitos (media \pm desvío estándar) y niveles plasmáticos de cortisol (ng/ml) en machos y hembras de *Ctenomys talarum* (n = 46) en grupo control (G1) y grupos expuestos a olores de predadores (G2: orina y G3: olor de piel de gato).

	Laberinto en cruz elevado					
	G1		G2		G3	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Hematocrito	44 \pm 1	46.86 \pm 2	44.6 \pm 2	46.83 \pm 3	44.67 \pm 3	50.5 \pm 3
Niveles de glucosa en sangre (mg/ml)	90.12 \pm 29	87.43 \pm 24	95.3 \pm 47	80 \pm 18	90.22 \pm 25	69.67 \pm 14
Niveles de cortisol plasmático (ng/ml)	30.07 \pm 34	15.65 \pm 9	27.67 \pm 41	8.05 \pm 3	14.32 \pm 8	8.84 \pm 3
Relación neutrófilos/linfocitos	1.72 \pm 1	1.17 \pm 1	1.12 \pm 1	2.22 \pm 2	1.52 \pm 1	3.45 \pm 3

DISCUSIÓN

La predación conlleva un riesgo mucho mayor que la pérdida temporal de alimento, agua o una pareja, ya que un solo encuentro predador-presa puede conducir a la muerte de la presa o producir un efecto significativo sobre su fitness (Kavaliers y Choleris 2001). Por lo tanto, es esperable que las presas desarrollen capacidades para distinguir las pistas de los predadores que indiquen un riesgo potencialmente mortal y generen reacciones comportamentales apropiadas en respuesta a esta amenaza. Estos comportamientos "anti-predatorios" son cruciales para la supervivencia (Apfelbach *et al.* 2005).

Varios trabajos han demostrado que los olores de los predadores desencadenan en las presas una serie de respuestas fisiológicas y comportamentales no condicionadas. En estudios de campo, se demostró que los olores de los predadores tienen un impacto directo sobre la reproducción, el uso del espacio, la actividad locomotora o la competencia intraespecífica (Vasilieva *et al.* 2000, Roberts *et al.* 2001, Borowski y Owadowska 2001). Por otro lado, en trabajos de laboratorio, se observaron mayores niveles de ansiedad y aparición de comportamientos defensivos luego de la

exposición a los olores de los predadores, aunque estos efectos se presentan con variaciones entre especies (Carobrez y Bertoglio 2005, Ennaceur 2014). Por ejemplo, De Paula y colegas (2005) demostraron que ratas macho albinas Wistar mostraron comportamientos de ansiedad después de la exposición al olor de los predadores, mientras que Dielenberg y colegas (1999) mostraron que la rata gris (*Rattus norvegicus*) exhibió mayores niveles de ansiedad en el laberinto en cruz elevado luego de la exposición a un collar de gato. Generalmente los cambios comportamentales observados con mayor frecuencia después de la exposición al olor de los predadores son disminuciones en la actividad locomotora y comportamientos no defensivos -como el aseo y la reproducción- y el retiro a lugares alejados del sitio con olor (Blanchard y Blanchard 1989, McGregor *et al.* 2002).

En esta primera parte de la Tesis Doctoral expusimos individuos adultos de *C. talarum* a dos diferentes olores de predadores y evaluamos su respuesta en las pruebas de campo abierto y laberinto elevado. En la primera prueba se encontró que la presencia de olores de predadores disminuyó el porcentaje de tiempo en movimiento en individuos expuestos a olores de orina o piel/pelaje, una respuesta también observada, por ejemplo, en machos de ratas Sprague-Dawley en respuesta al olor del gato (Muñoz-Abellán *et al.* 2011). Por otro lado, se encontró que el tiempo transcurrido hasta el contacto, el número de contactos con la fuente de olor y el tiempo en el área cercana a la fuente de olor no difirió entre los grupos control y tratamiento. Sin embargo, el tiempo rascando las paredes cerca y lejos de la fuente de olor en los grupos tratamiento fue menor que en los grupos control, lo que indica, nuevamente, niveles más bajos de actividad en los individuos confrontados con las señales de los predadores.

Los resultados del laberinto en cruz elevado, una prueba clásica para evaluar la ansiedad en roedores, también revelaron una disminución en la distancia total recorrida en individuos expuestos a los olores de los predadores, aunque este resultado fue sólo marginalmente significativo. No se encontraron diferencias en el número total de entradas a los brazos entre el grupo control y los grupos tratamiento. Sin embargo, los individuos expuestos a los olores de los predadores entraron con menos frecuencia y se quedaron menos tiempo en los brazos transparentes que los controles. Por lo tanto, los tuco-tucos expuestos a una situación amenazante tienden a evitar los brazos abiertos y

muestran una clara preferencia por las áreas protegidas, un resultado consistente con una respuesta ansiogénica. Resultados similares se observaron en diversas especies comúnmente usadas en laboratorio, como ratas macho Wistar (McGregor *et al.* 2002) que mostraron un menor número de entradas y permanecieron menos tiempo en los brazos abiertos del laberinto elevado cuando se expusieron a olores de gato. Por otro lado, y concomitante a lo observado en el campo abierto, los individuos expuestos al olor de piel de gato rascaron las paredes menos que los individuos control mientras están en los brazos transparentes. Tomando los resultados de ambas pruebas en conjunto, queda claro que la exposición de individuos de *C. talarum* a los olores de predadores provoca un estado de ansiedad y la aparición de comportamientos anti-predatorios, caracterizados principalmente por una disminución en las actividades locomotoras y exploratorias. Tales cambios en su comportamiento representan un claro beneficio antipredatorio ya que los animales cautelosos estarían más atentos a la presencia de un predador en la cercanía. Además, se espera que la tasa de encuentro y la detección por un predador se reduzcan y, en consecuencia, la probabilidad de captura sea potencialmente reducida (Banks *et al.* 2000).

A pesar de que la mayoría de los estudios que investigan la ansiedad en roedores se han centrado en un sexo (principalmente a los machos; Blanchard *et al.* 1995, Bridges y Starkey 2004), algunos trabajos examinaron las diferencias en la respuesta de ansiedad entre machos y hembras, revelando una gran variabilidad en los resultados obtenidos. Aunque se describieron diferencias sexuales en los niveles de ansiedad antes o después de la exposición a los olores de un predador (Bridges y Starkey 2004, Johnston y File 1991, Zimmerberg y Farley 1993, Palanza 2001, Starkey y Bridges 2010), estos resultados parecerían estar influenciados por una gran diversidad de factores como la especie o el tipo de cepa utilizada, la edad y/o condición reproductiva de los individuos y el tipo de prueba comportamental realizada. Esta enorme diversidad en las respuestas de ansiedad entre sexos ha imposibilitado el establecimiento de patrones generales en roedores. En el presente estudio encontramos que los parámetros comportamentales obtenidos en el campo abierto y el laberinto elevado no difirieron entre machos y hembras, con o sin exposición a los olores de los predadores. Este resultado es congruente con las características biológicas de esta especie de roedor solitario, en la cual ambos sexos están igualmente expuestos a la predación durante sus

periodos de forrajeo en la superficie, y también con estudios previos que revelaron que la exposición a señales de predadores afectó las habilidades espaciales de ambos sexos en forma similar (Mastrángelo *et al.* 2009, Brachetta *et al.* 2014).

Otro resultado destacable de este primer experimento es la ausencia de diferencias entre las respuestas comportamentales de los individuos expuestos a la orina u al olor de piel de gato. En varias especies de roedores, los efectos comportamentales producidos por heces/olores de la glándula anal (por ejemplo, TMT) fueron considerablemente menos evidentes que los obtenidos por contacto con la piel/pelaje de un gato vivo u olores naturales de un gato (Blanchard *et al.* 2003a, McGregor *et al.* 2002). En esta línea, Muñoz-Abellán y colaboradores (2008) encontraron que la exposición de ratas al olor de piel de gato provocó una inhibición comportamental mayor en comparación con otras expuestas a olor de orina. Este efecto disímil se puede atribuir a los diferentes grados de información predictiva indicada por estas pistas. El olor de la piel/pelaje del gato indicaría que un predador está cercano mientras que las heces o los olores de la glándula anal implica que el mismo ha estado presente (Blanchard *et al.* 2003a). Por lo tanto, basándose en esta hipótesis, la ausencia de diferencias entre la respuesta comportamental de *C. talarum* a orina o de piel de gato es intrigante. Una posible explicación podría atribuirse a las intensidades de olor utilizadas en este estudio, lo cual se expandirá en el Capítulo 2. Es sabido que la cantidad o concentración de señal u olor del gato suele ser un factor importante que subyace al nivel de expresión del comportamiento de miedo no condicionado (Takahashi *et al.* 2005). Sin embargo, algunos estudios mostraron evidencia que apoya la idea que los olores de arena utilizada por un gato y los olores de piel resultan en cambios similares de comportamiento a largo plazo (Cohen *et al.* 2005, 2006), aunque esta ausencia de diferencias entre ambas fuentes podría haberse debido a la inclusión accidental de pelo en la muestra de olor (Muñoz-Abellan *et al.* 2008). En los presentes experimentos se procedió a coleccionar las muestras de orina justo después de que el gato orinara con el fin de evitar la contaminación de muestras, por lo que la ausencia de diferencias no se debería a una mezcla accidental de las fuentes de olor.

Aparte del análisis de la respuesta comportamental, varios estudios han investigado los efectos fisiológicos de la exposición a los olores de predadores en roedores (Apfelbach *et al.* 2005). En el presente estudio se midieron parámetros

fisiológicos que estiman la condición de los individuos (hematocrito) o que varían durante la respuesta al estrés y pueden utilizarse como indicadores de estrés (niveles de glucosa, relación N/L y niveles de cortisol en plasma). En el laberinto en cruz elevado se detectaron valores de hematocrito más altos en los grupos expuestos al olor de piel/pelaje. Dado que los individuos de ambos sexos fueron alimentados de la misma manera, las diferencias observadas no pueden atribuirse a variaciones en la hidratación. Además, en ambas pruebas se detectaron valores de hematocrito mayores en machos que en hembras. En un estudio previo Brachetta y colegas (2014) obtuvieron resultados similares, y esto podría atribuirse al dimorfismo sexual en el tamaño en esta especie, donde los machos muestran mayor masa muscular y robustez.

En estos análisis también se encontró que la glucosa en sangre, sensible a los factores de estrés de nivel intermedio (Armario 2006), no difiere entre el grupo control y los grupos expuestos al olor de los predadores en las pruebas de campo abierto y laberinto en cruz elevado. En relación con la relación N/L, Vera y colegas (2011) encontraron que *C. talarum* mostró incrementos en estos valores después de una situación de estrés crónico causada por el cautiverio, las restricciones alimentarias y también en respuesta a la inmovilización. En el presente experimento, no se detectaron diferencias en la relación N/L entre los grupos control y tratamiento, aunque los valores de N/L en el último grupo fueron claramente superiores a los esperados para la condición de cautiverio (Vera *et al.* 2011), lo que puede atribuirse, al menos en parte, a una alta varianza en este parámetro. La detección de niveles incrementados de glucocorticoides en roedores expuestos a riesgo de predación es muy variable y dependiente de la duración (pocos minutos a semanas), tipo de exposición (diferentes fuentes de olor, presencia de gato, sonidos) y el método de muestreo hormonal (plasma, heces) (Masini *et al.* 2005, Tidhar *et al.* 2007, Muñoz-Abellan *et al.* 2008). Estas diferencias contribuyen a confundir la relación entre la exposición al olor de los predadores y el nivel de respuesta fisiológica desencadenada. Notablemente, no se encontraron diferencias en los niveles de cortisol en plasma entre el grupo control y los grupos tratamiento después de ambas pruebas. Este resultado, junto con la falta de variación observada en los niveles de glucosa en sangre y el leve aumento en la relación N/L, sugiere una pobre asociación entre las respuestas fisiológicas y comportamentales a los olores de los predadores en *C. talarum*. La falta de asociación entre ambas

respuestas se observó, por ejemplo, en ratones de campo hembras, las cuales mostraron aumentos en los niveles de corticosterona, pero no comportamientos asociados a ansiedad en la prueba de LE después de una breve exposición a estrés social (Smith *et al.* 2013). Por otra parte, se ha demostrado recientemente que el TMT, que produce un estado de mayor vigilancia y ansiedad en los roedores y se utiliza como olor de predador, provoca su efecto a través de sistemas neurales diferentes de los obtenidos con olor de predador (Day *et al.* 2004), lo que indica que respuestas comportamentales similares podrían estar relacionadas con diferentes reacciones fisiológicas.

En conclusión, en este capítulo se presentó información sobre el comportamiento de ansiedad inducido por los olores de predadores con diferentes grados de información predictiva de riesgo asociado en el roedor subterráneo silvestre *C. talarum*. Los resultados mostraron que la exposición de los tuco-tucos a los olores de los predadores genera un estado de ansiedad e induce cambios comportamentales asociados con la disminución de la actividad locomotora y la generación de comportamientos de evitación. El desarrollo de estos comportamientos defensivos antipredatorios contribuiría a evitar las consecuencias deletéreas de un ataque predatorio directo, que demostró producir efectos negativos claros sobre los procesos cognitivos en este roedor subterráneo (Mastrángelo *et al.* 2009, Brachetta *et al.* 2014).



CAPÍTULO 2

Efecto de la intensidad y la frecuencia de la exposición a las pistas de un predador en la aparición y extinción de respuestas defensivas.

El presente Capítulo ha sido publicado como:

Brachetta V., Schleich C.E. and Zenuto R.R. 2016. Source odor, intensity, and exposure pattern affect antipredatory responses in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*.

Ethology, 122, 923–936.

CAPÍTULO 2: EFECTO DE LA INTENSIDAD Y LA FRECUENCIA DE LA EXPOSICIÓN A LAS PISTAS DE UN PREDADOR EN LA APARICIÓN Y EXTINCIÓN DE RESPUESTAS DEFENSIVAS.

INTRODUCCIÓN

En roedores, la exposición a los predadores naturales o a sus olores induce estados de ansiedad, aunque no todos los tipos de olores de predadores generan un rango común de respuestas relacionadas con el miedo e incluso una misma señal de olor puede evocar respuestas diferentes de acuerdo a su intensidad y frecuencia de distribución espacial en el hábitat de la presa (Takahashi *et al.* 2005).

Este patrón diferencial de respuesta condujo a analizar la eficacia relativa de las diversas fuentes de olor de predadores sobre la aparición de comportamientos antipredatorios. En un interesante estudio McGregor y colegas (2002) compararon el efecto del olor de la piel de gato con 2,4,5 trimetiltiazolina (TMT), un extracto de heces de zorro utilizado comúnmente en los estudios sobre los efectos de los olores de los predadores. Los resultados mostraron que ambas señales de olor difieren claramente en sus efectos; el de la piel del gato generando comportamientos defensivos en ratas y el TMT provocando efectos similares a los producidos por los olores aversivos. Un resultado similar fue obtenido por Blanchard y colegas (2003b) quienes no observaron condicionamiento a diferentes concentraciones de TMT. Además, estos autores probaron los efectos de orina, heces y olores de piel de gato en ratas, encontrando que mientras la orina no producía cambios comportamentales, las heces y los olores de piel provocaban cambios similares en los comportamientos defensivos durante la exposición, aunque solo los olores de la piel generaban efectos duraderos. Del mismo modo, Masini y colaboradores (2005) demostraron que la piel de hurón (pero no las heces, orina o secreciones de glándula anal) produjo cambios comportamentales y fisiológicos (incrementos en los niveles de corticosterona y adrenocorticotropina e inducción de la expresión de ARNm de *c-fos*) en ratas de laboratorio, sugiriendo una vez

más que la información transportada por estas señales de olor genera reacciones diferentes en las presas.

Además del tipo de olor del predador, la intensidad de la señal encontrada por la presa es también un factor importante que podría modificar la aparición y desarrollo de comportamientos antipredatorios. Las especies presa suelen ser capaces de evaluar las diferentes intensidades de una amenaza y responder con flexibilidad a la misma (Hegab *et al.* 2015). Sin embargo, algunos estudios indican que los roedores responden de manera diferencial a diferentes cantidades de señales de los predadores. Wallace y Rosen (2000) encontraron que en ratas expuestas a cantidades crecientes de TMT, 300 y 600 nmol provocaron mayores niveles de “congelamiento” que 1, 10 y 100 nmol de señal. Utilizando olor de la piel del predador, Takahashi *et al.* (2005) demostraron que las ratas expuestas a telas con olor de gato de tamaños 3X y 10X exhibían más respuestas de “congelamiento” y tenían menos contactos con la fuente de olor que las ratas no expuestas al olor del predador. También encontraron que la tela 10X provocó más “congelamiento” y un menor número de contactos que la tela 1X. Estos estudios apoyan la idea que la intensidad del olor de los predadores es un factor importante que subyace al nivel de expresión de los comportamientos defensivos, indicando que la exposición no provoca una respuesta de magnitud similar a diferentes intensidades de olor (Takahashi *et al.* 2005).

Por último, luego de la exposición repetida a los predadores y sus olores pueden surgir dos respuestas fisiológicas y comportamentales distintas: habituación o sensibilización (Takahashi *et al.* 2005, Hegab *et al.* 2015). En el campo de la neurobiología del estrés, el término "habituación" se refiere a la reducción de las respuestas fisiológicas provocadas por una exposición repetida a un estresor homotípico (mismo) en comparación con las respuestas provocadas por la exposición aguda a ese estímulo (Grissom y Bhatnagar 2009). Este proceso es importante en un contexto de riesgo predatorio porque ayuda a los organismos presa a filtrar información biológicamente menos relevante y dedicar más atención y destinar energía hacia estímulos más relevantes (Wilson 2009). Por otro lado, la sensibilización se caracteriza por un aumento de la capacidad de respuesta al estímulo repetido y, a menudo a otros estímulos (Hegab *et al.* 2015). Los estudios que involucran exposiciones repetidas a los olores de los predadores han generado resultados mixtos (Zangrossi y File 1994,

Dielenberg y McGregor 1999), situación que puede estar relacionada con las intensidades de señal utilizadas (Takahashi *et al.* 2005).

Como fue descrito en el Capítulo 1, la exposición de los tuco-tucos a los olores de los predadores (de orina o piel) generó un estado de ansiedad y cambios comportamentales asociados con la disminución de la actividad locomotora y la aparición de conductas de evitación. Frente a riesgo predatorio, se esperan respuestas comportamentales que pueden conducir a un aumento en el tiempo de vigilancia, destinando menos tiempo para forrajear en superficie y provocando un impacto negativo en la condición corporal, que finalmente puede traducirse en costos sobre la reproducción o la supervivencia. Además de estas variaciones comportamentales, se encontró que los machos y las hembras de *C. talarum* respondieron de manera similar a ambas fuentes de olor (Capítulo 1), desafiando la opinión general de que los olores derivados de la piel o el pelaje inducen respuestas antipredatorias más fuertes que las originadas por heces debido a su mayor valor predictivo respecto de la inminencia de un posible ataque predatorio (Kavaliers y Choleris 2001, Staples 2010, Hegab *et al.* 2015). Sin embargo, como se explicó anteriormente, este resultado interesante podría ser en parte un resultado de las intensidades de olor y la frecuencia de exposición utilizadas en el experimento. Por lo tanto, el objetivo general de este capítulo fue evaluar la respuesta comportamental y fisiológica de individuos de *C. talarum* expuestos (1) a diferentes intensidades de orina y olor de la piel de un predador (gato) presentados en una única exposición y (2) a la repetición de la exposición al olor de piel, evaluando así la generación y extinción de las respuestas asociadas.

Se predice que una intensidad mayor de olores de un predador generará en individuos de *C. talarum*, niveles más elevados de ansiedad, en forma de disminución de la actividad locomotora y exploratoria y aparición de comportamientos defensivos, los cuales estarán acompañados de variaciones en los parámetros fisiológicos relacionados con el estrés, como niveles de glucosa plasmática, cortisol y relación de neutrófilos: linfocitos (N/L) más altos. Este efecto será mayor con la presentación del olor de la piel que con la exposición a orina del predador debido a la inminencia de un ataque potencial. Además, los tuco-tucos mostrarán habituación comportamental a una presentación repetida del olor derivado de la piel del predador.

MATERIALES Y MÉTODOS

Captura y mantenimiento de los animales

Se capturaron tuco-tucos adultos, sexualmente maduros, de ambos sexos (53 machos -peso promedio 160 g- y 64 hembras -peso promedio 117 g-) durante la temporada reproductiva (junio-febrero) y no reproductiva (marzo-mayo) de los años 2014 y 2015 en Mar de Cobo (37°460'S, 57°260'W, provincia de Buenos Aires, Argentina) utilizando trampas de captura viva. Para el experimento de intensidad se utilizaron 94 tuco-tucos (43 machos y 51 hembras), de los cuales 70 fueron capturados en 2014 y 24 en 2015. Todos los individuos del experimento de habituación (n = 23, 12 machos y 11 hembras) fueron capturados en 2015. Las trampas se revisaron cada 15 a 20 minutos hasta la captura del animal. Las hembras preñadas o amamantando fueron descartadas para los experimentos y se regresaron inmediatamente a sus cuevas. Los machos adultos fueron utilizados sin distinción debido a que, después de alcanzar la madurez reproductiva, no experimentan regresión de sus testículos y contienen espermatozoides en su epidídimo durante todo el año. Luego, los animales fueron llevados al laboratorio, alojados y alimentados de la manera indicada en el Capítulo 1. Después de 7 días de aclimatación al bioterio, los animales fueron asignados aleatoriamente a los diferentes experimentos. Una vez terminados los experimentos, los animales fueron regresados al sitio de captura.

Exposición a las señales predatorias

Los animales fueron expuestos a señales olfativas indicativas de la presencia de un predador: virutas de madera impregnadas con orina de un gato macho adulto (obtenidas 24 hs antes de los experimentos) o una tela impregnada con olor de la piel de gato (también obtenido 24 hs antes de los experimentos y después de permitir que un gato utilice el paño para descansar en el por un período de 7 días). Las muestras se congelaron a -20°C en bolsas de plástico selladas hasta su uso (un tiempo máximo de 24 hs). El día de los experimentos, las bolsas se colocaron a temperatura ambiente para descongelar las muestras de olor.

Para comparar los efectos de la exposición de los tuco-tucos a los olores de un predador, los individuos del grupo control fueron expuestos a tela sin olor o viruta de madera limpia.

Procedimiento

Efectos de la intensidad del olor de los predadores en los comportamientos defensivos

Para analizar el efecto de diferentes intensidades de una señal del predador (olor de orina o de piel) sobre la respuesta comportamental y fisiológica de *C. talarum*, los animales fueron asignados aleatoriamente a diferentes tratamientos que diferían en el tipo (olor de orina-G2- y olor de la piel-G3-) e intensidad (1X: intensidad media similar a la usada en Capítulo 1, 1/3X: una tercera parte de la intensidad media y 3X: tres veces la intensidad media) de la señal predatoria utilizada: **G1**: sin olor (grupo control, n = 18) y tratamientos según se explica en la figura 1:

Señal predatoria Intensidad	Orina			Piel/Pelaje		
	Nomenclatura	N	Cantidad (g)	Nomenclatura	n	Cantidad (cm)
Baja	G2-1/3X	11	3.33	G3-1/3X	10	2x2
Media	G2-1X	16	10	G3-1X	15	6x6
Alta	G2-3X	12	30	G3-3X	12	18x18

Fig. 1: exposición a las distintas intensidades (1/3X, 1X y 3X) del olor de orina (G2) o piel/pelaje (G3).

Antes del inicio de los experimentos, los animales se trasladaron a cajas individuales vacías y se expusieron a las fuentes de olor de un predador o muestras control durante un período de 60 minutos (Fig. 2a). Las diferentes muestras de olor se presentaron a los individuos en soportes de plástico cubiertos con una malla metálica, disminuyendo así la incidencia de señales visuales asociadas con las cantidades de señal utilizadas (cantidad de viruta impregnada con orina o tamaño de la tela). Posteriormente, se evaluó el desempeño de los animales durante 5 min en el laberinto en cruz elevado.

Efectos de la repetición de la exposición al olor de los predadores en los comportamientos defensivos

Para evaluar el efecto de las exposiciones repetidas a una señal indicativa de la presencia de un predador, se expusieron los tuco-tucos ($n = 12$) al olor de la piel de un gato presentado en un soporte de plástico durante 60 min por 5 días consecutivos (Tratamiento 5 días = T5: 6 cm x 6 cm, Fig. 2b). Un grupo control (Control 5 días = C5, $n = 11$) siguió el mismo protocolo de exposición, pero con tela sin olor. Después del último evento de exposición, se evaluó el desempeño de cada individuo en el laberinto elevado para analizar si el contacto repetido con una señal predatoria conduce a la variación o incluso a la extinción de la respuesta comportamental. Los resultados obtenidos de este experimento también se compararon con los obtenidos de los grupos expuestos una única vez al olor de la piel de gato (control de 1 exposición a la señal (G1): C1 y tratamiento con individuos expuestos una vez a la intensidad media de la señal: G3-1X: T1, ver resultados).

Todos los procedimientos experimentales se realizaron siempre durante el final de la mañana. La respuesta comportamental de cada tuco-tuco también se registró en el laberinto en cruz elevado.

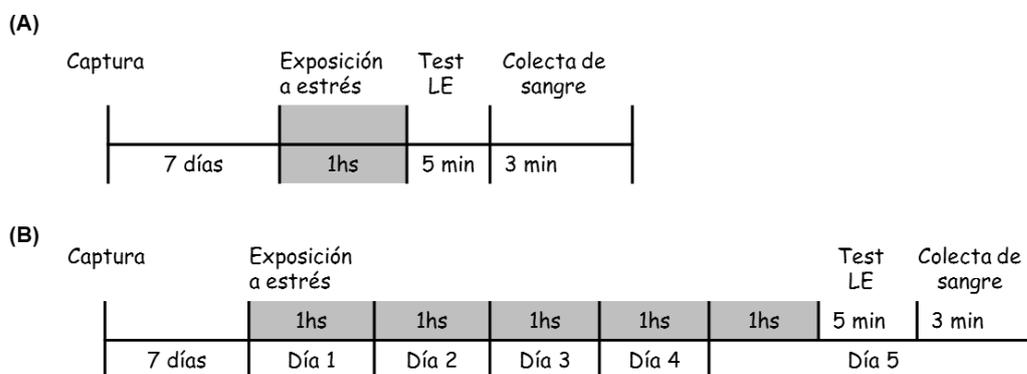


Fig. 2: Cronograma de exposición y evaluación para los tratamientos de (a) intensidad y (b) habituación.

Laberinto en cruz elevado

Después de la exposición a los olores de predadores, los animales fueron llevados al laberinto y colocados en la plataforma central para comenzar el

experimento. El comportamiento de los tuco-tucos se registró con una cámara de video durante 5 minutos y se evaluaron las variables comportamentales previamente descritas (Capítulo 1): distancia total recorrida (cm), número total de entradas a los brazos, número de entradas a los brazos transparentes, tiempo de permanencia en los brazos transparentes (% de tiempo total), y el tiempo rascando las paredes en brazos transparentes (% de tiempo total) en el laberinto.

Medidas de estrés fisiológico

Al finalizar cada ensayo de los experimentos de intensidad o de habituación, se tomó una muestra de sangre del seno retro-orbital de cada animal. Luego, siguiendo la metodología explicada en el Capítulo 1, se determinaron los siguientes parámetros fisiológicos a partir de muestras de sangre: hematocrito, niveles de glucosa en sangre, niveles de cortisol plasmático y relación neutrófilos/linfocitos.

Análisis estadísticos

Se realizaron pruebas de ANOVA de una vía para evaluar si los diferentes parámetros de estrés comportamental y fisiológico diferían entre tuco-tucos expuestos o no a los olores de un predador (orina y tela impregnada con olor de la piel de gato). Cuando se observaron efectos estadísticamente significativos de los factores, se realizaron pruebas de *Tukey* para identificar diferencias entre los grupos.

RESULTADOS

Efectos de la intensidad del olor de predador en los comportamientos defensivos y los parámetros fisiológicos

Olor de orina de gato

Los individuos expuestos a las tres intensidades diferentes de señal mostraron una disminución similar en la distancia recorrida (Fig. 3A), el número de entradas a los brazos (Fig. 3B) y el número de entradas a los brazos transparentes (Fig. 3C), aunque el

efecto global del tratamiento fue estadísticamente similar o marginalmente significativo en las diferentes concentraciones de orina (ANOVA, $n = 58$, distancia: $gl = 3$, $F = 2.21$, $p = 0.09$, entradas a brazos: $gl = 3$, $F = 2.53$, $p = 0.06$, entradas a los brazos transparentes: $gl = 3$, $F = 2.75$, $p = 0.051$, respectivamente). Se observó un claro efecto del tratamiento en el tiempo de permanencia en los brazos transparentes (ANOVA, $n = 58$, $gl = 3$, $F = 3.23$, $p = 0.029$). Los individuos expuestos a concentraciones de 1/3X, 1X y 3X mostraron disminuciones significativas o marginalmente significativas en el tiempo de permanencia en los brazos transparentes (ANOVA, $n = 58$, $gl = 3$, control vs G2-1X: $p = 0.014$, control vs G2-3X: $P = 0.086$, control vs G2-1/3X: $p = 0.05$, Fig. 3D), aunque la respuesta fue similar entre las concentraciones. El tiempo rascando paredes en los brazos transparentes no difirió entre los grupos (Kruskal-Wallis, $n = 58$, $gl = 3$, $H = 4.65$, $p = 0.19$, Fig. 3E).

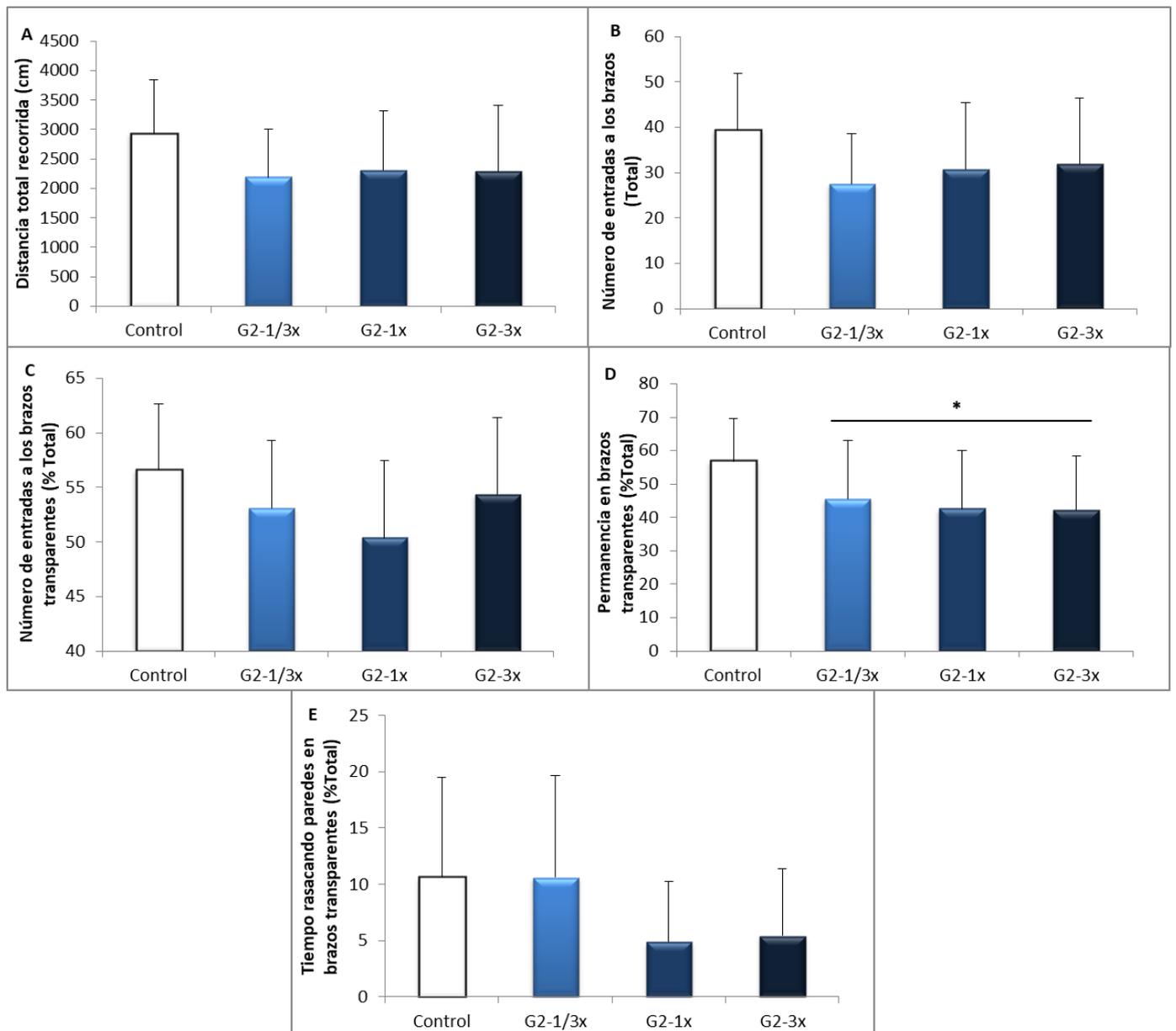


Fig. 3: Distancia total recorrida (cm; Media \pm DE) (A); número total de entradas en los brazos (Media \pm DE) (B); número de entradas (Media \pm DE) (C) y tiempo de permanencia en brazos transparentes (Media \pm DE) (D); y el tiempo rascando las paredes en los brazos transparentes (Media \pm DE) (E) de individuos expuestos a diferentes intensidades (1/3X, 1X y 3X) de orina (G2) en el laberinto elevado.

Medidas de estrés fisiológico

Los valores de hematocrito no difirieron significativamente entre los grupos control y los grupos expuestos a orina de gato (ANOVA, $n = 58$, $gl = 3$, $F = 0.463$, $p = 0.71$). De manera similar, la exposición a las diferentes concentraciones de orina de gato no afectó la relación N/L, los niveles de glucosa en sangre o los niveles de cortisol

plasmático (N/L: Kruskal-Wallis, n = 58, gl = 3, p = 0.118, glucosa: ANOVA, n = 58, gl = 3, F = 2.375, p = 0.083, cortisol: Kruskal-Wallis, n = 58, gl = 3, p = 0.161; Tabla 1).

Tabla 1: Hematocrito (Media \pm DE), niveles de glucosa en sangre (mg/ml, Media \pm DE), relación neutrófilos / linfocitos (Media \pm DE) y niveles de cortisol plasmático (ng/ml; Media \pm DE) en individuos de *Ctenomys talarum* de los grupos control y expuestos a diferentes intensidades (1/3X, 1X y 3X) de olor de orina de gato luego de la prueba de laberinto elevado.

	Control	G2-1/3X	G2-1X	G2-3X
Hematocrito	45.33 \pm 2.19	44.5 \pm 2.71	45.43 \pm 2.33	45.58 \pm 2.87
Niveles de glucosa en sangre (mg/ml)	88.87 \pm 26.27	84 \pm 31.17	84 \pm 33.08	64 \pm 24.05
Relación neutrófilos/linfocitos	1.46 \pm 1	0.8 \pm 0.67	1.53 \pm 1.67	1.36 \pm 0.97
Niveles de cortisol plasmático (ng/ml)	23.34 \pm 25.58	21.57 \pm 13.17	20.31 \pm 33.27	37.78 \pm 55.29

Olor de piel de gato

En relación a la exposición a diferentes intensidades de olor de la piel del predador, se observó un efecto global del tratamiento en todos los parámetros analizados (ANOVA, n = 57, distancia: gl = 3, F = 6.32, p < 0.001, tiempo en brazos transparentes: gl = 3, F = 7.63, p = 0.01, entradas a los brazos transparentes: gl = 3, F = 3.67, p = 0.018, tiempo rascando en brazos transparentes: gl = 3, H = 20.97, p < 0.01). Sin embargo, la respuesta comportamental fue diferente según la intensidad de la fuente de olor. Mientras que los animales sometidos a la menor intensidad de la señal recorrieron distancias similares a los controles (ANOVA, n = 57, gl = 3, G3-1/3X vs. control: p = 0.89), los individuos expuestos a intensidades mayores recorrieron distancias menores (ANOVA, n = 57, gl = 3, G3-1X vs. control: p = 0.02, G3-3X vs. control: p = 0.03, Fig. 4A). Una situación similar se observó en el número de entradas a los brazos (ANOVA, n = 57, gl = 3, G3-1/3X vs. control: p = 0.99, G3-1X vs. control: p = 0.05, G3-3X vs. control: p = 0.05, Fig. 4B) y en el tiempo de permanencia en los brazos transparentes (ANOVA, n = 57, gl = 3, G3-1/3X vs. control: p = 1, G3-1X vs. control: p = 0.005, G3-3X vs. control: p = 0.005; Fig. 4C). En cuanto al número de entradas a los brazos transparentes, los individuos expuestos a las intensidades menores y mayores se comportaron de manera similar que el grupo control (ANOVA, n = 57, gl = 3, G3-1/3X vs. control: G3-3X vs. control: p = 0.4), mientras que sólo los individuos del grupo 1X

entraron en menor medida a los brazos transparentes que los controles (ANOVA, $n = 57$, $gl = 3$, G3-1X vs. control: $p = 0.01$, Fig. 4D). Finalmente, el tiempo rascando las paredes de los brazos transparentes fue similar entre los individuos expuestos a la concentración menor y el grupo control (Kruskal-Wallis, $n = 57$, $gl = 3$, G3-1/3X vs. control: $p > 0.05$), aunque mayor que aquellos expuestos a 1X y 3X (Kruskal-Wallis, $n = 57$, $gl = 3$, G3-1X vs. control: $p < 0.05$, G3-3X vs. control: $p < 0.05$, Fig. 4E).

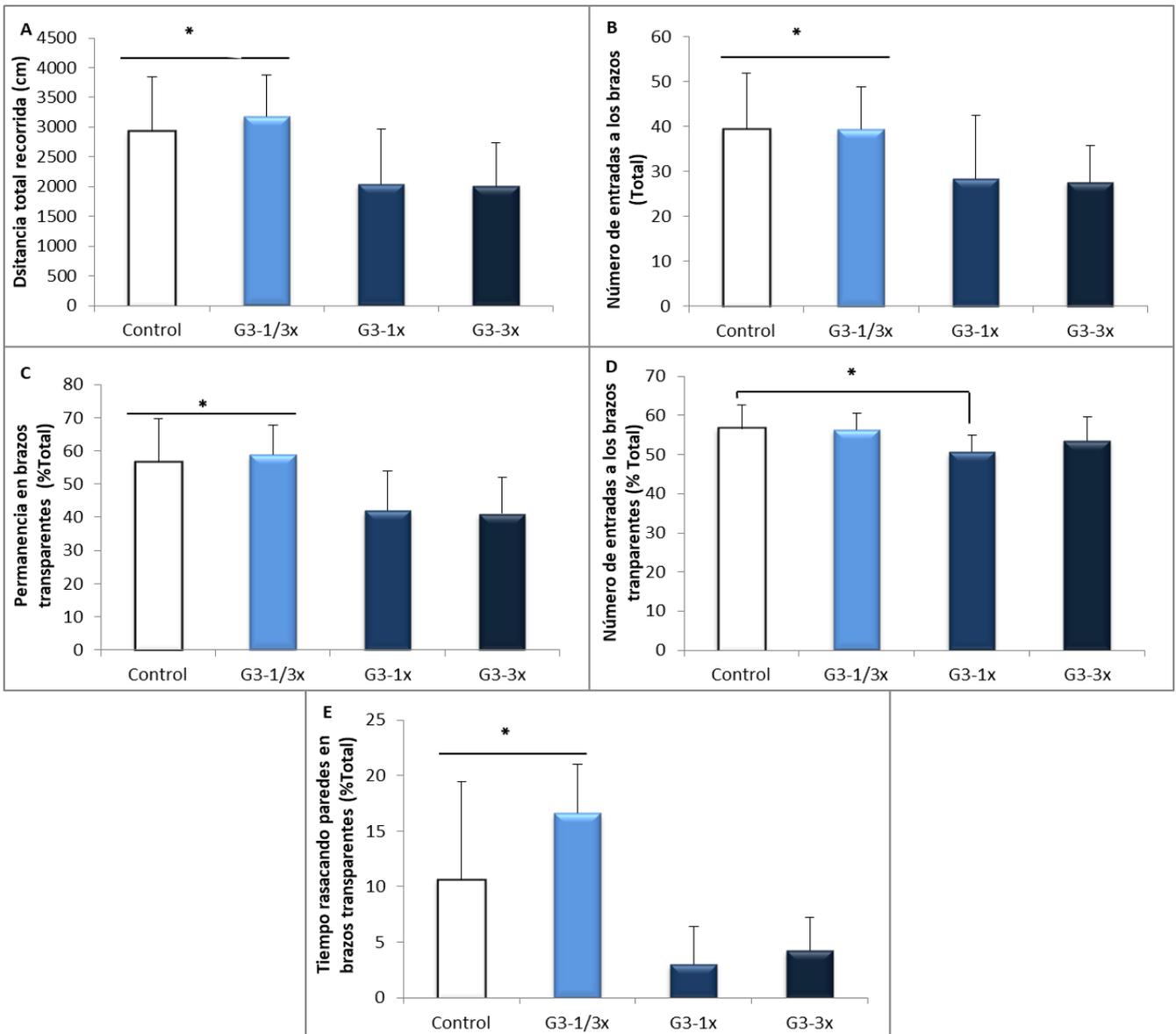


Fig. 4: Distancia total recorrida (cm; Media \pm DE) (A); número total de entradas en los brazos (Media \pm DE) (B); tiempo de permanencia en brazos transparentes (Media \pm DE) (C); número de entradas (Media \pm DE) (D); y el tiempo rascando las paredes en los brazos transparentes (Media \pm DE)(E) de individuos expuestos a diferentes intensidades (1/3X, 1X y 3X) de olor de la piel (G3) en el laberinto elevado.

Medidas de estrés fisiológico

Los valores de hematocrito no difirieron significativamente entre el grupo de control y los grupos expuestos al olor de piel de gato (ANOVA, $n = 57$, $gl = 3$, $F = 1.61$, $p = 0.198$, tabla 2). Se encontró una disminución en los niveles de glucosa en sangre en el grupo expuesto a la menor intensidad de olor en comparación con el observado en el grupo de control (prueba de *Tukey*, $p = 0.034$; tabla 2). Los valores de la relación N/L y cortisol no se vieron afectados por la exposición al olor de piel de gato (Kruskal-Wallis, $n = 57$, $p = 0.217$; ANOVA, $n = 57$, $F = 1.456$, $p = 0.238$, respectivamente).

Tabla 2: Hematocrito (Media \pm DE), niveles de glucosa en sangre (mg/ml, Media \pm DE), relación neutrófilos/linfocitos (Media \pm DE) y niveles de cortisol plasmático (ng/ml; Media \pm DE) en individuos de *Ctenomys talarum* de los grupos control y expuestos a diferentes intensidades (1/3X, 1X y 3X) de olor de piel de gato luego de la prueba de laberinto elevado.

	Control	G3-1/3X	G3-1X	G3-3X
Hematocrito	45.33 \pm 2.19	45.27 \pm 4.12	47 \pm 2.41	44.25 \pm 4.57
Niveles de glucosa en sangre (mg/ml)	88.87 \pm 26.27	64.44 \pm 20.39	82 \pm 29.39	90.75 \pm 20.43
Relación neutrófilos/linfocitos	1.46 \pm 1	0.93 \pm 0.99	2.29 \pm 2.43	1.09 \pm 0.98
Niveles de cortisol plasmático (ng/ml)	23.34 \pm 25.58	27.57 \pm 25.43	12.13 \pm 6.9	26.87 \pm 26.42

Efectos de la repetición de la exposición al olor de los predadores sobre los comportamientos defensivos y los parámetros fisiológicos

Mientras que los individuos expuestos sólo una vez al olor de piel de gato se desplazaron menos que su control respectivo (test de *Tukey*, T1 vs. C1: $p = 0.03$, Fig. 5A), los tuco-tucos expuestos repetidamente durante 5 días a la señal del predador recorrieron distancias similares al grupo control respectivo (prueba de *Tukey*, T5 vs. C5: $p = 0.718$, Fig. 5A). Esta respuesta comportamental también se observó en el número de entradas a los brazos (test de *Tukey*, T1 vs. C1: $p = 0.05$, T5 vs. C5: $p = 0.80$, Fig. 5B), número de entradas a los brazos transparentes (test de *Dunn*, T1 vs. C1: $p < 0.05$, T5 vs. C5: $p > 0.05$, Fig. 5C), tiempo de permanencia en brazos transparentes (test de *Tukey*, T1 vs. C1: $p = 0.01$, T5 vs. C5: $p = 0.98$; Fig. 5D), y el tiempo rascando en los brazos transparentes (test de *Dunn*, T1 vs C1: $p < 0.05$, T5 vs. C5: $p > 0.05$, Fig. 5E). Además, los

tuco-tucos expuestos durante 5 días al olor de piel de gato recorrieron distancias mayores, mostraron más entradas a los brazos y permanecieron y rascaron más tiempo las paredes en los brazos transparentes que los individuos expuestos solo una vez a la señal del predador (distancia recorrida: test de *Tukey*, T1 vs. T5: $p < 0.001$, entradas a los brazos: test de *Tukey*, T1 vs. T5: $p = 0.004$, tiempo en brazos transparentes: test de *Tukey*, T1 vs. T5: $p = 0.012$, tiempo rascando en brazos transparentes: test de *Dunn*: T1 vs. T5: $p < 0.05$). Sólo en el número de entradas a los brazos transparentes, los individuos expuestos sólo una vez o durante 5 días al olor de piel de gato no mostraron diferencias estadísticamente significativas (test de *Dunn*: T1 vs. T5: $p > 0.05$).

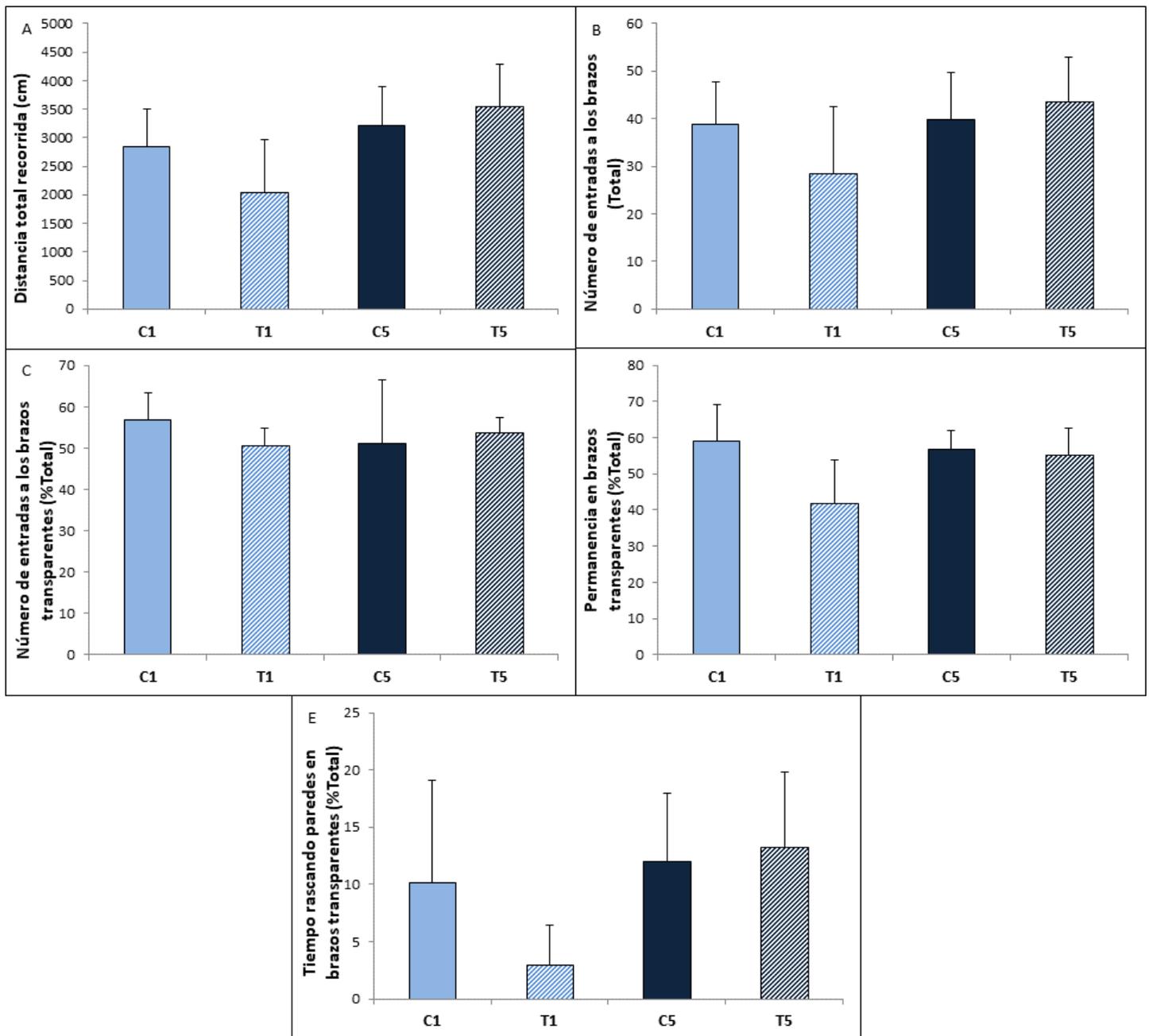


Fig. 5: distancia total recorrida (cm; Media \pm DE) (A), número total de entradas a los brazos (Media \pm DE) (B), número de entradas a los brazos transparentes (Media \pm DE) (C), tiempo transcurrido en los brazos transparentes (Media \pm DE) (D), y tiempo rascando paredes en los brazos transparentes (Media \pm DE) (E) de los grupos control (C1) y (C5) y los individuos expuestos al olor de la piel/pelaje una vez (T1) o cinco veces (T5) en el laberinto en cruz elevado.

Medidas de estrés fisiológico

No se observó ningún efecto del procedimiento de exposición en el hematocrito (Kruskal-Wallis, $n = 53$, $gl = 3$, $p = 0.248$, Tabla 3), los niveles de glucosa en sangre

(Kruskal-Wallis, n = 53, gl = 3, p = 0.384), la relación N/L (Kruskal-Wallis, n = 53, p = 0.860, o los niveles de cortisol (Kruskal-Wallis, n = 53, gl = 3, p = 0.654, Tabla 3)..

Tabla 3: Hematocrito (Media \pm DE), niveles de glucosa en sangre (mg/ml, Media \pm DE), relación neutrófilos/linfocitos (Media \pm DE) y niveles de cortisol plasmático (ng/ml; Media \pm DE) en individuos de *Ctenomys talarum* de los grupos control (C1 y C5) y expuestos a olor de la piel/pelaje de gato (T1 y T5) luego de la prueba de laberinto en cruz elevado.

	C1	T1	C5	T5
Hematocrito	45.33 \pm 2.19	47 \pm 4.12	43.5 \pm 5.76	44.17 \pm 3.41
Niveles de glucosa en sangre (mg/ml)	88.87 \pm 26.27	82 \pm 23.32	111 \pm 67.54	89.92 \pm 72.87
Relación neutrófilos/linfocitos	1.46 \pm 1	2.29 \pm 2.43	1.58 \pm 1.06	1.63 \pm 0.78
Niveles de cortisol plasmático (ng/ml)	23.34 \pm 25.58	12.13 \pm 6.9	22.069 \pm 28.15	19.99 \pm 24.19

DISCUSIÓN

Las interacciones predador-presa se reconocen como una fuerza evolutiva importante, mediando tanto el comportamiento de los predadores como de las presas (Boeing 2010). Enfrentarse con predadores es un desafío altamente probable para un individuo a lo largo de su vida, lo que puede conllevar a efectos extremos como la muerte de ese organismo (Hegab y Wei 2014). Por lo tanto, evitar un encuentro con un predador es la manera más eficaz para garantizar la supervivencia y aumentar el fitness. Para lograr esta tarea, la identificación adecuada de los predadores por parte de las presas es vital, y, en algunas especies, la selección natural ha modelado la evolución de diferentes modalidades sensoriales que permiten reconocer adecuadamente a los predadores y generar respuestas comportamentales y fisiológicas de manera de reducir y evitar la presión de predación (Coss 2010). Sin embargo, no todos los tipos de olores de los predadores inducen comportamientos de evitación significativos y equivalentes en las presas. Como fue anteriormente señalado, se considera que los olores derivados de la piel son los más relevantes para inducir ansiedad, mientras que los olores asociados a la orina o las heces pueden ser aversivos pero no ansiogénicos (Apfelbach *et al.* 2005, Muñoz-Abellan *et al.* 2010). Sin embargo, pocos estudios han comparado simultáneamente el efecto de ambas fuentes de olor sobre la generación de

comportamientos defensivos (Blanchard *et al.* 2003b, Masini *et al.* 2005), dejando aún sin resolver cuál es el tipo de olor más relevante en la inducción de cambios en la respuesta de ansiedad.

Cuando se comparan los efectos comportamentales más notorios provocados por los olores de un predador en *C. talarum*, nuestro estudio apoya la hipótesis que los olores de la piel son más ansiogénicos que la orina. Los olores de la piel provocaron cambios significativos en la distancia recorrida, el número de entradas a los brazos y el tiempo de permanencia en brazos transparentes en el laberinto elevado, mientras que la orina del gato sólo causó cambios leves en los parámetros comportamentales. Este resultado es acorde con la hipótesis de proximidad que sugiere que los olores de la piel del predador pueden indicar un nivel mayor de inminencia predatoria que las heces o la orina, generando así incrementos más fuertes en los comportamientos asociados a la ansiedad (Blanchard *et al.* 2003b, Apfelbach *et al.* 2005, Takahashi *et al.* 2005). Además, y coincidiendo con la visión general que considera que las habilidades de detección de los predadores pueden estar estrechamente correlacionadas con otras habilidades quimiosensoriales (Kats y Dill 1998), los individuos de *C. talarum* (que se basan en señales químicas para el reconocimiento individual, sexual y estado reproductivo, y la detección de fuentes de alimento; Zenuto *et al.* 2004, Schleich y Zenuto 2007, Fanjul y Zenuto 2008, Zenuto 2010) son también capaces de detectar y discriminar los olores de los predadores de acuerdo a su origen.

Para responder adaptativamente, es importante que las presas puedan evaluar con precisión el riesgo de predación asociado con la intensidad de las señales percibidas. Además, si los organismos son capaces de reconocer y diferenciar gradientes químicos presentes en el campo se puede obtener una mejor resolución espacial de la ubicación de los predadores (Kats y Dill 1998). Por lo tanto, la intensidad del olor podría ser un factor clave que permitiría a las especies presa determinar la respuesta comportamental "óptima" (Hegab *et al.* 2015). Habiendo encontrado evidencia de que los tuco-tucos utilizan los olores de la piel y la orina como indicadores de la posible actividad de los predadores, se podría esperar que los olores de los predadores más concentrados pudieran interpretarse más riesgosas (Powell y Banks 2004), provocando, en consecuencia, niveles mayores de ansiedad. Aunque los individuos de *C. talarum* expuestos a tres intensidades diferentes de olor de orina

mostraron una tendencia a disminuir la distancia recorrida, el número de entradas en los brazos, y las entradas a los brazos transparentes, este efecto fue similar en condiciones de diferente concentración de olor del predador. Por otra parte, la exposición a diversas intensidades de olor de piel del predador provocó variaciones en la respuesta comportamental de los tuco-tucos. Mientras que los animales del grupo expuesto a la menor intensidad de señal se comportaron de forma similar al grupo de control, los expuestos a las intensidades de olor de piel más altas mostraron claros estados de ansiedad, así como disminución de la actividad locomotora y comportamientos de evitación. Resulta interesante destacar que no se observaron diferencias entre los individuos que se enfrentaron con intensidades de olores de piel 1X y 3X. Aunque Takahashi y colaboradores (2005) consideraron que los efectos comportamentales y fisiológicos dependen de la magnitud del olor del predador presentado al animal, sus resultados fueron similares a los obtenidos en este trabajo, con ratas expuestas a tamaños de telas 3X y 10X con olores de gato exhibiendo una mayor respuesta de “congelamiento” y un menor número de contactos con la fuente de olor que las ratas no expuestas al olor del predador, sin diferencias estadísticas entre los grupos 3X y 10X en estos parámetros comportamentales. Por lo tanto, y de acuerdo con estos resultados, la intensidad del olor del predador natural presentado a los tuco-tucos tiene un rol en la aparición de comportamientos defensivos, aunque no se observó una relación dependiente de la concentración entre el olor de los predadores y los niveles de ansiedad, al menos en las intensidades del estímulo utilizadas en este estudio. Considerando que la selección para la detección química de predadores por parte presas puede depender no sólo de las características de historia vida de la presa, sino también de las diversas características del predador (por ejemplo, su movilidad y densidad), sería interesante investigar si las habilidades para detectar gradientes de señales de predadores difieren en poblaciones de tuco-tucos bajo diversas presiones de predación.

Varios estudios realizados en roedores han demostrado que los efectos comportamentales de la exposición a los olores de los predadores suelen ir acompañados de una respuesta fisiológica (File *et al.* 1993, Figueiredo *et al.* 2003). El eje del estrés, que desempeña un papel central en las adaptaciones evolutivas a presiones ecológicas particulares (Boonstra *et al.* 2007), constituye una vía importante

del sistema neuroendocrino que integra el cambio ambiental y mediante el cual se implementan las decisiones de la historia de vida (reproducción, crecimiento, alimentación) (Ricklefs y Wikelski 2002). En el presente experimento, los valores de hematocrito fueron similares entre los grupos tratados, lo que indica que la condición física de los tuco-tucos expuestos a diferentes intensidades y frecuencias de ambas señales de los predadores fue equivalente. En cuanto a la relación N/L, un parámetro que se incrementa en respuesta a la inmovilización o el estrés crónico causado por el cautiverio o la restricción alimentaria (Vera *et al.* 2011), no fue diferente entre los grupos control y los expuestos a las diferentes intensidades de ambas fuentes de olor. Así mismo, no se observó ningún efecto de la exposición a las señales del predador sobre los niveles de glucosa en sangre, con la excepción del grupo expuesto a la menor intensidad de olor de piel. Aparte de esta diferencia, no se pudo identificar ningún patrón particular en la respuesta de glucosa en sangre. Por último, no encontramos diferencias en los niveles de cortisol plasmático entre los animales expuestos a las diferentes intensidades de olor de gato. Aunque la detección de la respuesta asociada con el aumento de los niveles de glucocorticoides puede ser variable y dependiente de los métodos utilizados (Tidhar *et al.* 2007), la falta de variación en este y otros parámetros fisiológicos sugiere, en forma similar a lo observado en el capítulo anterior, una pobre asociación entre las respuestas fisiológicas y comportamentales a los olores de los predadores en *C. talarum*. La ausencia de un correlato endócrino de la respuesta comportamental de la presa también fue observada en otras especies de roedores (File *et al.* 1993, Perrot-Sinal *et al.* 1999). Por otro lado, la relación entre el eje HPA y la respuesta de ansiedad suele ser más evidente para la inmovilización, otro componente del estrés por predador. Por ejemplo, las ratas expuestas a inmovilización exhibieron comportamientos asociados a la ansiedad en el LE e incrementos en ACTH y corticosterona (Muñoz-Abellan *et al.* 2008). En general, esta ausencia de relación directa entre el estado endócrino y los resultados comportamentales en *C. talarum* requiere profundizar el análisis de las relaciones entre diferentes estresores y sus efectos fisiológicos en esta especie de roedor subterráneo (ver Capítulo 3).

Varios trabajos con roedores indican que la exposición repetida a los olores de los predadores puede resultar en la sensibilización o habituación en respuesta a estas señales (Endres y Fendt 2007, Hegab *et al.* 2015). Aunque existen pocos ejemplos claros

de sensibilización (Staples 2010), un estudio reciente en ratas demostró que la exposición repetida al olor del hurón conduce a una sensibilización creciente de la respuesta neural (Weinberg *et al.* 2009). Con mayor frecuencia se reportan estudios que fallaron en encontrar respuestas de habituación a exposiciones repetidas. Por ejemplo, File y colaboradores (1993) encontraron que después de cinco exposiciones al olor de gato, las ratas continuaron evitando el paño con olor, aunque los niveles de corticosterona dejaron de aumentar. Similarmente, Wallace y Rosen (2000) mostraron que las ratas expuestas repetidamente durante un período de 5 días a TMT no mostraron habituación en la respuesta de congelamiento, aunque este resultado debe tomarse con cautela debido a la falta de diferencia con el control sin olor. Por otro lado, varios trabajos han demostrado que los animales tienen la capacidad de habituarse a estímulos estresantes repetidos (Grissom y Bhatnagar 2009). Por ejemplo, File y colaboradores (1993) encontraron que las ratas permanecían la mayor parte de su tiempo ocultándose por la exposición al olor del gato, pero esta respuesta se habituaba gradualmente con las exposiciones diarias repetidas. Staples y colaboradores (2009) encontraron que las ratas Wistar Albinas expuestas al olor de gato mostraron inicialmente fuertes respuestas defensivas, aunque estas respuestas se habituaron hacia la exposición final. Takahashi *et al.* (2005) también demostraron que las ratas exhibieron habituación al olor de gato, siendo esta respuesta comportamental dependiente de la concentración de olor de piel utilizada.

En el presente experimento, se encontró que mientras que los individuos expuestos durante 1 día al olor de piel de gato mostraron un estado de ansiedad evidente, los expuestos repetidamente durante 5 días consecutivos no difirieron del grupo control en su respuesta comportamental, indicando una clara habituación a la señal del predador. Como se explicó anteriormente, este proceso permite a los animales filtrar el ingreso de información biológicamente menos relevante y, a su vez, dedicar más atención y procesar energía hacia estímulos más relevantes o dinámicos (Leussis y Bolívar 2006). En el caso particular de *C. talarum*, los individuos de esta especie suelen encontrarse con señales predatorias mientras se alimentan en la superficie. Al reducir el tiempo dedicado a evaluar el riesgo potencial de la presencia de un predador después de haber presentado el mismo olor repetidamente, los tuco-tucos pueden invertir más tiempo y energía en su esfuerzo de forrajeo, obteniendo una

importante recompensa metabólica por la disminución de la respuesta comportamental antipredatoria. En este punto, debe tenerse en cuenta que es probable que las diferentes tasas de habituación estén influenciadas por la intensidad de la señal predatoria y el valor adaptativo de continuar cada comportamiento (Staples 2010).

También se esperan variaciones en la respuesta endócrina concomitante con el proceso de habituación en la respuesta comportamental (Apfelbach *et al.* 2005). En particular, la magnitud de la activación del eje HPA desencadenada en respuesta a la presencia de señales indicativas de la presencia de un predador puede disminuir con la exposición repetida a este estímulo, aunque esta habituación fisiológica puede ser también dependiente del grado de estrés o previsibilidad (Smith *et al.* 2013). En nuestros experimentos de habituación y similares a los resultados anteriores obtenidos respecto de la respuesta endócrina, no se encontraron diferencias en los parámetros fisiológicos medidos entre los individuos control y los expuestos sólo una vez o durante 5 días al olor de la piel de un gato, incluso cuando se observó una clara respuesta de ansiedad en los tuco-tucos expuestos una vez a la señal de predación.

En resumen, los resultados del presente capítulo proporcionan una evidencia valiosa de que el tipo de olor de un predador, junto con la frecuencia de exposición, son determinantes importantes de la aparición, intensidad y disminución de los comportamientos defensivos en el roedor subterráneo *C. talarum*. En cuanto a la intensidad del olor, aunque se observó un nivel umbral que desencadenó el desarrollo de los comportamientos defensivos, no se encontraron asociaciones adicionales entre la intensidad de los olores de los predadores y la respuesta de las presas. En cuanto a la ausencia de asociación entre la respuesta comportamental y la fisiológica en *C. talarum*, y para lograr un mayor entendimiento en relación a la misma, resulta necesario implementar estudios adicionales que involucren diferentes factores causantes de ansiedad. Además, la utilización de activadores e inhibidores de diferentes niveles del eje HPA resultan, en este contexto, una herramienta que contribuirá esclarecer esta asociación, dado que permiten incrementar o disminuir los niveles de glucocorticoides sin la aplicación del factor de estrés, a la vez de verificar la respuesta comportamental de ansiedad desarrollada (Capítulo 3).



CAPÍTULO 3

Relación entre los niveles de glucocorticoides de origen endógeno y exógeno y la respuesta anti-predatoria.

CAPÍTULO 3: RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE GLUCOCORTICOIDES DE ORIGEN ENDÓGENO Y EXÓGENO Y LA RESPUESTA ANTI-PREDATORIA.

INTRODUCCIÓN

La resolución de situaciones de estrés provenientes de diferentes fuentes, físicas, sociales y/o psicológicas es una tarea cotidiana para la mayoría de los organismos. La consecuente pérdida de homeostasis resulta dependiente del contexto o la naturaleza del factor de estrés, así como de la magnitud de la respuesta desencadenada (Armario 2006). Los glucocorticoides (GCs: cortisol y/o corticosterona, dependiendo de la especie) participan de las respuestas comportamentales y fisiológicas que se generan frente a esas condiciones (Sapolsky *et al.* 2000, Crossin *et al.* 2016, Walker *et al.* 2017). En los vertebrados, los incrementos de estas hormonas esteroideas están mediados por la activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenales (HPA, para mamíferos y aves) o hipotálamo-pituitaria-interrenales (HPI en el caso de peces, anfibios y reptiles). Como se explicó previamente (ver *Introducción general*) esta respuesta permite a los organismos resolver con éxito situaciones estresantes o amenazantes, redireccionando recursos desde actividades temporalmente no esenciales (como la reproducción, la respuesta inmune, el crecimiento) hacia otras directamente implicadas en la supervivencia, lo cual se denomina respuesta adaptativa al estrés. Sin embargo, la activación crónica del eje de estrés y, por lo tanto, las concentraciones de GCs elevadas y sostenidas en el tiempo, pueden conllevar a efectos deletéreos para los mismos, afectando su fisiología, comportamiento y fitness (Sapolsky *et al.* 2000, Boonstra 2005, Breuner *et al.* 2008). Durante la respuesta a estrés, la función de los glucocorticoides esta mediada principalmente por dos tipos de receptores intracelulares, el receptor de tipo I (denominado también MR, receptor de mineralocorticoides), que presenta una mayor afinidad y regula los niveles basales, y por el receptor de tipo II (GR, receptor de glucocorticoides), cuya afinidad es menor y

regula los niveles inducidos por estrés (de Kloet *et al.* 2005, Sapolsky *et al.* 2000). Otras funciones muy importantes de los GCs, aunque menos consideradas, son sus acciones orexigénicas y mineralotrópicas (Vera *et al.* 2017).

La activación del eje HPA ocurre bajo una variedad de estresores ambientales y sociales, especialmente la exposición a situaciones novedosas e impredecibles o que conllevan a la pérdida de control frente a diferentes eventos (Sapolsky *et al.* 2000, Pride 2005, Creel 2005, Smith *et al.* 2013). La naturaleza del factor de estrés, su patrón temporal e implicancias en la supervivencia afectan la respuesta de estrés (Monclús *et al.* 2006, 2009). Particularmente, la hipótesis de estrés por predación propone que el encuentro directo con predadores o sus pistas alertan a las presas, desencadenando una respuesta fisiológica que incluye la secreción de catecolaminas y GCs (Boonstra *et al.* 1998). La acción del cortisol y/o la corticosterona se extienden por un breve tiempo, minutos a horas, desencadenando funciones que permiten evitar, contrarrestar o enfrentar el riesgo de predación (Sapolsky 2002). La evidencia a favor de esta proposición es numerosa, reportada tanto en el caso de la exposición puntual (Canoine *et al.* 2002, Narayan *et al.* 2013) como crónica (Clinchy *et al.* 2004, Monclús *et al.* 2005, 2009, Marin *et al.* 2007, Newman *et al.* 2013, Jones *et al.* 2016), y obtenida en organismos mantenidos en condición de cautiverio y también en poblaciones silvestres. Sin embargo, otros estudios no encuentran esta relación, ya sea en contexto crónico como agudo (e.g. Mateo 2007, Creel *et al.* 2009, Fonner *et al.* 2015). Si bien la activación del eje HPA incluye la movilización de energía requerida para la respuesta comportamental antipredatoria, la relación entre la respuesta fisiológica y comportamental es compleja en los vertebrados, encontrándose tanto evidencias que la apoyan (Cavigelli 1999, Cockren y Silverin 2002, Yin *et al.* 2017) como otras en las cuales no se detecta ninguna relación (Pride 2005, Fonner *et al.* 2015). Los roedores no escapan de este panorama, reportándose estudios en los cuales los animales exhibían una disociación o falta de acoplamiento entre estas dos respuestas luego de un evento estresante (e.g. Mateo 2007, Ylönen *et al.* 2006, Navarro-Castilla y Barja 2014).

Más allá del contacto físico y visual con los predadores, los olores se reconocen como pistas valiosas para la evaluación del riesgo predatorio por las presas, desencadenando comportamientos defensivos tanto en ratones de laboratorio como campo (Apfelbach *et al.* 2015, Hegab *et al.* 2015). El origen de estas señales químicas es

diverso, y pueden ser encontradas en la piel, secreciones glandulares, orina y, heces. Los compuestos químicos implicados son de naturaleza volátil y no volátil, lo cual implica que la detección de las mismas puede ocurrir a distancia y mediada entonces por olfacción o que requiere contacto, participando el órgano vomero nasal (OVN) (Fendt *et al.* 2005, Papes *et al.* 2010, Apfelbach *et al.* 2015, Hegab *et al.* 2015). El uso de productos metabólicos, especialmente la orina y las heces, es muy amplio en estudios de campo y cautiverio, reconociendo que diversos compuestos químicos sulfurados producto de la digestión proteica son responsables de sus efectos aversivos. La piel y el pelaje, de reconocidos efectos ansiogénicos (Capítulo 1 y 2 para el caso de *C. talarum*), no han sido tan profundamente estudiados en lo que respecta a sus compuestos activos y a los mecanismos involucrados para su detección.

Los estudios sobre la respuesta fisiológica y comportamental en roedores silvestres son mayormente correlacionales (Hik *et al.* 2001, Mateo 2007), donde varios factores, como los cambios estacionales en recursos o la competencia, también pueden influenciar. Entonces, se requieren estudios experimentales que involucren la evaluación simultánea del comportamiento antipredatorio y los glucocorticoides. Herramientas experimentales para poner a prueba la respuesta fisiológica incluyen, por un lado, el uso de inhibidores de la síntesis de GCs (e.g. Metopirona), o la extirpación quirúrgica de las glándulas adrenales (adrenalectomía), las cuales han sido eficientes en eliminar los efectos ansiogénicos de la inmovilización sobre los comportamientos de ansiedad en ratas (Calvo y Volosin 2001). En los últimos años se ha incrementado el interés en los estudios en los cuales se modifican experimentalmente los niveles de GCs a través de manipulaciones, tanto endógenas como exógenas, de estas hormonas. Estos trabajos permiten comprender aspectos fundamentales del funcionamiento de los organismos, colaborando a su vez en el entendimiento de la ecología del estrés en animales silvestres (Sopinka *et al.* 2015, Crossin *et al.* 2016).

Ctenomys talarum (tuco-tucos) constituye un modelo muy interesante para explorar la ecofisiología del eje HPA en mamíferos (Vera *et al.* 2011). En esta especie, Vera y colaboradores (2011) reportaron que el cortisol y la corticosterona se ven afectados de manera diferencial por estímulos ambientales, debido a que las dos hormonas muestran diferentes patrones de variación en el campo y en respuesta al cautiverio. Por otro lado, se observó que ambas hormonas no serían redundantes, ya

que presentan diferencias en su regulación y cumplirían diferentes funciones; sólo el cortisol responde a factores de estrés agudos como la inmovilización (Vera *et al.* 2011), se incrementa (en niveles similares) frente a tratamientos con ACTH (hormona corticotrópica, antecesora de los glucocorticoides en la cascada HPA; Vera *et al.* 2012), y presenta respuesta de feedback negativo a la dexametasona (DEX; Vera *et al.* enviado). Sin embargo, su comportamiento frente al cautiverio, considerada una condición de estrés crónico, resulta en la disminución en los niveles de cortisol, de manera que ya no son tan notorias las diferencias encontradas entre sexos en condición silvestre, en la cual los niveles en las hembras son superiores a los encontrados en los machos (Vera *et al.* 2011). Por otro lado, la respuesta de estrés puntual manifestó un notorio incremento de cortisol plasmático en machos y hembras sometidos a una única inmovilización, acompañado por un impacto en el desempeño en el aprendizaje espacial, en presencia de olor de orina de gato (Brachetta *et al.* 2014). Así mismo, se encontró que la exposición de los tuco-tucos a olores del predador genera un estado de ansiedad e induce cambios comportamentales asociados a una disminución de la actividad locomotora y la generación de conductas de evitación (Capítulos 1 y 2). Sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles de cortisol plasmático, solo pequeñas variaciones en los niveles de glucosa en sangre y un leve incremento de la relación neutrófilos/linfocitos (Capítulo 1). La ausencia de un correlato endócrino de la respuesta comportamental también se observó con la exposición a diferentes intensidades de la señal predatoria y con el patrón temporal de repetición (Capítulo 2). En conjunto, estos estudios sugieren una asociación débil entre las respuestas fisiológicas y comportamentales a los olores de predadores en el roedor subterráneo *C. talarum*.

Focalizando sobre la relación entre el riesgo predatorio, el comportamiento y la respuesta fisiológica de estrés, el objetivo de este capítulo es evaluar la influencia de la naturaleza, y el mecanismo de evaluación de pistas indicativas de la presencia de un predador, sobre la generación de la respuesta comportamental y fisiológica a estrés por predación en *C. talarum*. Si bien se propone que la acción de los GCs y sus receptores están implicados en la generación de la respuesta fisiológica y comportamental asociada al estrés agudo, la débil o nula asociación reportada en estudios previos en la especie en estudio y otras, resalta la necesidad de profundizar al respecto, por lo que se

evaluará la respuesta comportamental asociada a tratamientos que inducen incrementos endógenos de GCs, exógenos, así como la inhibición de receptores de GCs.

Se predice que la inmovilización, representando el ataque de un predador y por lo tanto un fuerte compromiso respecto de la supervivencia, desencadena una mayor respuesta comportamental y fisiológica que la presencia de señales químicas contenidas en la piel y pelaje de un predador, las cuales se reconocen indicativas de la presencia inminente de un predador. La información química disponible para ser evaluada como riesgo de predación por una presa potencial y por lo tanto la respuesta desencadenada es mayor cuando la pista es accesible por contacto directo, permitiendo ser procesada por el sistema olfativo y el OVN. La magnitud de la respuesta de ansiedad generada dependerá del incremento en GCs, ya sea de origen endógeno o exógeno. En todos los casos, la respuesta comportamental involucra aumentos en los niveles de ansiedad, en forma de una disminución en la actividad locomotora y exploratoria, y la aparición de comportamientos defensivos, los cuales serán acompañados de aumentos en los niveles de los parámetros fisiológicos relacionados al estrés, tales como el cortisol plasmático, la glucosa y la proporción de neutrófilos: linfocitos (N/L).

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Machos adultos de *C. talarum* (n = 80) fueron capturados utilizando trampas de captura viva en pastizales arenosos de Villa Gesell (37 ° 15'19 "S, 56 ° 58'04" O, Provincia de Buenos Aires, Argentina). Los individuos capturados fueron llevados al laboratorio, luego fueron alojados en cajas plásticas individuales y alimentados como se explicó en el Capítulo 1. Al finalizar los experimentos, todos los animales fueron devueltos al sitio de captura en buenas condiciones de salud.

-Exposición a pistas de un predador: inducción endógena

Pistas químicas: para la exposición de los tuco-tucos a señales indicativas de la presencia de un predador se utilizó una tela impregnada con olor de la piel de gato (metodología de obtención y almacenamiento explicada en el Capítulo 1). Se utilizó una cápsula plástica de 10 cm de diámetro cubierta de una malla de alambre de manera completa o con un orificio de 3 cm de diámetro de manera de permitir el acceso directo al soporte de las pistas de olor.

Inmovilización con reja: los tuco-tucos se sometieron a inmovilización siguiendo la metodología explicada en Vera y colaboradores (2008): cada individuo se mantuvo firmemente durante un período de 2 min en un aparato de retención formado por dos rejillas de alambre paralelas que les impedía realizar cualquier tipo de movimiento. De esta manera, se simula la pérdida de movilidad y posibilidad de escape de un individuo cuando es atrapado por un predador.

-Inducción e inhibición exógena de la síntesis de glucocorticoides

Cortisol: los niveles de cortisol en sangre, principal GC en *C. talarum*, fueron incrementados mediante una inyección subcutánea (sc, dosis: 0.45 mg/Kg animal, Hidrocortisona, Sigma Aldrich), utilizando como vehículo aceite de sésamo (Sigma Aldrich). Se realizaron ensayos previos incluyendo dosis de 2.5, 1.25, 0.45 y 0.15 mg/Kg animal (control: aceite de sésamo), eligiendo aquella (0.45 mg/Kg) que resultara en niveles plasmáticos del mismo orden a la reportada como consecuencia de la activación por ACTH en machos tratados en cautiverio y campo (~ 50 µg/ml; Vera *et al.* 2012).

Metopirona: la metopirona (2-methyl-1,2-di-3-pyridil-1-propanone, Sigma Aldrich), un inhibidor de la síntesis de cortisol que actúa a nivel de las glándulas adrenales, se inyectó de forma intraperitoneal (ip, dosis: 75 mg/Kg animal) utilizando propilenglicol como vehículo. La dosis utilizada surge de estudios previos en ratas Wistar (Calvo y Volosin 2001, Rotllant *et al.* 2002) y del resultado de ensayos previos (utilizando 120, 75 y 40 mg/Kg animal, controles: propilenglicol) donde se probará su efectividad en la reversión del efecto de una inmovilización.

-Prueba de ansiedad:

Para evaluar el estado de ansiedad de los tuco-tucos luego de los diferentes tratamientos se utilizó el laberinto en cruz elevado (LE) que se describe en el Capítulo 1. Cada animal fue llevado al laberinto y colocado en la plataforma central para comenzar el experimento. El comportamiento de los individuos se registró utilizando una cámara de vídeo durante 5 minutos y a partir de las grabaciones se determinó: distancia total recorrida (cm), número de entradas a los brazos, número de entradas a los brazos transparentes (% total) y tiempo de permanencia en brazos transparentes (% total).

Tratamientos

Para evaluar la relación entre la respuesta de ansiedad y los niveles de glucocorticoides (cortisol), los machos adultos de *C. talarum* fueron asignados aleatoriamente a los distintos tratamientos en dos grupos experimentales:

-Grupo experimental A: incremento de cortisol endógeno, naturaleza y mecanismo de evaluación de pistas químicas.

Control (C) (n = 11): se realizaron dos controles, los animales del grupo Control 1 (n = 5) solo permanecieron en la caja durante 1 h sin exposición a la señal predatoria, por otro lado, los individuos del grupo Control 2 (n = 6) se expusieron al soporte plástico que se utilizó para las presentaciones de los olores, pero en este caso sin la tela impregnada con los olores de la piel y pelaje de gato. Dado que los niveles de cortisol plasmático no difirieron entre el C1 (caja) y el C2 (caja con soporte de olor vacío) (ANOVA, $F_{(1,9)} = 0.13$, $p = 0.727$), estos controles fueron unificados para los análisis posteriores.

G1a (n = 9): *exposición a olor de la piel de gato sin contacto directo con el soporte (tela)*. Se colocó a cada animal en una caja vacía con la presencia de la señal del predator- olor de la piel de gato en un dispositivo cubierto por una malla de alambre- (15 min), luego de retiró la señal y el animal permaneció en la caja hasta completar 1h.

G1b (n = 10): *exposición a olor de la piel de gato con contacto directo al soporte (tela)*. Se colocó a cada animal en una caja vacía con la presencia de la señal del predator- olor de la piel de gato en un dispositivo abierto- (15 min), luego se retiró la señal y el animal permaneció en la caja hasta completar 1h.

G2 (n = 9): *inmovilización con reja*. Se colocó al animal en la caja vacía, luego de 13 min se realizó la inmovilización con la reja (2 min) y posteriormente, el tuco-tuco permaneció en la caja hasta completar 1h.

-Grupo experimental B: incrementos exógenos, endógenos, e inhibición de receptores de GCs.

Control (C) (n = 11): control caja.

Control químico (CQ) (n = 9): *inyección de vehículos (aceite de sésamo + propilenglicol)*.

G3 (n = 9): *inyección de cortisol*.

G4 (n = 6): *inyección de metopirona sin inmovilización*.

G5 (n = 9): *inyección de metopirona + inmovilización con reja*.

G6 (n = 8): *inmovilización con reja*: con el fin de comparar los efectos de la inhibición de la síntesis de GC sobre los efectos de la inmovilización, se incluirán los resultados obtenidos previamente en el grupo A (**G2**).

En todos los casos la inyección de cortisol o su vehículo (control: sésamo), se aplicó 1 h antes de la evaluación comportamental, mientras que la metopirona o su vehículo (control: propilenglicol) fueron inyectados 90 min antes. La inmovilización con reja por 2 minutos se realizó 1h antes de la evaluación comportamental, permaneciendo en todos casos el individuo en una caja.

Grupo experimental		
A	Control	1- sin exposición a señal predatoria
		2- exposición al soporte plástico, sin señal del predador
	G1	a- exposición a olor de piel sin contacto directo
		b- exposición a olor de piel con contacto directo
G2	Inmovilización con reja	
B	Control	= grupo A
	Control químico	inyección de vehículos (aceite de sésamo + propilenglicol).
	G3	inyección de cortisol.
	G4	inyección de metopirona sin inmovilización.
	G5	inyección de metopirona + inmovilización con reja.
	G6	inmovilización con reja

Fig. 1: resumen de los tratamientos en los grupos experimentales A y B.

Procedimiento

Al finalizar el período de aclimatación (7 días), se tomó una muestra de sangre “pre-exposición” de cada individuo, a partir de la cual se obtuvieron los siguientes parámetros fisiológicos: niveles de glucosa en sangre, relación N/L y niveles de cortisol plasmático (utilizando la metodología explicada en Capítulo 1). La toma de cada muestra de sangre no duró más de 3 min, para garantizar que los niveles de glucocorticoides no fueran afectados por el procedimiento de extracción (Vera *et al.* 2011). Luego de 4 días, cada animal se expuso al tratamiento correspondiente y 1 h más tarde se registró el desempeño comportamental en la prueba de laberinto en cruz elevado (5 min). Al finalizar la prueba, de manera inmediata (ya que los niveles de cortisol aumentan significativamente a los 30-60 minutos en tuco-tucos sometidos a este estrés agudo (Vera *et al.* 2011), se tomó una muestra de sangre “post-exposición” a fin de obtener nuevamente los parámetros fisiológicos (niveles de glucosa en sangre, relación N/L y niveles de cortisol plasmático) (Fig. 2). De esta forma, y a diferencia del procedimiento llevado a cabo en los Capítulos 1 y 2 donde solo se obtenía la muestra post tratamiento (con el objetivo de minimizar el disturbio ocasionado por la extracción de sangre), en este Capítulo se obtiene una muestra pre y post tratamiento para cada individuo, permitiendo mejorar la capacidad de detectar los cambios en los parámetros fisiológicos como consecuencia de los tratamientos, más allá de las diferencias individuales.

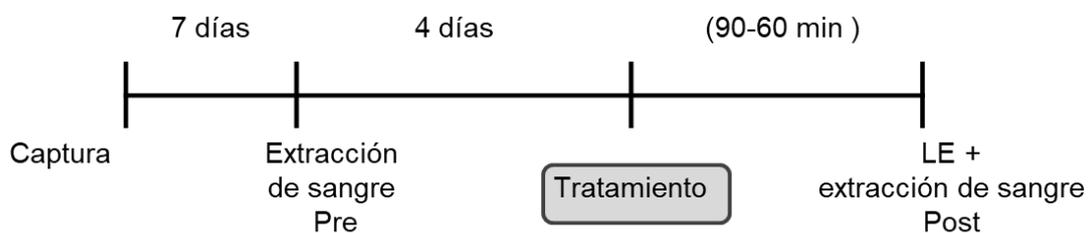


Fig. 2: Cronograma de exposición a los tratamientos y evaluación fisiológica y comportamental de los animales.

Tratamiento estadístico:

Parámetros fisiológicos: para evaluar si hubo efecto de los diferentes tratamientos sobre el cortisol plasmático, glucosa y relación N/L, se calcularon las diferencias entre los valores obtenidos en la condición post y pre tratamiento (post-pre) y se analizaron mediante ANOVA de una vía o su equivalente no paramétrico. Cuando se observaron efectos estadísticamente significativos de los factores, se realizaron Tests *a posteriori* para identificar diferencias entre los grupos.

Parámetros comportamentales: para evaluar el desempeño de los animales en el laberinto en cruz elevado se utilizó un test de ANOVA de una vía. En los casos en los cuales se detectaron diferencias significativas se realizó el correspondiente Test *a posteriori*.

RESULTADOS

-Grupo experimental A:

Medidas de estrés fisiológico

Cortisol: el acceso a la fuente de olor, impidiendo (G1a) o permitiendo (G1b) el contacto directo con ella no implicó diferencias en los niveles de cortisol detectados (ANOVA, $F_{(1,17)} = 0.015$, $p = 0.903$). Así, este tratamiento será unificado en posteriores análisis debido a la falta de efecto encontrado en relación al mecanismo de procesamiento de la información, utilizando solo olfacción o participación además del OVN. La naturaleza del factor de estrés aplicado (olor o inmovilización) tuvo efecto en la respuesta de GCs (Kruskal-Wallis, $H = 11.471$, $gl = 2$, $p = 0.003$). La inmovilización con reja (G2) desencadenó un incremento significativo de cortisol plasmático en relación al control (Test de Dunn, $p = 0.002$). La presencia de olor de un predador (G1) mostró efectos algo menores, ya que no difiere del control y muestra una diferencia marginalmente significativa respecto del tratamiento con aplicación de reja ($p = 0.051$).

Glucosa: los niveles de glucosa no difirieron entre ambos controles (Mann Whitney, $U = 11$, $T = 34$, $p = 0.537$), acceso a la muestra de olor (Mann Whitney, $U = 44.5$, $T = 89.5$, $p = 1$), ni acorde a la naturaleza del factor de estrés por predación aplicado (Kruskal Wallis, $H = 2.581$, $p = 0.275$).

N/L: la relación N/L no mostró diferencias para las mismas comparaciones (controles: ANOVA, $F_{(5,6)} = 0.243$, $p = 0.634$, acceso a la muestra de olor: Mann Whitney, $U = 36$, $T = 99$, $p = 0.488$, la naturaleza del factor de estrés aplicado: Kruskal Wallis, $H = 0.155$, $p = 0.925$).

Tabla 1: niveles de glucosa en sangre (mg/ml, Media \pm DE), relación neutrófilos/linfocitos (Media \pm DE) y niveles de cortisol plasmático (ng/ml; Media \pm DE) en individuos de *Ctenomys talarum* de los grupos control, expuestos al olor de piel de gato (G1) o a inmovilización (G2).

	Control		G1		G2	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Niveles de glucosa en sangre (mg/ml)	148.45 \pm 90.31	98.36 \pm 44.51	92.52 \pm 68.37	79.47 \pm 26.71	129.44 \pm 66.88	98.22 \pm 56.22
Relación neutrófilos/linfocitos	1.61 \pm 1.2	2.89 \pm 2.56	1.64 \pm 1.14	2.72 \pm 2.87	1.46 \pm 1.03	2.28 \pm 1.75
Niveles de cortisol plasmático (ng/ml)	12.07 \pm 4.72	13.35 \pm 3.73	14.41 \pm 6.14	20.22 \pm 7.25	11.82 \pm 6.1	27.42 \pm 14.08

Test de ansiedad

Luego de la inmovilización con reja (G2) y la exposición al olor de la piel de gato (G1) los individuos mostraron una disminución en el tiempo de permanencia (ANOVA, $F_{(2,36)} = 7.939$, $p = 0.001$) y el tiempo rascando las paredes en los brazos transparentes (ANOVA, $F_{(2,36)} = 10.061$, $p < 0.001$) con respecto al grupo control en el laberinto elevado. Sin embargo, no se observaron diferencias en la distancia total recorrida (ANOVA, $F_{(2,36)} = 0.86$, $p = 0.431$), número total de entradas a los brazos ($p = 0.45$) y número de entradas a los brazos transparentes (ANOVA, $F_{(2,36)} = 1.422$, $p = 0.254$) entre los individuos del grupo control y de los grupos G1 y G2 (Fig. 3).

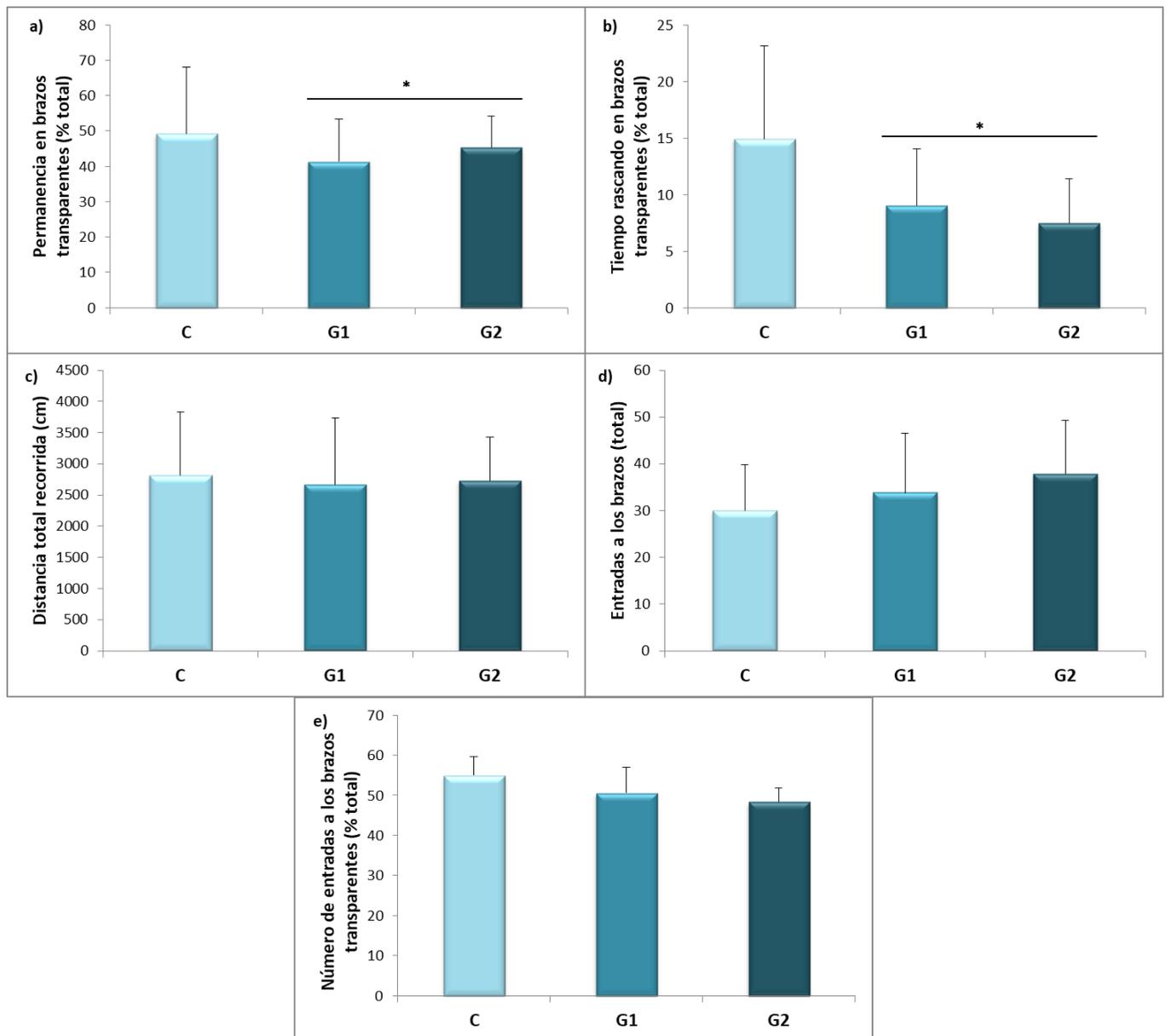


Fig. 3: tiempo de permanencia en los brazos transparentes (Media \pm DE) (a), tiempo rascando paredes en los brazos transparentes (Media \pm DE) (b), distancia total recorrida (cm; Media \pm DE) (c), número total de entradas a los brazos (Media \pm DE) (d) y número de entradas a los brazos transparentes (Media \pm DE) (e) de los grupos control (C), G1 y G2 en el laberinto en cruz elevado.

- Grupo experimental B:

Medidas de estrés fisiológico

Los grupos experimentales involucrando incrementos endógenos, exógenos e inhibición de receptores de GCs difirieron en los niveles de cortisol (Kruskal Wallis, H =

30.643, $gl = 5$, $p = 0.001$). Los individuos inyectados con cortisol (G3), incrementaron notoriamente sus niveles plasmáticos, difiriendo de los obtenidos en los pertenecientes al control por permanencia en la caja sin estímulo (C, Comparaciones múltiples de Dunn, $p = 0.003$), control químico (CQ, $p < 0.001$), así como aquellos bajo inhibición con metopirona, aplicando o no inmovilización (G5, $p = 0.004$ y G4, $p = 0.001$). Los individuos inmovilizados con reja (G6) solo difirieron marginalmente del grupo control por vehículo (CQ, $p = 0.067$). Si el incremento exógeno no es considerado (C, CQ, G4-G6), los grupos experimentales difieren entre sí ($F_{(4,48)} = 5.377$, $p = 0.002$), destacándose que la inmovilización (G6) difiere del control de caja (C, Comparaciones múltiples de Holm Sidak, $p = 0.003$), el control por vehículo (CQ, $p = 0.003$), la aplicación del inhibidor sin inmovilización (G4, $p = 0.003$) y la metopirona con inmovilización (G5, $p = 0.045$), confirmando el efecto de la inhibición (Tabla 2).

Los niveles de glucosa no difieren entre tratamientos (Kruskal Wallis, $H = 5.811$, $gl = 5$, $p = 0.325$) así como tampoco la relación N/L ($F_{(4,39)} = 1.667$, $p = 0.177$, Tabla 2).

Tabla 2: niveles de glucosa en sangre (mg/ml, Media \pm DE), relación neutrófilos/linfocitos (Media \pm DE) y niveles de cortisol plasmático (ng/ml; Media \pm DE) en individuos de *Ctenomys talarum* de los grupos control, CQ, G3, G4, G5 y G6, luego de la prueba de laberinto elevado.

	C		G3		CQ		G4		G5		G6	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Niveles de glucosa en sangre (mg/ml)	148.45 \pm 90.31	98.36 \pm 44.51	148.55 \pm 115.5	110.22 \pm 75.48	113.44 \pm 100	103.67 \pm 57.33	84.12 \pm 54.79	73.87 \pm 26.63	82.11 \pm 63.01	89.78 \pm 29.24	65.83 \pm 21.96	83.67 \pm 44.73
Relación neutrófilos /linfocitos	1.61 \pm 1.2	2.89 \pm 2.56	1.92 \pm 1.51	3.59 \pm 3.54	2.52 \pm 2.60	2.27 \pm 1.10	1.78 \pm 0.76	2.04 \pm 0.88	2.51 \pm 2.16	2.89 \pm 3.27	1.85 \pm 1.52	1.84 \pm 0.98
Niveles de cortisol plasmático (ng/ml)	12.07 \pm 4.72	13.35 \pm 3.73	13.67 \pm 7.82	94.24 \pm 37.28	13.02 \pm 6.17	11.04 \pm 6.25	10.35 \pm 4.62	21.04 \pm 7.95	12.34 \pm 3.52	13.74 \pm 3.17	14.96 \pm 13.20	11.35 \pm 5.14

Test de ansiedad

El grupo inyectado con cortisol exhibió una disminución en el tiempo en los brazos transparentes, aunque en forma marginalmente significativa y solo con respecto al grupo control (C) (test de Fisher, $p = 0.065$ vs control; $p = 0.16$ vs control químico, CQ). Un resultado similar se obtuvo con la inyección de metopirona previo a la inmovilización (G5), observándose una disminución en el tiempo en los brazos transparentes, aunque en forma marginalmente significativa y solo con respecto al grupo control (test de Fisher, $p = 0.063$ vs control; $p = 0.16$ vs control químico, CQ). Esto último contrasta con la clara disminución en esta variable obtenida luego de la inmovilización (G6) (test de Fisher, $p = 0.002$ vs control; $p = 0.009$ vs control químico). En cuanto al tiempo rascando las paredes de los brazos transparentes, se encontró una disminución de este parámetro con respecto al control en los grupos que fueron inmovilizados (G6) e inmovilizados luego de ser inyectados con metopirona (G5), (test de Scheffé, $p = 0.02$ y $p = 0.012$, respectivamente), aunque no cuando se lo comparo con el control químico CQ (test de Scheffé, $p = 0.54$ y $p = 0.45$, respectivamente). No se observó efecto de ninguno de los tratamientos en la distancia total recorrida (ANOVA, $F_{(5,47)} = 1.649$, $p = 0.16$), el número total de entradas a los brazos (ANOVA, $F_{(5,47)} = 1.431$, $p = 0.23$) y el número de entradas a los brazos transparentes del laberinto en cruz elevado (ANOVA, $F_{(5,47)} = 1.169$, $p = 0.34$) (Fig. 4).

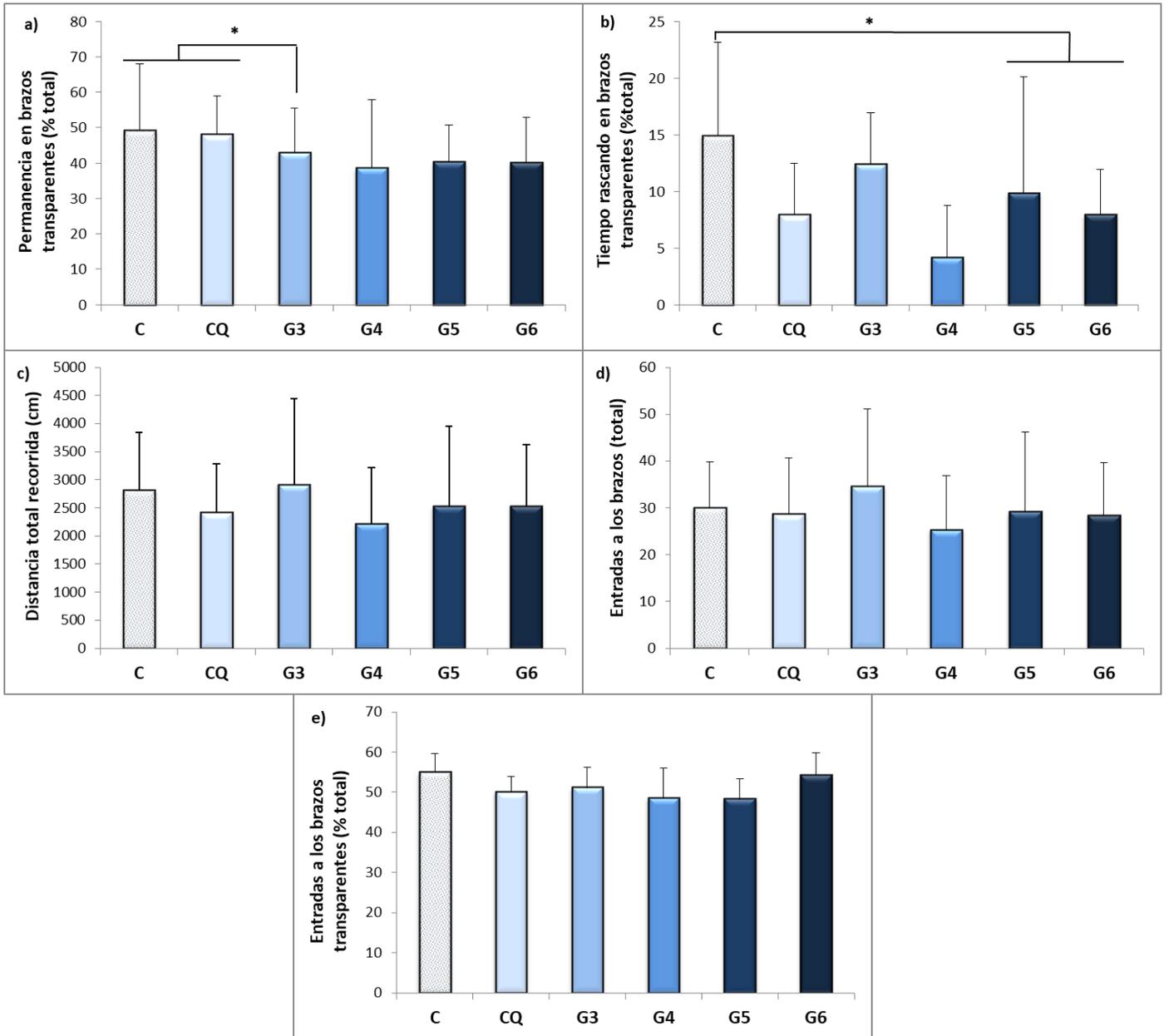


Fig. 4: tiempo de permanencia en los brazos transparentes (Media \pm DE) (a), tiempo rascando paredes en los brazos transparentes (Media \pm DE) (b), distancia total recorrida (cm; Media \pm DE) (c), número total de entradas a los brazos (Media \pm DE) (d) y número de entradas a los brazos transparentes (Media \pm DE) (e), y de los grupos control (C), control químico (CQ), G3, G4, G5 y G6 en el laberinto en cruz elevado.

DISCUSIÓN

Frente a un desafío predatorio, representado por pistas indicativas de la presencia de un predador, el olor de la piel, y en mayor medida, la inmovilización, los tuco-tucos responden fisiológicamente mediante la secreción de cortisol. Esa respuesta fue acompañada por una respuesta comportamental asociada, disminuyendo su actividad en los brazos transparentes de un laberinto elevado y el tiempo rascando, principalmente en los individuos inmovilizados. Sin embargo, cuando el incremento en cortisol plasmático se origina por vía exógena, aun siendo este de mayor magnitud, no se observó una respuesta comportamental de magnitud. Así mismo, la inhibición de la síntesis de GCs fue efectiva en la respuesta fisiológica y debilitó los efectos comportamentales producidos por la inmovilización.

La respuesta de estrés se despliega como consecuencia de un desafío real o percibido y permite mejorar el desempeño inmediato durante un período crítico. De esta forma, constituye un componente importante del fitness y su respuesta óptima resulta de un balance donde se maximiza la supervivencia frente a un desafío, minimizando los costos asociados (Sapolsky *et al.* 2000, Romero 2004). En términos ecológicos, se espera que la selección natural favorezca individuos capaces de ajustar o modificar la fisiología y el comportamiento frente a desafíos ambientales. Esa respuesta de estrés se espera que esté modulada por factores como la frecuencia e intensidad de los factores de estrés, el contexto y los rasgos de historia de vida, balanceando las consecuencias perjudiciales sobre el fitness que surgen de la activación desmedida o crónica del eje HPA (Wingfield y Sapolsky 2003, Wingfield 2005, Romero *et al.* 2009). La activación del eje de estrés como consecuencia de la estimulación con pistas indicativas de la presencia de un predador en *C. talarum* desencadenó niveles de cortisol particularmente moderados. Más aún, estos incrementos se hicieron notorios, a diferencia de lo reportado en los capítulos anteriores, cuando la diferencia post y pre tratamiento fue considerada para cada individuo. Aunque generalmente se considera que el estrés crónico implica niveles altos y sostenidos de GCs, Dickens y Romero (2013) plantean otras posibles consecuencias incluyendo la disminución. Este es el caso de *C.*

talarum, donde el cautiverio constituye una condición de estrés crónico, que resulta en la disminución en los niveles de cortisol respecto de los encontrados en su ambiente natural (Vera *et al.* 2011). Esta condición de estrés crónico basal podría condicionar la magnitud de las respuestas subsecuentes, ya sea a estímulos puntuales como crónicos. Estudios a futuro en condición silvestre, permitirán aclarar este punto; si la respuesta se mantuviera en niveles bajos, podría atribuirse entonces a una baja reactividad asociada a la protección que obtienen estos organismos a través de las cuevas. El uso del ambiente de superficie en los tuco-tucos es comúnmente dirigido hacia puntos específicos del pastizal, sin practicar la exploración extensiva del mismo. Otro período de mayor exposición lo constituye la dispersión, aunque el uso de cuevas abandonadas se ha reportado durante este proceso (Malizia *et al.* 1995), lo cual minimizaría el tiempo en superficie.

La detección de un predador previamente a su encuentro es una estrategia de primera línea para las presas. Si bien los predadores han evolucionado características que les permiten ser poco conspicuos frente a sus presas, muchos de ellos utilizan la marcación como parte de la defensa territorial, tanto con productos metabólicos como glándulas especializadas. Así, las presas potenciales se valen de esta información y responden a una gran variedad de olores (Fendt *et al.* 2005, Apfelbach *et al.* 2005, Hegab *et al.* 2015). Dado que subsistemas olfatorios detectan diferentes tipos de olores, se desencadenan respuestas defensivas apropiadas acorde a las características de la señal. Si los receptores olfativos que responden a los olores de los predadores se expresan en el epitelio olfativo principal o en el OVN, las consecuencias comportamentales y ecológicas son importantes (Ferrero *et al.* 2011). En el caso de *C. talarum*, el olor del pelaje y la piel se le conoce un mayor efecto ansiogénico que la orina (Capítulo 2), debido probablemente a que indica mayor inminencia de presencia de un predador y por lo tanto mayor riesgo. En este trabajo, se reporta además, que la respuesta fisiológica fue equivalente cuando los tuco-tucos accedieron al contacto directo o a distancia a la fuente de olor. Esto indicaría que el OVN no se requiere para procesar la señal y por lo tanto la misma puede ser advertida a distancia mediante compuestos químicos volátiles, lo cual representa una ventaja al momento de evitar áreas de alta probabilidad de encuentro con un predador.

La naturaleza de la señal y sus implicancias en lo que respecta al riesgo real de predación resultan características de importancia modulando la respuesta antipredatoria. Estas son las bases de la hipótesis de evitamiento de predadores de acuerdo al riesgo, la cual se ha confirmado en un amplio espectro de especies de vertebrados (e.g. Silverin 1998, Canoine *et al.* 2002, Davis y Gabor 2015). Particularmente en mamíferos, se ha reportado esta respuesta en cautiverio (Monclús *et al.* 2005) y en poblaciones silvestres de liebres *Oryctolagus cuniculus* (Monclús *et al.* 2009), mientras que en ratas de laboratorio se han encontrado respuestas diferenciales a varias fuentes de olor de un predador que implican riesgo eventual de encuentro (e.g. Blanchard *et al.* 2003a, Masini *et al.* 2005). Una respuesta de cortisol menor para el olor del pelaje en relación a la inmovilización fue detectada en este estudio, lo cual puede ser atribuido al compromiso directo sobre la supervivencia que representa la imposibilidad de escapar de un predador –representado por la inmovilización- respecto de encontrar una señal indicativa de la presencia de un predador en el área. Además, los olores implican un encuentro predecible, por lo que se espera que la respuesta del eje HPA sea menor (Sapolsky 2002). Esto es factible en nuestro estudio, ya que los individuos que participaron de los ensayos seguramente sufrieron encuentros con señales de sus predadores en su ambiente.

El incremento en GCs, consecuencia de la activación del eje HPA luego del encuentro con una señal indicativa de la presencia de un predador, incluye la movilización de energía requerida para la respuesta comportamental antipredatoria (Sapolsky *et al.* 2000), por lo que se espera que la respuesta fisiológica y comportamental estén relacionadas. Los roedores muestran discrepancias respecto de este acoplamiento, mostrando comportamientos antipredatorios pero sin respuesta en los niveles de GCs (ardilla dorada *Spermophilus beldingi*, Mateo 2007; ratones de campo silvestres *Apodemus sylvaticus*, Navarro-Castilla y Barja 2014; topillo rojo *Clethrionomys glareolus*, Ylönen *et al.* 2006). Así mismo, la presencia de olores asociados a la piel de gato causó un aumento a largo plazo en la reactividad emocional y los comportamientos asociados a un estado de ansiedad en el ratón doméstico *Mus musculus*. Sin embargo, este efecto no se reflejó en la magnitud de la respuesta fisiológica asociada al eje HPA (Muñoz-Abellán *et al.* 2008). En contraste, la exposición a un período de inmovilización causó un aumento pronunciado de los niveles de

hormonas asociadas al eje HPA sin mostrar comportamientos de ansiedad (Muñoz-Abellán *et al.* 2008). Por otro lado, la inmovilización indujo, en hembras de *Microtus ochrogaster*, una respuesta comportamental asociada a estados de ansiedad y un incremento en los niveles de corticosterona (Smith *et al.* 2013). En este estudio, se encontró relación entre la respuesta fisiológica y comportamental; el incremento en cortisol endógeno frente a la exposición a olores, y en mayor medida en la inmovilización, fueron concomitantes con una respuesta comportamental asociada a una disminución en la permanencia en los brazos transparentes del laberinto, al igual que en el tiempo rascando, que fue comparable para ambos casos. En este sentido, resulta necesario destacar que la relación entre la respuesta fisiológica y comportamental no se limita al período de tiempo cercano al estímulo por señales de un predador. Sapolsky *et al.* (2000) describen que la acción de los GCs puede ser de cuatro tipos diferentes, permisivas, preparatorias, estimuladoras y supresivas. Particularmente la respuesta de estrés puede ser considerada preparatoria ya que el encuentro con pistas de un predador puede no tener un mayor efecto inmediato pero sí modular la respuesta frente a un subsecuente encuentro si se mantiene el riesgo en el área.

A fin de profundizar la relación entre la respuesta fisiológica y la comportamental, se implementaron ensayos en *C. talarum* involucrando cortisol exógeno y la inhibición de la síntesis endógena (metopirona). Los mismos fueron exitosos en el primer caso en incrementar los niveles plasmáticos de cortisol del mismo orden (aunque algo mayores a los encontrados en individuos sometidos a inmovilización y ACTH en el campo, Vera *et al.* 2011), y en el segundo caso, inhibiendo la actividad de las glándulas adrenales, sin evidenciar efectos fisiológicos o comportamentales secundarios. Sin embargo, el aumento en los niveles de cortisol producto de su suplementación externa no se tradujo en una respuesta comportamental concomitante y notoria. En el caso de la inyección de metopirona previo a la inmovilización, la inhibición de la síntesis de GCs indujo una evidente menor respuesta comportamental comparado con lo observado con la inmovilización exclusiva. Al respecto, es posible plantear diferentes alternativas. Una de ellas propone que la concentración de GCs no implica mayor respuesta comportamental sino que a distintas concentraciones puede desencadenar diferentes comportamientos, lo cual fue

demostrado en ratas (Dallman *et al.* 1993, Dhabhar y Mc Ewen 1999). Bajo esta perspectiva, es posible que otros comportamientos, diferentes de los involucrados en la prueba utilizada hayan sufrido cambios pero no fueron cuantificados. Por otro lado, es posible que un incremento en GCs *per se* no sea suficiente para desencadenar una respuesta antipredatoria, sino que la misma esté asociada a estímulos identificados como provenientes de un predador, considerando en esta fase la percepción sensorial del propio factor de estrés, la cual puede variar ampliamente (Sopinka *et al.* 2015). Así, en la respuesta comportamental podrían estar involucrados otros aspectos o componentes de la respuesta al estrés, incluyendo la activación del eje simpático-médulo-adrenal (SMA), que resulta en un incremento en los niveles de catecolaminas (noradrenalina y adrenalina) y otras hormonas, neurotransmisores, citoquinas y péptidos opioides (Sapolsky *et al.* 2000, Armario 2006, Boonstra 2013).

Por otro lado, frecuentemente se proponen relaciones lineales entre los niveles de GCs y otros parámetros fisiológicos, como la relación N/L (Davis *et al.* 2008). En este trabajo no se observaron diferencias en la proporción N/L y en los niveles de glucosa en sangre luego de la inducción tanto endógena como exógena de los niveles de cortisol. La relación N/L se reconoce principalmente como indicativa de respuestas a factores de estrés de tipo crónico más que puntual (Davis *et al.* 2008). Se ha observado en estudios previos que *C. talarum* responde incrementando sus relaciones N/L cuando se expone a un periodo de inmovilización, así como al estrés crónico que representa la condición de cautiverio y la restricción alimentaria (Vera *et al.* 2011). Por otro lado, en estudios previos con tuco-tucos adultos se encontró que los individuos no mostraron variaciones en ambos parámetros fisiológicos luego de la exposición a señales indicativas de la presencia de un predador (orina u olor de la piel de un gato) presentadas con diferentes intensidades o frecuencias (Capítulos 1 y 2).

En conclusión, este estudio muestra que, en *C. talarum*, la inmovilización y la exposición a pistas (olores) de un predador actúan como factores de estrés que desencadenan incrementos diferenciales de cortisol plasmáticos y una respuesta comportamental asociada a la aparición de estados de ansiedad. Estas respuestas son de magnitud moderada, las cuales se corresponderían con presiones de predación aliviadas por el uso del ambiente subterráneo. Para comprender plenamente cómo los organismos silvestres se ven afectados por los diversos factores de estrés, es crucial

entender con mayor detalle la fisiología que subyace a la respuesta frente a un estresor, así como su relación con los mecanismos comportamentales. Dado que la relación entre la respuesta comportamental y fisiológica es compleja, se hace necesaria una aproximación multidimensional considerando la evaluación de diferentes comportamientos como los presupuestos de tiempo, uso de espacio, vigilancia, y respuestas a diferentes pistas de predadores, considerando el contexto, especialmente en lo que respecta a la percepción del riesgo o implicancias para el organismo presa (Mateo 2007).



CAPÍTULO 4

Exposición maternal a las pistas directas de un
predador: efectos sobre el comportamiento,
fisiología e inmunidad en las crías.

El presente Capítulo ha sido aceptado para su publicación como:

Brachetta, V., Schleich, C., Cutrera, A.P., Merlo, J.L., Kittlein, M.J. and Zenuto, R.R.

Prenatal predatory stress in a wild species of subterranean rodent: do ecological stressors always have a negative effect on the offspring? *Developmental Psychobiology*:

2018 (en prensa)

CAPÍTULO 4: EXPOSICIÓN MATERNAL A PISTAS DIRECTAS DE UN PREDADOR: EFECTOS SOBRE EL COMPORTAMIENTO, FISIOLOGÍA E INMUNIDAD EN LAS CRÍAS.

INTRODUCCIÓN

Como fue descrito anteriormente, la exposición a factores de estrés ecológicos y ambientales, como la presencia de predadores o sus olores, puede causar cambios severos en la fisiología y el comportamiento de los individuos (Kavaliers y Choleris, 2001, Apfelbach *et al.* 2005, Takahashi *et al.* 2005, Hegab *et al.* 2014, 2015). Sin embargo, estos efectos no se circunscriben únicamente al individuo presa. En diversas especies se ha descrito que también la descendencia es influenciada por las condiciones ambientales que experimenta su madre, quien puede luego afectar a su prole tanto durante la gestación como luego del nacimiento debido a alteraciones en la calidad y cantidad de cuidado parental (Mashoodh *et al.* 2009, Sheriff *et al.* 2015, Bauer *et al.* 2015). Focalizando en la exposición prenatal a olores del predador, se sabe que el estrés materno durante la preñez aumenta los niveles plasmáticos de glucocorticoides (GCs) en la madre, lo que a su vez puede tener fuertes efectos negativos en el desarrollo fetal, el tamaño de la camada, el peso corporal y el tiempo de maduración sexual de la descendencia (Vasilieva *et al.* 2001, Apfelbach *et al.* 2005, Weinstock 2008, Monclús *et al.* 2011, Love *et al.* 2013). Sin embargo, estudios recientes han sugerido que muchos efectos de situaciones estresantes durante el periodo gestacional pueden ser positivos para las crías. Por ejemplo, el estrés materno crónico puede ser un buen predictor del ambiente y, por lo tanto, el riesgo predatorio puede beneficiar a la descendencia como resultado de la programación materno-perinatal (Boonstra 2013). Este proceso de programación puede afectar la expresión génica en la descendencia, afectando su desempeño durante toda la vida (Meaney *et al.* 2007). Por ejemplo, en diversas especies, las crías de madres que fueron expuestas a pistas de predadores son más eficientes defendiéndose contra predadores que las crías de madres no expuestas (Shine y Downes 1999, Storm y Lima 2010, McGhee *et al.* 2012).

Además, existe evidencia creciente de que las variaciones en el ambiente prenatal pueden influenciar las respuestas de la descendencia tanto en el corto como en el largo plazo (Barbazanges *et al.* 1996, Vallee *et al.* 1997, Boersma y Tamashiro 2015).

Estudios realizados en roedores han mostrado relación entre situaciones estresantes durante la preñez y cambios en el comportamiento, fisiología e inmunología de las crías (Guo *et al.* 1993, Lordi *et al.* 1997, 2000, Götz y Stefanski 2007, Götz *et al.* 2007, Wilson *et al.* 2013). Por ejemplo, experimentos comportamentales demostraron que ratas estresadas prenatalmente muestran niveles mayores de ansiedad (Estanislau y Morato 2005, Abe *et al.* 2007), variaciones en la motivación para explorar laberintos (Valleé *et al.* 1997, Patin *et al.* 2005), y diversas anormalidades en el comportamiento, incluyendo disminución del miedo innato en respuesta al olor de predadores, alteración de la extinción del miedo, aumento de la actividad locomotora y aparición de comportamientos estereotipados (Wilson *et al.* 2013). A su vez, los cambios en el comportamiento inducidos por estrés prenatal pueden estar acompañados por alteraciones en la función del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) (Maccari *et al.* 1995, Bagazages *et al.* 1996, Abe *et al.* 2007). Por ejemplo, Shöpper y colaboradores (2012) encontraron que la exposición a estrés en hembras de cobayo (*Cavia porcellus*) preñadas resultó en niveles de glucocorticoides basales menores en crías durante la fase pre-pubertal, a pesar de lo cual siguieron siendo capaces de aumentar los niveles de cortisol en plasma luego de la exposición al estrés. Por otro lado, Bian y colaboradores (2015) demostraron que el estrés maternal, inducido por la densidad en ratones de la tundra (*Microtus oeconomus*), altera el eje de estrés de la descendencia, observándose niveles de metabolitos fecales de corticosterona (FCM) mayores en las crías que nacieron de madres estresadas (bajo condiciones de alta densidad). Resulta interesante destacar que estos cambios fisiológicos pueden depender del momento en el que se verifica el estrés maternal en lo que respecta al desarrollo gestacional, su intensidad y duración (Weinstock 2008).

Aparte de los efectos sobre el eje de HPA de la madre y la descendencia, estudios recientes sugieren que el estrés experimentado por la madre durante la preñez también puede afectar la función del sistema inmune de la progenie en desarrollo (Kay *et al.* 1998, Bakker *et al.* 1998, Merlot *et al.* 2007). Estudios experimentales que evaluaron las consecuencias del estrés durante el período gestacional indicaron efectos

perjudiciales en el número de leucocitos y la capacidad de respuesta de la descendencia. Götz y Stefanski (2007) investigaron el efecto de un factor de estrés maternal involucrando interacciones sociales (utilizando el paradigma de conflicto psicosocial entre hembras) en ratas Long-Evans y encontraron que los machos estresados prenatalmente presentaban un menor número basal de leucocitos. También, se observó una reducción de la respuesta proliferativa de linfocitos (la cual se espera que ocurra bajo una respuesta inmune de tipo inflamatoria) a la estimulación con una lectina de hierba carmín como agente mitogénico (denominación en inglés: pokeweed, PWM). Sin embargo, no hubo diferencias en el índice de proliferación reportados para los machos control y estresados prenatalmente en respuesta al agente mitogénico Concanavalina A, una lectina extraída de la leguminosa *Canavalia ensiformis* (Götz y Stefanski 2007). Además de afectar la respuesta de anticuerpos (Sobrian *et al.* 1997), el estrés prenatal también puede influir en los mecanismos de regulación de la inflamación (Vanbesien-Mailliot *et al.* 2007).

Mientras que estos efectos del estrés prenatal en la descendencia han sido investigados extensivamente en ratas de laboratorio utilizando principalmente factores de estrés convencionales de laboratorio (por ejemplo, restricción física, Maccari *et al.* 1995; choque eléctrico, Estanislau y Morato 2005; estrés psicológico, Abe *et al.* 2007; y estrés psicosocial, Götz y Stefanski 2007), comparativamente pocos estudios han involucrado especies silvestres y estresores ecológicamente relevantes. Un ejemplo de esta última situación fue llevado a cabo por Bian y colaboradores (2015), quienes estudiaron los efectos de la densidad poblacional de hembras reproductivas durante la gestación sobre la fisiología, la reproducción y la dinámica poblacional de la descendencia en *M. oeconomus*. Los estresores naturales, como la presencia de un predador o las señales indicativas de su presencia, que ciertamente representan un estímulo con mayor relevancia ecológica, son poco utilizados como estresores en condiciones experimentales. Por lo tanto, en los organismos modelo no tradicionales, la relación entre las exposiciones a los factores de estrés naturales en el período gestacional y los efectos sobre la descendencia ha sido poco explorada (Boonstra 2013). Sin embargo, este tema debe ser considerado para profundizar nuestra comprensión sobre el rol potencialmente adaptativo de los estresores ecológicos y ambientales para la descendencia en su adultez.

Ctenomys talarum presenta un sistema de apareamiento poligínico en el cual los machos nunca ejercen cuidado preparental o parental (Zenuto *et al.* 2001, Zenuto *et al.* 2002). El periodo de gestación es de 95 días desde la cópula (Zenuto *et al.* 2001). Las crías presentan a los 60 días edad, independencia comportamental y fisiológica de su madre (Zenuto *et al.* 2002, Cutrera *et al.* 2003). Por lo tanto, el período de destete comienza a esta edad, cuando las crías comienzan a exhibir un comportamiento exploratorio activo (Schleich 2010), y se dispersan desde la cueva materna (Malizia *et al.* 1995) incrementándose su labilidad frente a la predación terrestre y aérea (Busch *et al.* 2000). La edad de maduración sexual de esta especie es seis meses para las hembras y nueve meses para los machos (Malizia y Busch 1991).

Como se ha detallado anteriormente, estudios previos realizados en adultos de *C. talarum* mostraron que la exposición a señales indicativas de la presencia de un predador afecta por un lado el aprendizaje espacial y sus capacidades de memoria (Mastrángelo *et al.* 2009; Brachetta *et al.* 2014). Además, generan un estado de ansiedad e inducen cambios comportamentales asociados con la disminución de la actividad locomotora y la aparición de conductas de evitación (Capítulo 1, Brachetta *et al.* 2015). La intensidad del olor del predador presentado a los tuco-tucos tiene un rol en la aparición de comportamientos defensivos, siendo los olores de la piel del gato, más ansiogénicos que la orina (Capítulo 2, Brachetta *et al.* 2016). La respuesta comportamental frente a pistas de un predador está asociada, aunque moderadamente, a un incremento en los glucocorticoides (Capítulo 3).

El sistema inmune de adultos y crías de *C. talarum* ha sido evaluado en múltiples aspectos. Por ejemplo, Cutrera y colaboradores (2014) encontraron que los tuco-tucos juveniles (60 días de edad) montaron una respuesta inflamatoria a la fitohemaglutinina (lectina de la leguminosa *Phaseolus vulgaris*, PHA) significativamente mayor que los adultos. Resulta interesante destacar que a esa edad los tuco-tucos juveniles comienzan a salir de la cueva materna, situación que podría incrementar la frecuencia de las lesiones causadas por las interacciones con los predadores (Zenuto *et al.* 2002). Además, Cutrera y colaboradores (2010) encontraron que los adultos de esta especie subterránea son capaces de montar una respuesta inmune humoral contra un antígeno novedoso (glóbulos rojos de oveja; SRBC) y que la respuesta representa un costo

energético significativo para ellos. Sin embargo, en juveniles de *C. talarum* la respuesta humoral permanece aún sin ser evaluada.

Hasta el momento no se han explorado los efectos generacionales de una situación amenazante, como la presencia de pistas de un predador durante el período gestacional y sus consecuencias en la descendencia de *C. talarum*. Por lo tanto, el objetivo de este capítulo es evaluar si la exposición prenatal a señales indicativas de la presencia de un predador -gato- (orina, olor de la piel e inmovilización) afecta la fisiología y el comportamiento de las crías de *C. talarum* a edad juvenil, (coincidente con la etapa de dispersión natal). En particular, evaluaremos si la exposición maternal al estrés por predador induce variaciones en: 1) niveles de ansiedad, actividad locomotora, exploración, comportamientos defensivos, 2) respuesta comportamental a señales indicativas de la presencia de un predador; 3) respuesta inmune y 4) activación del eje HPA en la descendencia.

Se predice que el estrés prenatal, generado por la presencia de señales de un predador causará un incremento en los niveles de ansiedad en los juveniles de *C. talarum* en forma de disminución de la actividad locomotora y exploratoria, y la aparición de comportamientos defensivos. Además, mostrarán una mayor respuesta comportamental cuando se exponen a pistas directas de un predador. Por otro lado, se espera que la capacidad de montar respuestas tanto inflamatorias como de anticuerpos se vea afectada en individuos estresados prenatalmente. Finalmente, se esperan cambios en los niveles basales de GCs y su reactividad a la inmovilización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y condiciones del laboratorio:

Hembras preñadas de *Ctenomys talarum* (n = 15) fueron capturadas utilizando trampas de captura viva en las dunas de arena de Villa Gesell (37 ° 15'19 "S, 56 ° 58'04" O, Provincia de Buenos Aires, Argentina) entre mayo y diciembre de 2015 (estación reproductiva). Las hembras capturadas fueron llevadas inmediatamente al bioterio y alojadas en las condiciones mencionadas en el Capítulo 1, colocando media maceta

como refugio y virutas de madera como material de anidación. Los animales fueron alimentados como se explicó en el Capítulo 1. Luego de 7 días de aclimatación a las condiciones de cautiverio, las hembras fueron asignadas a los grupos con exposición a estrés prenatal por predador (EPP) o control (C). Al finalizar los experimentos, las madres y sus crías fueron devueltas al sitio de captura en buenas condiciones de salud. Debido a la baja actividad reproductiva en condiciones de cautiverio –aun permitiendo que las hembras se apareen con los machos preferidos- (Zenuto *et al.* 2007) y el largo período de gestación descrito para *C. talarum* (95 días; Zenuto *et al.* 2001), la obtención del pool de crías requerido para llevar a cabo este tipo de estudio no pudo ser realizado a partir de apareamiento de parejas en el bioterio.

Procedimiento de estrés prenatal por predador:

Las hembras preñadas fueron divididas aleatoriamente en dos grupos. Un grupo se utilizó como control (C: sin exposición a las señales de los predadores, n = 6) y el otro grupo fue sometido al estrés prenatal por predador (EPP, n = 9). Los individuos del grupo EPP fueron expuestos a señales de predadores (olor de orina + olor de piel/inmovilización) una vez por semana hasta el día de nacimiento. Siguiendo este esquema, y de acuerdo a la duración de la preñez, las hembras preñadas fueron expuestas una a cuatro veces. Por lo tanto, en el presente estudio, el estrés prenatal aplicado corresponde al último tercio del desarrollo fetal.

La exposición a orina de gato consistió en dejar al animal en una caja (0,30 x 0,40 x 0,25 m) con un soporte de plástico que contenía virutas de madera impregnadas con orina de gato doméstico durante un período de 5 min. Simultáneamente, la inmovilización consistió en colocar cada individuo en sujetar al tuco-tuco firmemente con la mano con un paño impregnado con olor de piel de gato para restringir su movimiento y liberarlo intermitentemente durante un período de 2 min. Las muestras de olor se obtuvieron como se detalla en el Capítulo 1. Los animales del grupo C se dejaron en la caja de plástico durante el mismo período de tiempo pero sin exposición a las señales de los predadores. Los efectos fisiológicos y comportamentales de la exposición a las pistas de un predador, ya descritos anteriormente en individuos adultos de *C. talarum* (ver Capítulos 1 y 2), no fueron evaluados en las madres de manera de disminuir la probabilidad de reabsorción de los embriones, aborto de fetos,

o mortalidad de las crías debido al canibalismo o al infanticidio, dos comportamientos comunes en madres bajo estrés.

Camadas y condiciones de alojamiento:

La fecha de nacimiento fue determinada por la observación diaria de las cajas de plástico que contenían a cada hembra preñada. Todas las madres utilizadas en este estudio se encontraban en el último mes de gestación. El tamaño de la camada de las madres Control y Expuestas fue similar (control = 4 ± 0.8 ; expuestas = 3.5 ± 1.6 , test de T, $gl = 13$, $p = 0.64$). Así mismo, el número de crías por camada que sobrevivieron a la edad de 60 días fue similar en los individuos estresados prenatalmente (27 crías sobrevivieron de un total de 33) y en los individuos control (19 crías sobrevivieron de un total de 22). El peso de las crías al nacer fue similar en los grupos C ($10,14 \text{ g} \pm 0,77$) y EPP ($10,67 \text{ g} \pm 1,75$). Para los experimentos, se utilizaron 25 crías de un total de 15 camadas: 6 controles (C, total de 4 machos y 5 hembras) y 9 EPP (total de 6 machos y 10 hembras). Todas las crías fueron marcadas con tinta para permitir el reconocimiento individual y sexadas en el primer mes. Para los experimentos, dos individuos de cada camada fueron escogidos al azar (con la excepción de las camadas de un individuo). Finalmente, cuando los juveniles alcanzaron los 60 días de edad fueron separados de la madre y colocados en cajas individuales como se describió anteriormente.

Procedimiento experimental: entre los 70 y 120 días de edad (estadio juvenil), se realizaron una serie de experimentos destinados a evaluar: A) las respuestas comportamentales, B) inmunológicas y C) fisiológicas al estrés causado por las pistas del predador al cual fueron sometidos prenatalmente, según se explica a continuación y se puede observar en la representación de la Figura 1.

Experimentos:

A) Respuesta comportamental (Fig. 1A):

Tests de ansiedad:

El desempeño de los juveniles de los grupos C y EPP fue evaluado en dos tests usados comúnmente para evaluar el comportamiento exploratorio y el estado de ansiedad en roedores estresados prenatalmente: el dispositivo de campo abierto (Abe

et al. 2007, Götz y Stefanski 2007, Baker *et al.* 2008, Mashoodh *et al.* 2009) y el laberinto en cruz elevado (Estanislau y Morato 2005, Götz y Stefanski 2007, Baker *et al.* 2008, Laloux *et al.* 2012: ver Capítulo 1 por detalles). En este caso, en el dispositivo de campo abierto, se determinaron: distancia total recorrida (cm), tiempo en movimiento (% tiempo total), tiempo transcurrido en el centro (cuadrados B2 a B4, C2 a C4 y D2 a D4), tiempo rascando las paredes y número de levantamientos (cuerpo erguido). Los experimentos se llevaron a cabo cuando los individuos tuvieron 70 y 72 días de edad, respectivamente (Fig. 1A).

Señales del predador y test de ansiedad:

A los 120 días de edad, todos los tuco-tucos (grupos C y EPP) fueron expuestos a estrés por predador (2 min de inmovilización con un paño impregnado con olor de la piel de gato) para evaluar si la respuesta comportamental de los individuos expuestos o no a estrés por predador durante la gestación maternal es similar cuando se somete a estrés en la edad juvenil. Después de 30 minutos de la exposición, se evaluó el comportamiento de los animales en el laberinto en cruz elevado (Fig. 1A).

B) Respuesta inmune (Fig. 1B):

Desafío con SRBC (glóbulos rojos de oveja): para evaluar la función inmune adaptativa en tuco-tucos juveniles (77 días), cada animal de los grupos C y EPP se inyectó intraperitonealmente con el antígeno no patogénico SRBC (glóbulos rojos de oveja, Fitzgerald, suspensión al 10%, $1,5 \mu\text{L} \text{ g}^{-1}$ de peso corporal). Luego de siete días, se inyectaron nuevamente con SRBC (refuerzo), siguiendo un protocolo previamente desarrollado para *C. talarum* por Cutrera y colaboradores (2010). Luego de una semana, se estimó la respuesta inmune mediante los títulos medios de anticuerpos contra este antígeno detectado en ensayos de hemoaglutinación utilizando microplacas de 96 pocillos. Inmediatamente después de la colecta, la sangre se mantuvo a 4°C hasta que se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 15 minutos, luego se separó el plasma y se calentó a 56°C durante 30 minutos para inactivar el complemento. El plasma se guardó a -20°C hasta que se utilizó en el ensayo de hemoaglutinación. Se añadieron 20 μL de plasma inactivado por calor a 20 μL de PBS en el primer pocillo de la placa; se llevaron a cabo

diluciones en serie en PBS (1: 2-1: 256) seguidas por la adición de 20 μl de una suspensión al 1% de SRBC a cada pocillo. Las placas se agitaron suavemente durante 1 min y después se incubaron a 37^o C durante una hora. Después de eso, las placas se mantuvieron a 4^o C durante 2 hs antes de realizar el examen macroscópico para la aglutinación. A efectos comparativos, los títulos de anticuerpos se expresaron como el log2 negativo (-log2) de la concentración plasmática mínima que contenía suficiente anticuerpo para aglutinar el SRBC antigénico. Además, el análisis de un grupo control adicional (n = 6), compuesto por otros individuos de las mismas camadas inyectadas intraperitonealmente con solución estéril de buffer fosfato salino (PBS, 1,5 $\mu\text{L/g}^{-1}$ de peso corporal) confirmó que los juveniles no presentan anticuerpos sin haber sido previamente expuestos al antígeno (Fig. 1B).

Desafío con PHA (fitohemaglutinina): para evaluar la respuesta inflamatoria de los juveniles, se utilizó una de las técnicas más comúnmente utilizadas: la prueba cutánea de fitohemaglutinina (PHA). PHA es una lectina vegetal que desencadena una respuesta inflamatoria local que en tuco-tucos está mediada tanto por componentes de la inmunidad adaptativa así como la innata (Merlo *et al.* 2014). Antes de la inyección con PHA, se midió el grosor de cada pata trasera con un micrómetro. A continuación, se inyectó subcutáneamente cada individuo (91 días de edad) en el empeine del pie posterior izquierdo con solución estéril de buffer fosfato salino (PBS, 0.3 $\mu\text{L/g}$ de peso corporal) y en el pie posterior derecho con PHA (*Phaseolus vulgaris* PHA Sigma L-8754 disuelto en PBS, 3 mg/ml, 0.3 $\mu\text{L/g}$ de masa) usando una aguja 30G, metodología descrita previamente por Merlo (2014). La magnitud de la inflamación se midió 24 horas después de la inyección. Finalmente, se determinó la respuesta de PHA o PBS como la diferencia entre el grosor pre y la post-inyección dividido por el grosor inicial del pie (respuesta = (post-pre) / pre) (Fig. 1B).

Determinación del perfil leucocitario: el perfil leucocitario se utilizó para evaluar las defensas inmunitarias innatas en los juveniles (Fig. 1B), en forma similar a lo previamente realizado en adultos de *C. talarum* (Cutrera *et al.* 2010, Schleich *et al.* 2015). Se determinó la abundancia de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos, (en base a la examinación de un total de 200 leucocitos) utilizando un

microscopio a 1000x, a partir de frotis de sangre fijados en metanol al 70% durante 10 min y teñidos con May-Grunwald-Giemsa. Todos los tipos de leucocitos se identificaron de acuerdo con sus características morfológicas siguiendo las descripciones de Voigt (2000) en vertebrados y Vera *et al.* (2008) para *C. talarum*. Para calcular la abundancia total de leucocitos, se registró el número de leucocitos encontrados en 30 campos en los que había una sola capa de eritrocitos (~20.000 eritrocitos, R. Zenuto, datos no publicados) y se estandarizaron a 100.000 eritrocitos con fines comparativos.

C) Respuesta fisiológica al estrés (Fig. 1C):

Para evaluar el efecto del estrés prenatal sobre los parámetros fisiológicos, a los 91 días de edad se obtuvieron muestras de sangre de cada uno de los juveniles de ambos grupos (EPP y C) para la determinación de las concentraciones de cortisol, los niveles de glucosa en sangre y la relación neutrófilos/linfocitos (N/L) (Fig. 1C). Luego los individuos fueron expuestos a un factor de estrés puntual para evaluar la respuesta de ambos grupos al estrés. Para ello, los tuco-tucos se sometieron a inmovilización con la metodología explicada en Vera *et al.* (2008): cada individuo se mantuvo firmemente durante un período de 2 min en un aparato de retención formado por dos rejillas de alambre paralelas (espaciadas 3,5 cm) que les impedía hacer cualquier tipo de movimiento. Luego, se obtuvieron muestras de sangre para medir las concentraciones de cortisol, los niveles de glucosa en sangre y la relación N/L de todos los individuos después de la inmovilización (1 hora), ya que los niveles de cortisol aumentan significativamente a los 30-60 minutos en tuco-tucos sometidos a este estrés agudo (Vera *et al.* 2011). En dos grupos control adicionales (no sujetos a inmovilización), se encontró que los individuos no mostraron incremento en los niveles de cortisol plasmático después de 3 hs (n = 7, p = 0.250) y 4 hs (n = 6, p = 0.959) debido al procedimiento de extracción de sangre. Por lo tanto, los niveles de cortisol muestreados 4 hs más tarde (pero 1 h después de la inmovilización) revelaron la respuesta a la inmovilización y no al muestreo de sangre antes del tratamiento.

Finalmente, los valores de cortisol plasmático, los niveles de glucosa en sangre y la proporción de neutrófilos/linfocitos se obtuvieron siguiendo la metodología detallada previamente (Capítulo 1).

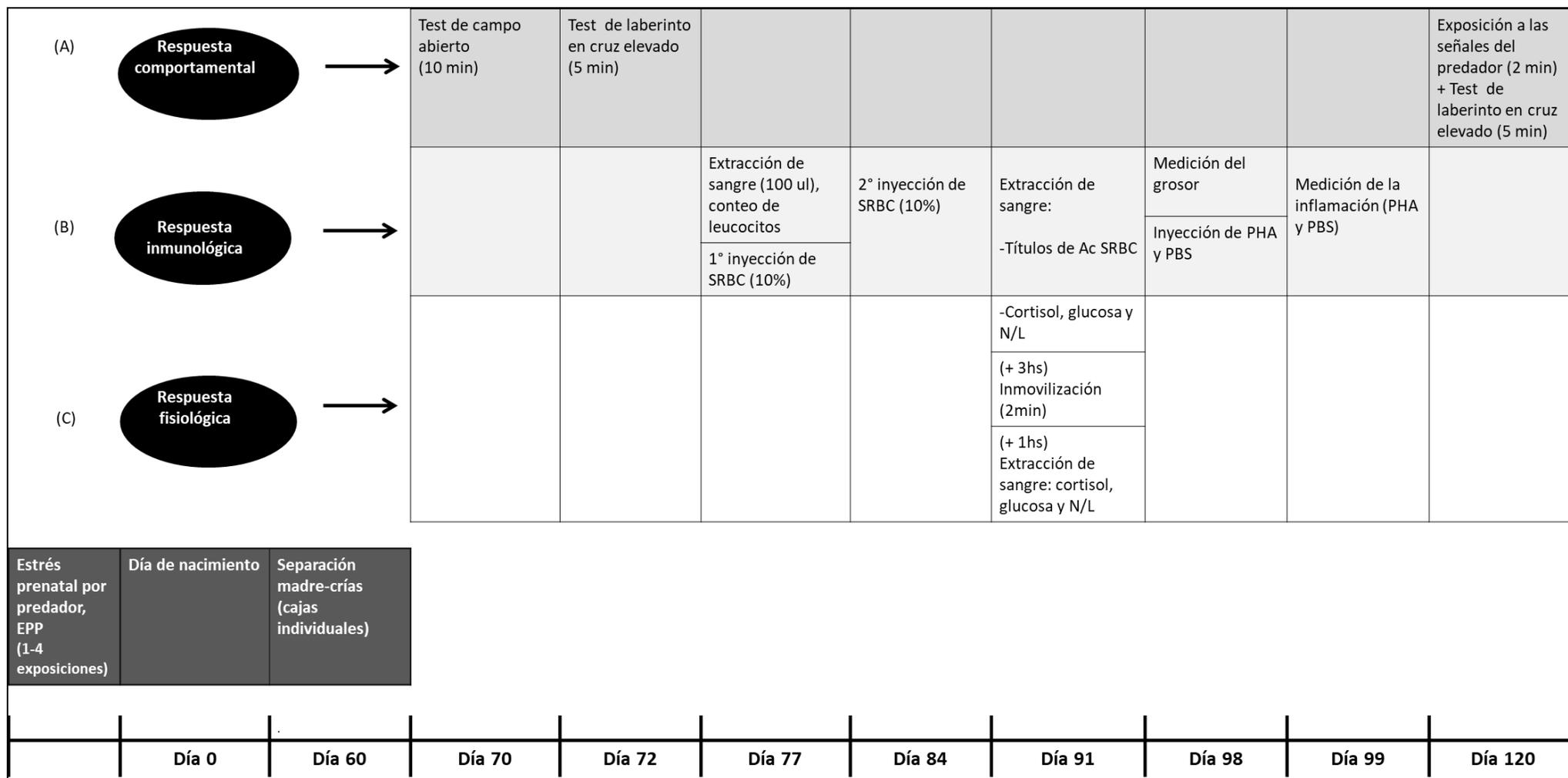


Fig. 1. Línea de tiempo de los procedimientos experimentales para evaluar las respuestas comportamentales (A), inmunológica (B) y (C) fisiológica.

Análisis estadístico

Todas las comparaciones estadísticas involucraron una estructura anidada en la que se realizaron mediciones en individuos juveniles que se desarrollaron en camadas de una misma hembra. Además, las comparaciones que implicaban la medición de los mismos individuos en diferentes ocasiones añadieron una estructura de medidas repetidas al análisis. Así, las diferencias en las respuestas a los tratamientos experimentales se evaluaron mediante ANOVA anidados y de medidas repetidas usando la biblioteca "nlme" (Pinheiro *et al.* 2014) en R (R Core team 2017). Para verificar la normalidad y la homocedasticidad de los residuales en ANOVA realizamos las pruebas de Shapiro y Levene, respectivamente. En los pocos casos en los que estos supuestos no se cumplieron los datos fueron transformados con raíz cuadrada. El sexo de los juveniles no se consideró como un factor en el análisis debido al número bajo y desigual de machos y hembras en cada grupo (control y tratamiento). Además, trabajos previos en adultos de *C. talarum* mostraron que los parámetros comportamentales y fisiológicos no difirieron entre machos y hembras después de la exposición a los olores de los predadores (Capítulo 1, Brachetta *et al.* 2015).

RESULTADOS

Respuesta comportamental:

Estrés prenatal por predador y test de ansiedad:

Dispositivo de campo abierto: la exposición prenatal a los olores del predador disminuyó el porcentaje de tiempo en movimiento (ANOVA anidado, $gl = 13$, $t = -2.30$, $p = 0.038$, Fig. 2A) y la distancia total recorrida en los juveniles expuestos ($gl = 13$, $t = -2.77$, $p = 0.016$; Fig. 2B). El tiempo transcurrido en el centro ($gl = 13$, $t = -0.89$, $p = 0.386$, Fig. 2C), el tiempo rascando las paredes ($gl = 13$, $t = 0.83$, $p = 0.418$, Fig. 2D) y el número de levantamientos ($gl = 13$, $t = -1.40$, $p = 0.184$; Fig. 2E) no difirieron significativamente entre los grupos C y EPP.

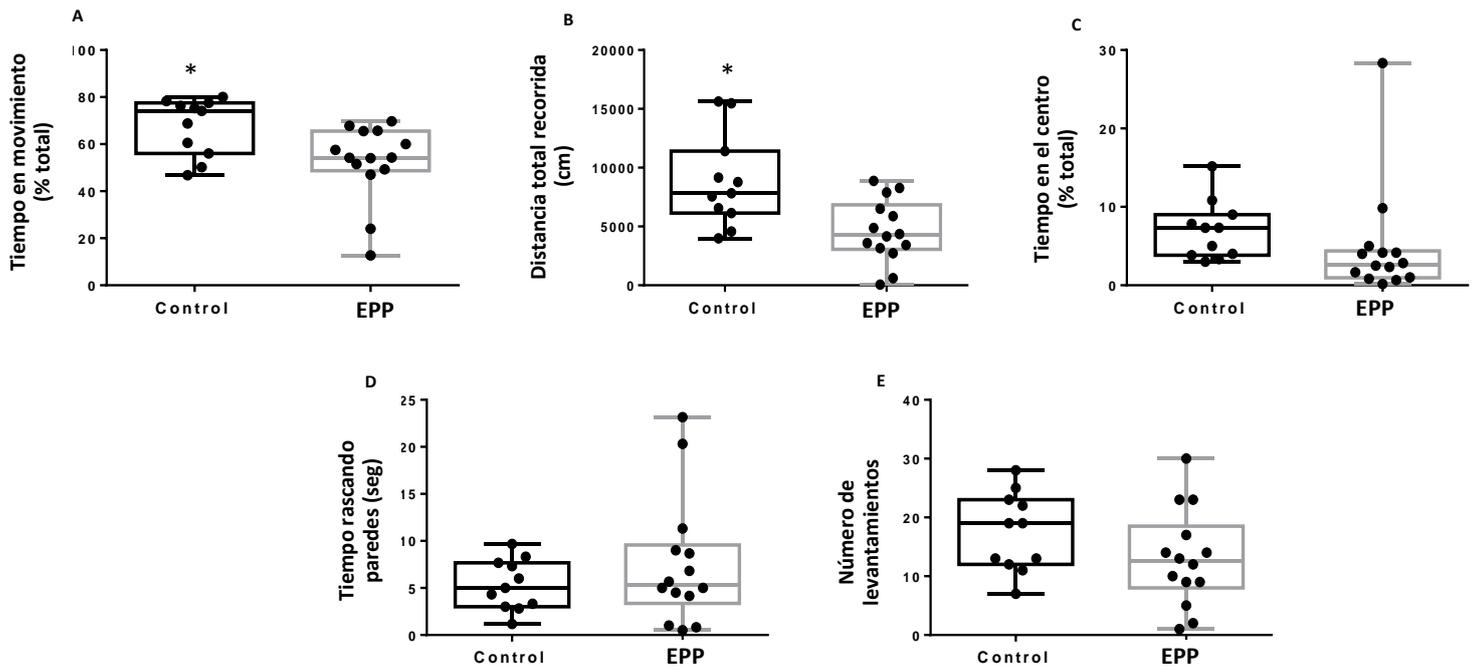


Fig. 2: Box plot representando el tiempo en movimiento (% del tiempo total) (A), la distancia total recorrida (cm) (B), el tiempo de permanencia en el centro (% total de tiempo) (C), tiempo rascando las paredes (s) (D) y número total de levantamientos (E) de los grupos Control y EPP en la prueba de campo abierto. Las barras indican rango máx-mín.

Laberinto en cruz elevado: los juveniles estresados prenatalmente mostraron una clara disminución en el tiempo de permanencia (ANOVA anidado, $gl = 13$, $t = -4.43$, $p < 0.001$, Fig. 3A) y el número de entradas (ANOVA anidado, $gl = 13$, $t = -2.46$, $p = 0.028$, Fig. 3B) a los brazos transparentes en el laberinto en cruz elevado. La distancia recorrida (ANOVA anidado, $gl = 13$, $t = -1.03$, $p = 0.319$, Fig. 3C), el número de entradas totales a los brazos ($gl = 13$, $t = -0.04$, $p = 0.965$, Fig. 3D) y el tiempo rascando paredes en los brazos transparentes ($gl = 13$, $t = -0.71$, $p = 0.486$, Fig. 3E) no difieren entre los grupos EPP y C.

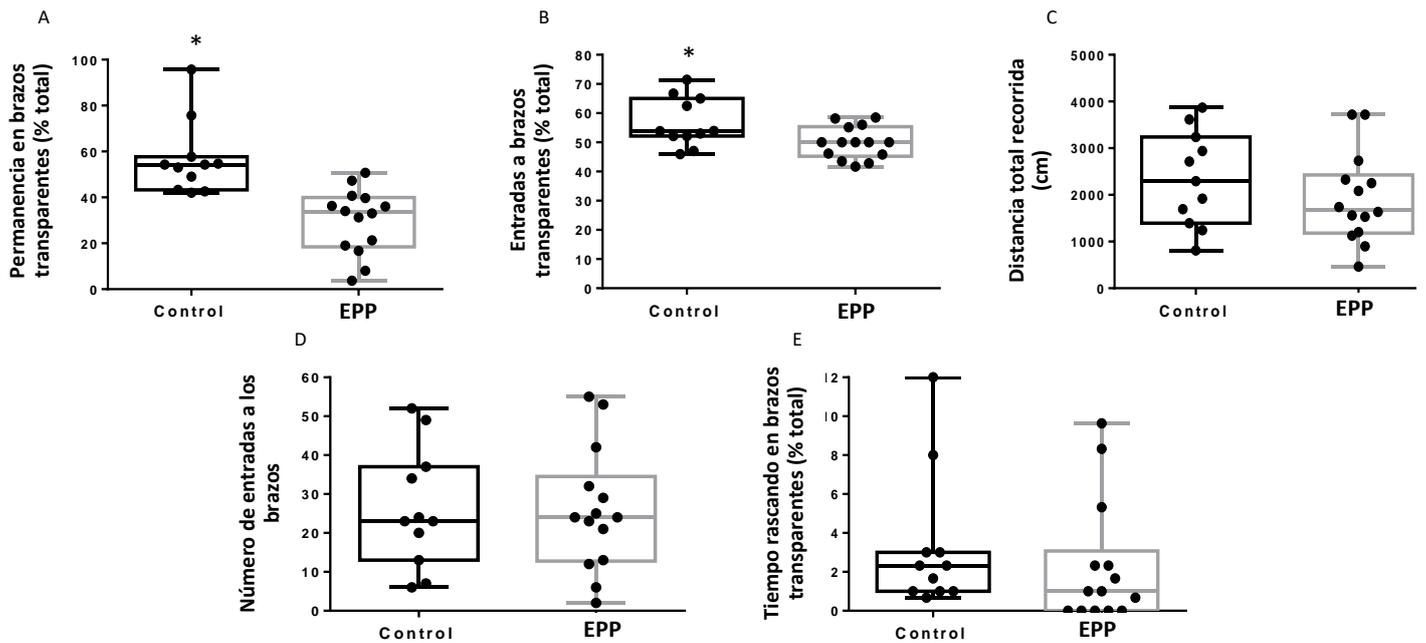


Fig. 3: Box plot representando permanencia en brazos transparentes (% del tiempo total) (A), número de entradas a brazos transparentes (% tiempo total) (B), distancia total recorrida (cm) (C), número total de entradas a los brazos (D) y el tiempo rascando paredes en los brazos transparentes (% del tiempo total) (E) de los grupos control y EPP en el laberinto en cruz elevado. Las barras indican rango máx-mín.

Señales del predador y test de ansiedad:

La comparación de los grupos C y EPP luego de la exposición a estrés por predador reveló que los juveniles del grupo EPP permanecieron menos tiempo (ANOVA anidado, $gl = 13$, $t = -3.33$, $p = 0.005$, Fig. 4A) e ingresaron menos veces ($gl = 13$, $t = -2.33$, $p = 0.036$; Fig. 4B) a los brazos transparentes del laberinto elevado en comparación con el grupo control (C). La distancia recorrida (ANOVA anidado, $gl = 13$, $t = -0.96$, $p = 0.350$, Fig. 4C), el número de entradas totales a los brazos ($gl = 13$, $t = 0.35$, $p = 0.729$, Fig. 4D) y el tiempo rascando paredes ($gl = 13$, $t = -1.41$, $p = 0.181$, Fig. 4E) en los brazos transparentes no difieren entre ambos grupos.

En comparación con los valores obtenidos previamente para el mismo grupo (juveniles a los 72 días de edad), los individuos del grupo control mostraron una disminución en el tiempo de permanencia (RM ANOVA, $gl = 10$, $t = -3.25$, $p = 0.008$, Fig. 4A) y en el número de entradas a los brazos transparentes (RM ANOVA, $gl = 10$, $t = -2.31$, $p = 0.043$, Fig. 4B) luego de haber sido sometidos al factor de estrés. No se observaron diferencias en la distancia recorrida (RM ANOVA, $gl = 10$, $t = -1.64$, $p = 0.13$,

Fig. 4C), número de entradas totales a los brazos (RM ANOVA, $gl = 10$, $t = -0.46$, $p = 0.65$, Fig. 3E). De manera similar, los individuos del grupo EPP permanecieron (RM ANOVA, $gl = 13$, $t = -1.97$, $p = 0.043$, Fig. 4A) y entraron menos veces (RM ANOVA, $gl = 13$, $t = -3.48$, $p = 0.06$; Fig. 4B) a los brazos transparentes luego de la exposición al estrés por predador en comparación con su respuesta comportamental anterior en el laberinto elevado, mientras que no se observaron diferencias en la distancia total recorrida (RM ANOVA, $gl = 13$, $t = -1.31$, $p = 0.21$, Fig. 4C), el número de entradas totales a los brazos (RM ANOVA, $gl = 13$, $t = -0.97$, $p = 0.34$, Fig. 4D) y el tiempo rascando las paredes (RM ANOVA, $gl = 13$, $t = -2.45$, $p = 0.12$, Fig. 4E).

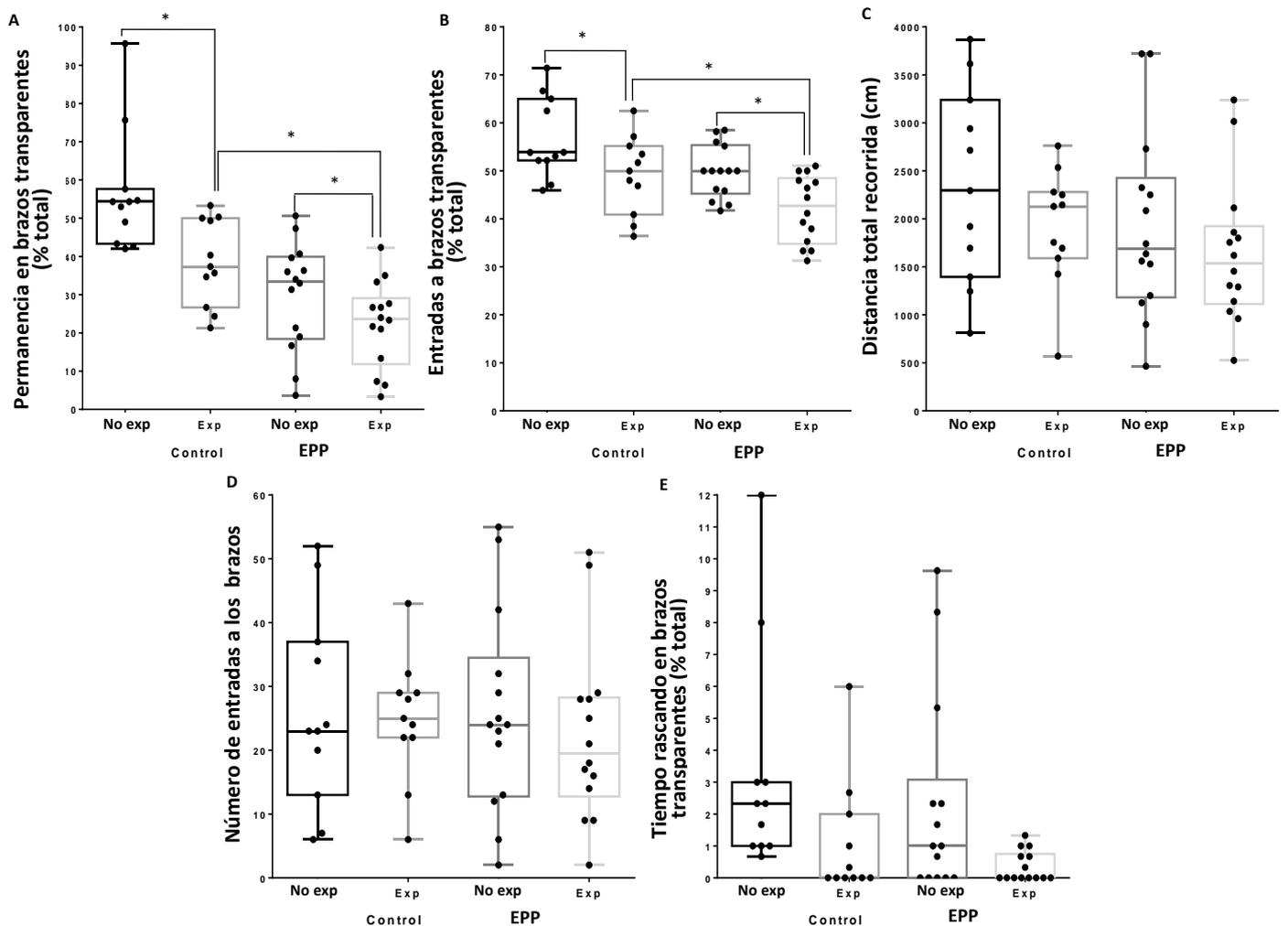


Fig. 4: Box plot representando la permanencia en brazos transparentes (% del tiempo total) (A), número de entradas a los brazos transparentes (% del tiempo total) (B), distancia total recorrida (cm) (C) y el tiempo rascando las paredes en los brazos transparentes (% del tiempo total) (E) de los grupos Control y EPP (no expuestos -72 días de edad- y expuestos -120 días de edad- a señales del predador) en el laberinto en cruz elevado. Las barras indican rango máx-mín.

Respuesta inmune

Desafío con SRBC (glóbulos rojos de oveja): los títulos de anticuerpos contra glóbulos rojos ovinos (SRBCs) no difieren significativamente entre animales EPP y C (ANOVA anidado, $gl = 13$, $t = -0.83$, $p = 0.420$, Fig. 5A).

Desafío con PHA (fitohemaglutinina): no se observaron diferencias significativas entre la respuesta inflamatoria 24 hs después de la inyección con PHA entre los juveniles de los grupos C y EPP (ANOVA anidado, $gl = 13$, $t = -0.68$, $p = 0.514$, Fig. 5B).

Determinación del perfil de leucocitario: no se observaron diferencias en las cantidades de linfocitos y neutrófilos, los dos tipos de leucocitos de mayor importancia numérica, entre los grupos control y EPP (ANOVA anidado, $gl = 13$, $t = -0.71$, $p = 0.759$, $gl = 13$, $t = 0.55$, $p = 0.588$, respectivamente, Fig. 5C, D).

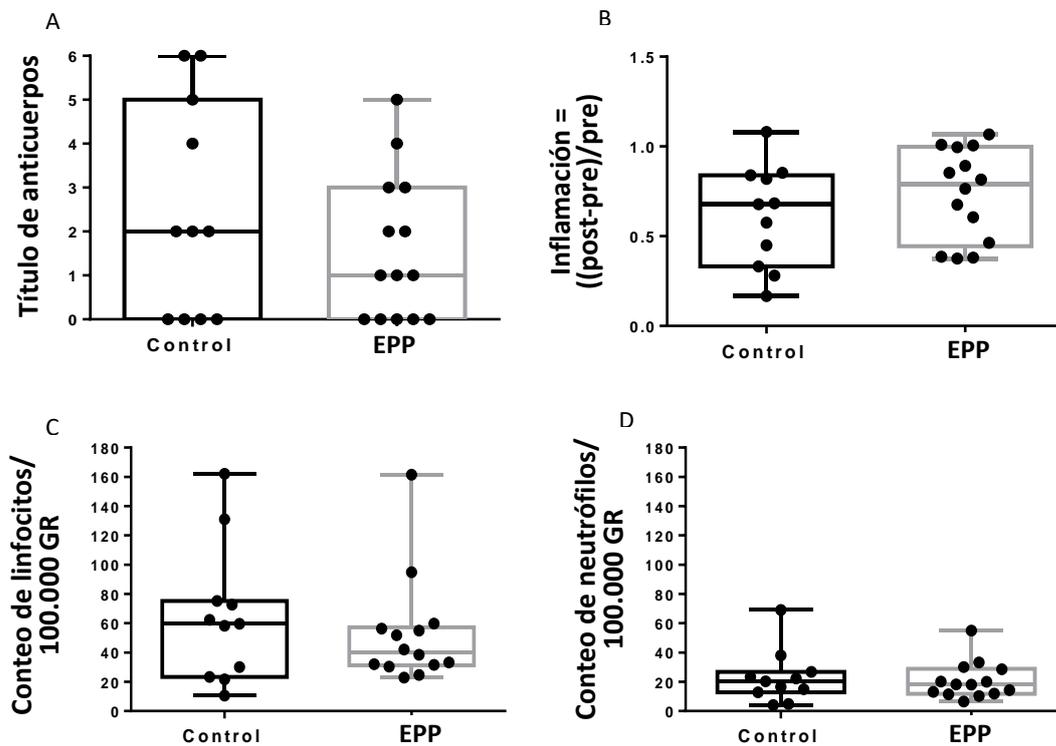


Fig. 5: Box plot representando los títulos de anticuerpos contra los glóbulos rojos de oveja (SRBC) (A), inflamación de la pata luego de la inyección con PHA (B), y conteo de linfocitos (C) y neutrófilos (D) en relación a 100.000 glóbulos rojos en juveniles de tuco-tucos Control y EPP. Las barras indican rango máx-mín.

Respuesta fisiológica al estrés

Antes de ser expuestos a inmovilización, la relación N/L (ANOVA anidado, $gl = 13$, $t = -1.17$, $p = 0.260$, Fig. 6A), los valores de glucosa en sangre (ANOVA anidado, $gl = 13$, $t = 2.01$, $p = 0.065$, Fig. 6B) y los niveles de cortisol (ANOVA anidado, $gl = 13$, $t = -0.66$, $p = 0.517$, Fig. 6C) fueron similares entre los individuos de los grupos EPP y C.

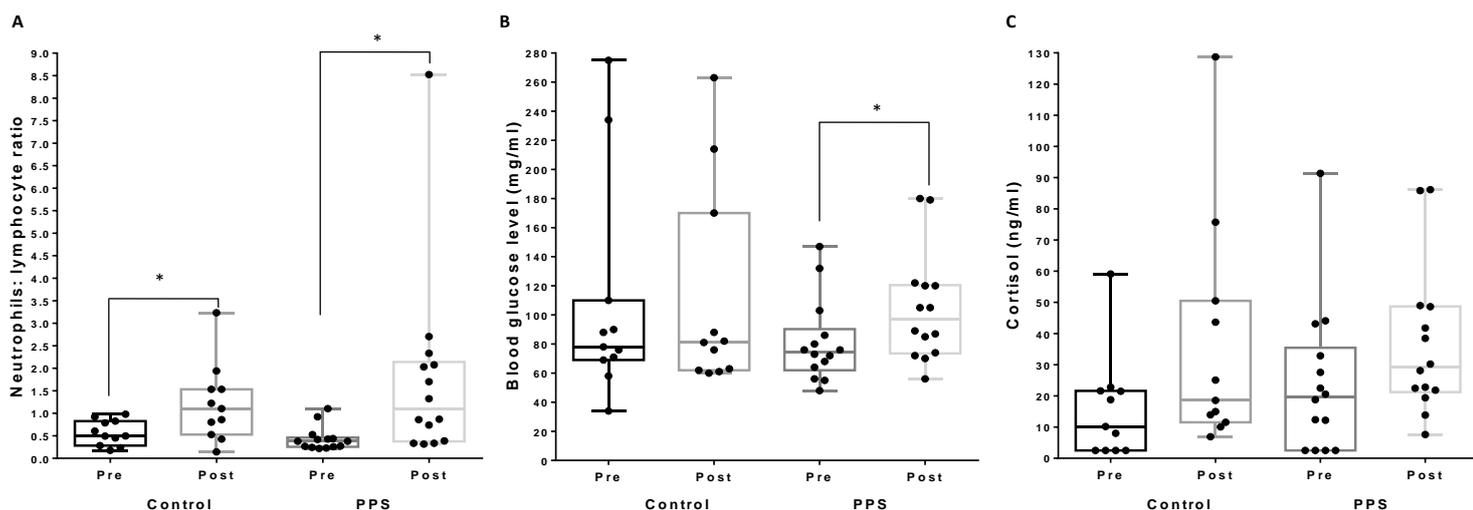


Fig. 6: Box plot representando la relación neutrófilos/linfocitos (A), niveles de glucosa en sangre (mg/ml) (B) y niveles de cortisol plasmático (ng/ml) antes y después del período de estrés (inmovilización) en los grupos control y estresados prenatalmente (EPP). Las barras indican rango máx-mín.

La comparación de los individuos del grupo control antes y después de la exposición a la inmovilización reveló un incremento en la relación N/L después de la aplicación del estresor (ANOVA anidado, $gl = 10$, $t = 2.91$, $p = 0.01$, Fig. 6A), mientras que no se observaron diferencias en los niveles de glucosa y cortisol (ANOVA anidado, $gl = 10$, $t = 0.5$, $p = 0.62$, $gl = 10$, $t = -0.98$, $p = 0.34$, respectivamente, Fig. 6B y C). En cuanto al grupo EPP, la inmovilización causó incrementos en la relación N/L y en los niveles de glucosa en sangre (ANOVA anidado, $gl = 13$, $t = 2.57$, $p = 0.02$, $df = 13$, $t = 3.75$, $p = 0.002$ respectivamente, Fig. 6A y B), mientras que no se detectaron diferencias en los niveles de cortisol antes y después del tratamiento (ANOVA anidado, $gl = 13$, $t = 1.00$, $p = 0.33$, Fig. 6C).

Finalmente, luego de la exposición al factor de estrés puntual, la relación N/L (ANOVA anidado, $gl = 10$, $t = -0.22$, $p = 0.559$, Fig. 6A), los valores de glucosa en sangre

($gl = 13$, $t = 0.59$, $p = 0.823$, Fig. 6B) y los niveles de cortisol ($gl = 13$, $t = 0.05$, $p = 0.958$; Fig. 6C) fueron similares entre los grupos.

DISCUSIÓN

En mamíferos, numerosos estudios han demostrado los efectos perjudiciales del estrés prenatal en el desarrollo comportamental y fisiológico de la descendencia (Vallee *et al.* 1997, Kapoor y Matthews 2005, Sheriff *et al.* 2009b). Los eventos estresantes durante la preñez pueden estar asociados con resultados negativos en la descendencia, tales como el bajo peso al nacer, la baja tasa de supervivencia (Brunton y Russell 2010), y aumento de la ansiedad (Vallee *et al.* 1997, Brunton y Russell 2010). Sin embargo, estudios recientes sugieren que algunos de los efectos maternos pueden ser adaptativos y estar relacionados con el aumento en la supervivencia y el éxito reproductivo de la descendencia, pero a costa de un riesgo potencialmente mayor de enfermedad en la adultez como las asociadas al desorden cardio-metabólico o la disfunción neuroendócrina (Schöpfer *et al.* 2012). En los últimos años, los trabajos experimentales con roedores cambiaron su enfoque al análisis de exposiciones prenatales a factores estresantes ecológicos y ambientales (Love *et al.* 2013, Sheriff y Love 2013). Uno de los factores más relevantes en relación con estos estresores es el riesgo de predación. En este trabajo expusimos hembras preñadas de *C. talarum* a señales de predadores (olores de pelaje/piel e inmovilización) y luego evaluamos las respuestas comportamentales, fisiológicas e inmunológicas de sus descendientes a la edad de dispersión natal.

Los resultados de nuestro estudio mostraron que la exposición prenatal a pistas de un predador afecta claramente la respuesta comportamental de los juveniles en ambos paradigmas de comportamiento utilizados. El análisis comportamental de la prueba de campo abierto reveló que en tuco-tucos juveniles (70 días de edad) cuyas madres fueron sometidas a pistas de un predador durante el período gestacional (EPP) disminuyó el porcentaje de tiempo en movimiento y la distancia total recorrida en el campo abierto. Cabe destacar que este efecto detectado en los juveniles expuestos prenatalmente es consistente con el observado en tuco-tucos adultos a los cuales se los

somete directamente a esas pistas, una disminución en el porcentaje de tiempo en movimiento en el campo abierto en presencia de señales predatorias (olor de orina o piel/pelaje de gato; Capítulo 1). También, se observaron respuestas similares en otras especies de roedores. Por ejemplo, las crías macho de cobayos (*Cavia aperea f.*) de madres expuestas a estrés maternal crónico mostraron una disminución en la actividad en comparación con los controles en la prueba de campo abierto (Emack *et al.* 2008). En concordancia, los resultados de la prueba de laberinto en cruz elevado revelaron que los juveniles de *C. talarum* bajo estrés prenatal mostraron una clara disminución en el tiempo de permanencia y el número de entradas a los brazos transparentes. Por lo tanto, los tuco-tucos juveniles expuestos a una situación amenazante durante su período gestacional tienden a evitar los brazos abiertos, mostrando una clara preferencia por las áreas protegidas. En tuco-tucos adultos también se observaron resultados similares en el laberinto en cruz elevado (Capítulo 1). Resultados similares se encontraron en otras especies de roedores prenatalmente expuestas a diversos factores de estrés. Por ejemplo, Estanislau y colaboradores (2005) encontraron que ratas prenatalmente sometidas a choques eléctricos mostraron una reducción en la exploración de los brazos abiertos en el laberinto en cruz elevado. En otro estudio, las crías de madres expuestas a un predador (gato) durante la preñez, mostraron un menor número de entradas totales a los brazos, entraron con menos frecuencia y permanecieron menos tiempo en los brazos abiertos que el grupo de control (Patin *et al.* 2005). Por lo tanto, tomando los resultados observados en conjunto, tanto en el laberinto elevado como en los ensayos en campo abierto, queda claro que la exposición prenatal de tuco-tucos a señales indicativas de la presencia de un predador natural desencadena en la descendencia un estado de ansiedad y la clara aparición de comportamientos anti-predatorios, como la disminución de las actividades locomotoras y exploratorias.

Muchos estudios mostraron el impacto del estrés maternal durante la gestación sobre la función inmune en la descendencia. Una experiencia estresante en este período puede perturbar el ambiente fetal y, por lo tanto, afectar el desarrollo inmune postnatal. Por ejemplo, trabajos experimentales que evaluaron las consecuencias del estrés durante el período gestacional, mostraron efectos inhibitorios en los procesos inmunológicos de la descendencia debido a una disminución del número de linfocitos

en sangre. En un estudio de respuestas inmunológicas en ratas, Götz y colaboradores (2007) demostraron que los machos expuestos prenatalmente a un factor de estrés psicosocial presentaban un número menor de neutrófilos, monocitos, linfocitos T y células NK y una proliferación linfocitaria reducida en relación a los individuos no estresados prenatalmente. Además, Toumi y colaboradores (2013) demostraron que las crías de ratas Wistar estresadas prenatalmente mostraron una disminución de leucocitos y linfocitos totales junto con monocitos y granulocitos, aunque en este caso los cambios observados fueron dependientes del sexo. En el presente estudio, encontramos que una situación estresante experimentada por la madre durante la preñez no modificó el número de linfocitos y neutrófilos en juveniles de *C. talarum*. Además, la respuesta humoral de los juveniles fue similar entre los grupos EPP y C, ya que los títulos de SRBC no difirieron significativamente entre ellos. Resulta interesante destacar que los tuco-tucos juveniles montaron una menor respuesta de anticuerpos contra SRBC en comparación con las respuestas reportadas para adultos de esta especie (Cutrera *et al.* 2010), lo cual puede ser atribuido a la inmadurez del sistema inmune de las crías. Independientemente de esto, las crías estresadas prenatalmente son claramente capaces de responder a un desafío inmunológico que desencadena una respuesta adaptativa durante la edad de dispersión, cuando los individuos juveniles suelen estar expuestos a diversos patógenos y lesiones, lo que puede causar graves consecuencias para su salud.

Con respecto a los mecanismos implicados en la regulación de la inflamación, se sabe que este proceso fisiológico es particularmente susceptible a los efectos de estrés prenatal, aunque no se puede establecer un patrón de respuesta definido (Veru *et al.* 2014). Por ejemplo, Vanbesien-Mailliot y colaboradores (2007) demostraron que el estrés prenatal causado por la restricción aumenta el estado pro-inflamatorio en ratas, ya que la estimulación *in vitro* con fitohemaglutinina (PHA) dió como resultado una respuesta de mayor proliferación de linfocitos T y secreción de IFN γ (interferón gama), un tipo de citoquina producida por los linfocitos T y NK. Por otro lado, los juveniles estresados prenatalmente presentaron respuestas de citoquinas celulares significativamente menores comparadas con controles no estresados (Coe *et al.* 2002). En nuestro caso, se evaluó la respuesta inmune mediada por células utilizando la prueba cutánea de fitohemaglutinina (PHA). Los resultados mostraron que la respuesta

inflamatoria 24 hs después de la inyección con PHA fue similar entre los juveniles de los grupos C y EPP. Tomando en cuenta el resultado del desafío de los SRBCs, es evidente que los procesos inmunológicos de los juveniles no parecen haber sido afectados por la exposición maternal al estrés por predador. Se sabe que los resultados obtenidos en animales bajo estrés maternal pueden depender de la naturaleza del factor estresante, de la duración del estrés, de la intensidad y persistencia del estresor, de la edad (Tuchscherer *et al.* 2002, Vanbesien-Mailliot *et al.* 2007), así como el sexo de los animales (Bakker *et al.* 1998). Además, los efectos inmunes del estrés prenatal pueden depender del tiempo del período gestacional en el que ocurre el estrés (Coe *et al.* 1999). Por lo tanto, se requieren más estudios, teniendo en cuenta algunos de estos factores mencionados previamente, para comprender plenamente las consecuencias de las exposiciones prenatales a situaciones estresantes sobre el sistema inmune de esta especie de roedor subterráneo.

Con respecto al estado fisiológico en los juveniles de *C. talarum* y su variación durante la respuesta a estrés, los juveniles de esta especie fueron expuestos a un factor de estrés puntual (inmovilización). Previo a la exposición, encontramos que los valores de glucosa en sangre, la relación N/L y los niveles de cortisol plasmático no difirieron entre los juveniles C y EPP, indicando que el estrés prenatal no afectó los parámetros fisiológicos asociados con el estrés en la descendencia. En primera instancia, estos resultados pueden ser atribuidos a la acción de la enzima placentaria 11 β HSD2 (11-beta hidroxisteroide deshidrogenasa 2), la cual protege el feto en desarrollo de niveles maternales altos de glucocorticoides (Drake *et al.* 2007). En tuco-tucos adultos expuestos a factores de estrés como el olor de orina o de la piel y la inmovilización con guante, las variaciones en los niveles de cortisol no son tan notorias, incluso cuando se observaron evidentes cambios comportamentales (Brachetta *et al.* 2014, 2015, 2016, Capítulos 1 y 2). Sin embargo, luego de la manipulación endógena de GCs, frente al olor de la piel, -y en mayor medida- a la inmovilización con reja, los tuco-tucos respondieron fisiológicamente mediante la secreción de cortisol (Capítulo 3) y comportamentalmente mediante la aparición de estados de ansiedad, principalmente en los individuos inmovilizados. Sin embargo, la misma no fue tan notoria cuando se incrementó el cortisol plasmático por vía exógena (Capítulo 3).

Los individuos juveniles respondieron a la inmovilización, tanto en los juveniles control como los estresados prenatalmente. Los juveniles control presentaron un incremento en la relación N/L luego de la exposición al factor de estrés puntual, mientras que los juveniles estresados durante la gestación mostraron un aumento similar en la relación N/L y un aumento leve en los niveles de glucosa en sangre. Ninguno de los grupos sufrió variaciones detectables en sus valores de cortisol después de la exposición al estrés. Este resultado se opone a hallazgos previos que indican que los roedores sometidos a estrés prenatal muestran una mayor respuesta del eje HPA al estrés agudo durante las etapas juvenil y adulta (Brunton 2013). Aunque se sabe que la influencia del estrés maternal sobre el eje HPA de la descendencia puede ser altamente dependiente de la etapa de gestación en la cual ocurrió el contacto con los factores de estrés (Kapoor y Matthews 2005), los experimentos previamente realizados (Capítulos 1, 2 y 3) en tuco-tucos adultos mostraron que los parámetros fisiológicos no variaron en forma significativa después de la exposición a orina o a olores de la piel del predador presentados con diferentes intensidades o frecuencias (Brachetta *et al.* 2015, 2016). Por lo tanto, es más probable que esta respuesta baja del HPA en juveniles sea el resultado de una asociación débil entre las respuestas fisiológicas y comportamentales al estrés (exposiciones de señales de predadores) en esta especie de roedor subterráneo, que a un efecto del momento en que se aplicó el factor de estrés.

Aunque varios estudios han proporcionado pruebas que dan cuenta que los factores de estrés que actúan durante la preñez pueden desencadenar efectos a largo plazo en la descendencia, relativamente pocos de ellos han analizado si la exposición al estrés durante el período gestacional también puede alterar la capacidad de las crías para responder a la exposición postnatal a factores de estrés relevantes ecológicamente o a situaciones estresantes como el riesgo de predación. En este trabajo, los tuco-tucos del grupo EPP y C se expusieron a señales de un predador (olor de la piel e inmovilización) a los 120 días de edad y su respuesta comportamental se evaluó en el laberinto en cruz elevado, comparándose estos resultados con los obtenidos en el mismo grupo a los 72 días de edad. El análisis de los parámetros comportamentales mostró que la exposición al estrés predatorio produjo una disminución similar y significativa en el tiempo de permanencia y en el número de entradas a los brazos transparentes del laberinto elevado en los grupos control (no estresados) y estresados

prenatalmente, indicando claramente que las respuestas de estrés de la descendencia no fueron influenciadas por el estrés prenatal. En este punto, debe tenerse en cuenta que aunque la respuesta general al estrés por predación fue similar en ambos grupos, los individuos estresados prenatalmente mostraron mayores niveles de ansiedad que los controles, caracterizados por una evitación activa del espacio abierto (menor número de entradas y tiempo en los brazos transparentes). Así, los individuos expuestos prenatalmente a señales de un predador muestran adaptaciones comportamentales que contribuyen a evitar a los predadores en la vida adulta. Por lo tanto, la exposición maternal al riesgo de predación puede resultar en una mejora de la supervivencia de los descendientes cuando en su adultez encuentran un predador natural. Sin embargo, si el ambiente postnatal cambia o el riesgo predatorio es menor, esta respuesta maternal programada puede representar efectos negativos en la descendencia (Sheriff y Love 2013). En el caso particular de los tuco-tucos, las defensas comportamentales antipredatorias observadas (ocultarse y disminuir la actividad) en los juveniles estresados prenatalmente pueden ser maladaptativas bajo densidades de predadores bajas, cuando disminuir la tasa de alimentación por seguridad (a través de un menor tiempo en superficie colectando la vegetación) puede conducir a una reducción general de la condición física. Este desajuste entre la respuesta comportamental de la descendencia y su ambiente futuro esperado podría finalmente conducir a efectos sobre los ciclos de la población y las comunidades (Love *et al.* 2013). En este punto, sería interesante una extensión de este estudio que considere la incorporación del sexo de las crías como factor de análisis, ya que se ha encontrado que la predación por lechuzas afecta principalmente a tuco-tucos machos subadultos. Esto podría deberse a una mayor exposición de los machos subadultos en la superficie durante la temporada reproductiva, cuando buscan sitios donde establecer sus propias cuevas (Kittlein *et al.* 2001).

En conclusión, este es el primer estudio que investigó las consecuencias del estrés prenatal causado por un estresor ecológico (señales de predadores) sobre el comportamiento, la fisiología y el sistema inmunológico de la descendencia en una especie de roedor silvestre. El presente trabajo muestra claramente la influencia del estrés prenatal en el desarrollo de respuestas comportamentales en la descendencia. Por lo tanto, es interesante que los resultados negativos derivados del estrés prenatal

(por ejemplo, incrementos en la ansiedad) en animales silvestres pueden ser adaptativos y aumenten la supervivencia de los descendientes dependiendo del contexto ecológico (Sheriff y Love 2013). Por otro lado, no se observó un efecto de la exposición al estrés prenatal sobre la respuesta inmune y fisiológica de la descendencia. Las consecuencias del estrés maternal pueden depender de varios factores, como la especie animal, la naturaleza del factor estresante, la duración del estrés, así como la intensidad y la persistencia del factor de estrés (Vanbesien-Mailliot *et al.* 2007). Sin embargo, la evidencia en organismos silvestres es muy limitada, por lo que nuevos estudios en *C. talarum* y otros, contribuirán en mejorar nuestro conocimiento sobre los efectos del estrés prenatal por predación en el desarrollo de las crías y por lo tanto en sus efectos transgeneracionales.



CAPÍTULO 5

Comportamiento de alimentación bajo riesgo
predatorio: influencia del estado nutricional y la
experiencia reciente frente a las pistas de un
predador.

CAPÍTULO 5: COMPORTAMIENTO DE ALIMENTACIÓN BAJO RIESGO PREDATORIO: INFLUENCIA DEL ESTADO NUTRICIONAL Y LA EXPERIENCIA RECIENTE FRENTE A PISTAS DE UN PREDADOR.

INTRODUCCIÓN

Muchas especies animales utilizan el olfato para buscar alimento, mediar interacciones intra e interespecíficas, y para detectar y evitar predadores (Bytheway *et al.* 2005). Señales específicas o pistas producidas por diversos organismos generan medio ambientes ricos en información que los animales pueden utilizar. Entre las pistas más frecuentes se encuentran los productos metabólicos y marcas producidas por los predadores, que pueden ser luego explotados tanto por conspecíficos como por sus presas (Apfelbach *et al.* 2005).

Frente a la presencia de pistas indicativas de la presencia de predadores, las presas han desarrollado una serie de comportamientos antipredatorios que involucran compromisos (o trade-offs) entre costos y beneficios (Kavaliers y Choleris, 2001). Entre estos, la relación entre el comportamiento de forrajeo y el riesgo de predación ha sido una de las más estudiadas. En presencia de predadores en el ambiente, surge el compromiso entre alimentación y seguridad, por lo que las presas restringen el tiempo de búsqueda de alimento, lo limitan a sitios protegidos, o incrementan la vigilancia, impactando así en el éxito de forrajeo y, en consecuencia, en el rendimiento reproductivo y la supervivencia a largo plazo (Lima y Bednekoff 1999, Lima 1998, Brown y Kotler 2004). Así, las decisiones de forrajeo de las presas involucran el balance entre cumplimentar sus requerimientos biológicos y físicos minimizando el riesgo de predación, resultando en una compleja interacción entre el *paisaje del miedo* (Brown *et al.* 1999) y la variación en los recursos disponibles (Searle *et al.* 2008). Como extensión de la “ecología del miedo”, que refiere a los efectos de la predación no relacionados al consumo de las presas (Brown *et al.* 1999), el “paisaje del miedo”, comprende una medida a corto plazo de la forma en que los animales perciben su entorno basado en el análisis de costos y beneficios del compromiso entre la obtención de alimento y la

seguridad asociados con la búsqueda de alimento en áreas específicas del hábitat (Brown *et al.* 1999). Tanto variables biológicas, evolutivas como geográficas se reconocen afectando esta percepción (Bleicher 2017).

La sensibilidad o respuesta al riesgo predatorio se espera que no sea homogénea en la población presa dadas las variaciones en la condición individual y perspectiva de fitness futuro (Brown y Kotler 2004, 2007). Los organismos que se encuentran en buena condición física resultan más sensibles al riesgo, por lo que restringen su forrajeo a sitios seguros y protegidos, mientras que aquellos que presentan compromisos energéticos se manifiestan proclives a tomar riesgos (Kotler 1997, Lima 1998, Suselbeek *et al.* 2014). Esos compromisos energéticos pueden resultar de estados fisiológicos deficientes (alimento insuficiente, sequías, enfermedades), demandantes (parasitismo), condiciones demográficas (competencia intraespecífica) o percepción de recursos limitantes (Bleicher 2017). Por otro lado, un factor clave que podría influenciar la respuesta antipredatoria es la experiencia reciente de un ataque predatorio. Por ejemplo, presas que sobreviven a un ataque es probable que alteren la respuesta de escape durante futuros encuentros con predadores o pistas de la presencia de los mismos (Bateman y Fleming 2014). Sin embargo, pocos trabajos han considerado como los organismos presa modifican sus decisiones de acuerdo a una persecución predatoria previa o frecuente, focalizándose la mayoría de los mismos sobre el efecto de un solo evento predatorio sobre la respuesta comportamental en general o sobre las decisiones de forrajeo en particular (Bateman y Fleming 2014, Lagos *et al.* 2014).

Varios estudios han utilizado a pequeños mamíferos como presas para investigar las respuestas comportamentales y de forrajeo a señales de predador. Combinaciones de comportamiento de evasión, ausencia de movimiento y huida a refugios fueron observados en varias especies de roedores expuestos al olor de un predador – comadreja- (Sundell y Ylonen 2004). Así mismo, el olor de orina altera el comportamiento de forrajeo en liebres *Lepus americanus* (Sullivan *et al.* 1985, Sullivan y Crump 1986) mientras que el pelaje de un gato induce una reducción en el comportamiento de forrajeo y la actividad de ratones *Peromyscus gossypinus* (Capers 2010). Por otro lado, la presencia de heces de un predador disminuye la ingesta en machos del topillo rojo *Clethrionomys glareolus* (Tidhar *et al.* 2007) e incrementa el

evitamiento y la vigilancia durante la alimentación en conejos *Oryctolagus cuniculus* (Monclús *et al.* 2005).

Bajo este marco teórico, *Ctenomys talarum* resulta un excelente modelo para poner a prueba la existencia de compromisos o “trade-offs” entre el forrajeo y el riesgo de predación. Esta especie no solo reconoce señales olfatorias de predadores y genera respuestas antipredatorias (Capítulos 1 y 2), sino que también se vale de información química presente en el suelo -que consiste en exudados producidos por la vegetación- para orientar su forrajeo (Schleich y Zenuto 2007). Así mismo, la mayoría de los eventos predatorios que experimenta esta especie suceden durante excursiones en superficie en búsqueda de alimento, por lo que es altamente esperable una asociación entre el comportamiento de forrajeo y la presencia de señales indicativas de predadores en los sitios de alimentación.

Por lo tanto, el objetivo de este capítulo es evaluar la respuesta comportamental asociada a actividades de alimentación frente a olores derivados de predadores utilizados como indicadores de riesgo potencial de predación en el roedor subterráneo *C. talarum*. Particularmente, se evaluará el comportamiento de alimentación frente a riesgo predatorio (pistas de la presencia de un predador; orina de gato doméstico), considerando la 1) condición nutricional y 2) experiencia reciente de un evento predatorio fallido.

Se predice que los tuco-tucos evaluarán el riesgo predatorio y modificarán su comportamiento de forrajeo de acuerdo a la presencia de señales de predador, su condición física y experiencia previa de encuentros con predadores. Así, la exposición a pistas de predadores causará en individuos de *C. talarum* una disminución en el tiempo alimentándose en cercanías a la fuente de olor de un predador, siendo este efecto más acentuado en individuos que han sufrido previamente una experiencia directa reciente de riesgo predatorio. Por último, los individuos que experimenten una disminución en su condición física causada por restricción nutricional mostrarán una menor evitación del sitio provisto de señales de un predador.

MATERIALES Y MÉTODOS

Captura y mantenimiento de los animales en cautiverio

Se capturaron tuco-tucos adultos de ambos sexos ($n = 74$) entre marzo y septiembre del año 2017. La captura de los animales se realizó en la localidad de Villa Gesell ($37^{\circ}15'19''$ S, $56^{\circ}58'04''$ O, Provincia de Buenos Aires, Argentina). En el bioterio, los animales fueron mantenidos y alimentados en las condiciones mencionadas en el primer capítulo. Luego de finalizar los ensayos todos los animales fueron alimentados *ad libitum* hasta recuperar su peso inicial y finalmente fueron devueltos a su ambiente natural en buenas condiciones de salud.

Señales de predador vs señal de herbívoro

Se utilizó olor de orina de un gato macho adulto como pista del predador (metodología de obtención de las muestras explicada en Capítulo 1). Como control, se utilizó la orina de un organismo no predador (cobayo, *Cavia porcellus*), herbívoro que no representa un desafío por competencia para *C. talarum* y que fue alimentado con pastos naturales, verduras y semillas, evitando alimentos balanceados que pudieran generar productos metabólicos de la digestión de proteína de origen animal. Todas las muestras (virutas impregnadas con orina) fueron recolectadas 24 hs. antes de su utilización en los experimentos, guardadas en bolsas plásticas selladas, y conservadas a -20°C (por un tiempo máximo de 24 hs).

Condición nutricional

Los animales fueron mantenidos en dos condiciones nutricionales diferentes:

- “Ayuno 24hs”: los individuos se alimentaron *ad libitum* durante la semana de aclimatación al cautiverio y luego se implementó un ayuno de 24 hs previo al ensayo comportamental con el fin de motivar la búsqueda de comida y su posterior ingesta durante el experimento.
- “Restricción”: 48hs previo al inicio de los experimentos, los individuos fueron alimentados por única vez controlando la cantidad de alimento (7 a 10 g de batata y 2/3 hojas de lechuga) que, asegurando su hidratación, resultó en una disminución del peso

que correspondía al 80% de su valor inicial (este procedimiento fue utilizado anteriormente en el laboratorio, ver Mastrángelo *et al.* 2009, Brachetta *et al.* 2014).

Experiencia previa de evento predatorio

En este tratamiento, pusimos en juego la experiencia previa inmediata a señales directas de un predador. Para ello, una hora antes del ensayo comportamental los animales se expusieron a las pistas directas de la presencia de un predador natural (gato macho adulto). Así, los individuos fueron expuestos a inmovilización + olor de la piel/pelaje por 2 minutos (las muestras se obtuvieron como se explica en el Capítulo 1), alternando la presión sobre el individuo utilizando una tela impregnada con el olor del pelaje de un gato, con la liberación momentánea del mismo dentro de una caja limpia, similar a la utilizada para albergar a los animales en el bioterio (“Exp. +”). Los individuos control (“Exp. -”) para este tratamiento fueron mantenidos sin inmovilización ni exposición al olor en la caja limpia por el mismo período de tiempo.

Laberinto en Y

El dispositivo experimental consistió en una caja de acrílico transparente (45 cm x 30 cm x 30 cm) y un laberinto de acrílico en forma de Y, con un tubo de entrada (10 cm de diámetro y 12 cm de longitud) conectado a dos brazos opuestos (10 cm de diámetro y 50 cm de longitud, Fig. 1). Previo al inicio de las pruebas, cada individuo se colocó individualmente en la caja correspondiente, durante un periodo de 30 min, para habituarse a ella antes de que comenzara el ensayo. Durante la prueba, esta caja se conectó al laberinto en Y. En el extremo de cada brazo del laberinto se colocó aleatoriamente una muestra de orina del predador o del herbívoro y una cantidad estandarizada de alimento, el pasto dibujante *Panicum racemosum*, la especie vegetal de mayor abundancia en su ambiente natural y en la dieta de los tuco-tucos.

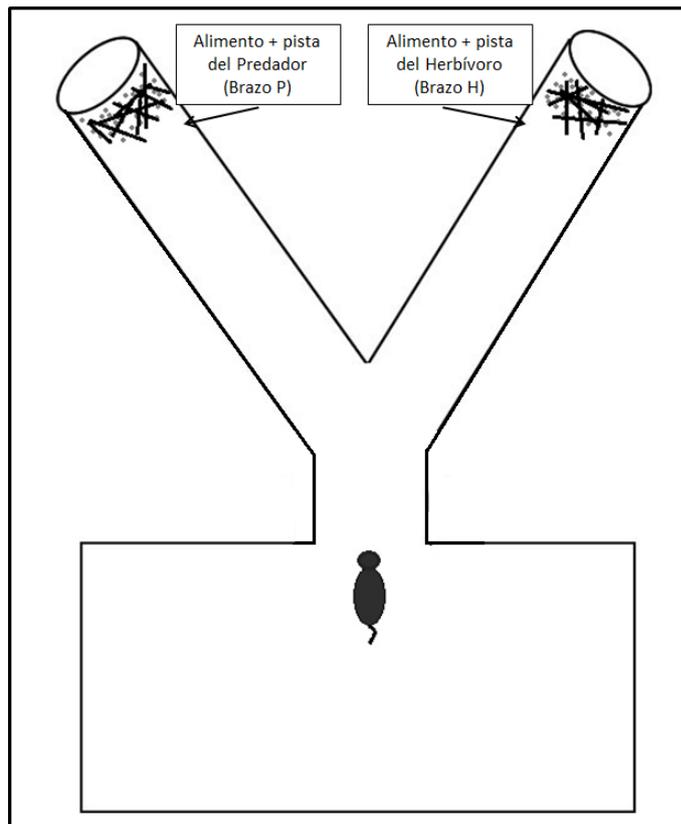


Fig. 1. Diseño del laberinto en Y utilizado para evaluar la respuesta comoportamental asociada a actividades de alimentación en tuco-tucos.

Procedimiento experimental

Con el fin de evaluar el efecto de la exposición a pistas de la presencia de un predador, condición nutricional y experiencia previa sobre el comportamiento de forrajeo y uso del espacio de los tuco-tucos, se utilizó el test del laberinto en Y descrito previamente. La fuente de alimento, que se colocó en el extremo de cada brazo, consistió en 3 grs del pasto *Panicum racemosum* colocados sobre 10 grs. de viruta conteniendo pistas indicativas de la presencia del predador o del herbívoro (orina).

Los animales fueron asignados aleatoriamente a los distintos tratamientos:

-Sin experiencia previa de contacto con el predador ("Exp. -"): individuos con 24 hs de ayuno (**G1**) o con restricción nutricional: 80% de peso (**G3**, Fig.2).

-Con experiencia previa de contacto con el predador ("Exp. +"): inmovilización con olor de piel/pelaje en individuos con 24 hs de ayuno (**G2**) o con restricción nutricional: 80% de peso (**G4**, Fig. 2).

	Restricción alimentaria (80%) (48 hs)	Ayuno (24 hs)	Experiencia previa por contacto con señales de predador (2 min)
G1		X	
G2		X	X
G3	X		
G4	X		X

Fig. 2: Esquema de exposición a los tratamientos y evaluación del desempeño en laberinto en Y.

El ensayo comportamental comenzó luego de conectar la caja (refugio) al laberinto en Y, registrándose la actividad de cada individuo mediante una cámara de video por un período de 10 minutos. Luego, se determinaron los siguientes parámetros a partir de las filmaciones: latencia en salir de la caja (refugio), número de entradas y tiempo alimentándose en los brazos del laberinto con olor del herbívoro (H) o del predador (P) y preferencia de alimentación (brazo del laberinto donde los individuos se alimentaron por más del 75 % del tiempo total dedicado a esta tarea). Al finalizar, el dispositivo fue lavado y limpiado con etanol para realizar la siguiente prueba.

Análisis de datos

Para analizar los parámetros comportamentales de los individuos (latencia, número de entradas y tiempo alimentándose en cada brazo del laberinto en Y), se utilizó un test de ANOVA de dos vías, con condición nutricional y exposición previa al predador como factores. En los casos particulares del número de entradas y del tiempo alimentándose en cada brazo se calcularon índices de herbívoro sobre predador (H/P). Los parámetros fueron transformados previo al análisis para cumplimentar con los supuestos paramétricos (latencia: \log_{10} ; número de entradas y tiempo alimentándose: \ln). Para evaluar las preferencias de alimentación de los tuco-tucos, se realizaron pruebas de Chi-cuadrado para cada grupo.

RESULTADOS

Latencia: los resultados del análisis mostraron un efecto de la experiencia previa por contacto con señales de un predador sobre la latencia a entrar al laberinto, siendo esta mayor en los grupos expuestos (ANOVA de dos vías, $F = 5.9$, $gl = 1$, $p = 0.01$, Fig. 3A). No se observó efecto de la condición nutricional sobre este parámetro (ANOVA de dos vías, $F = 0.34$, $gl = 1$, $p = 0.55$). Análisis *a posteriori* revelaron diferencias significativas del G4 respecto del G1 (Fisher test, $p = 0.036$) y el G3 (Fisher test, $p = 0.038$).

Número de entradas en brazos: no se observaron efectos de la condición nutricional o de la exposición previa a señales de predador sobre este parámetro (ANOVA de dos vías, $F = 1.46$, $gl = 1$, $p = 0.23$; $F = 0.21$, $gl = 1$, $p = 0.64$ respectivamente, Fig. 3B).

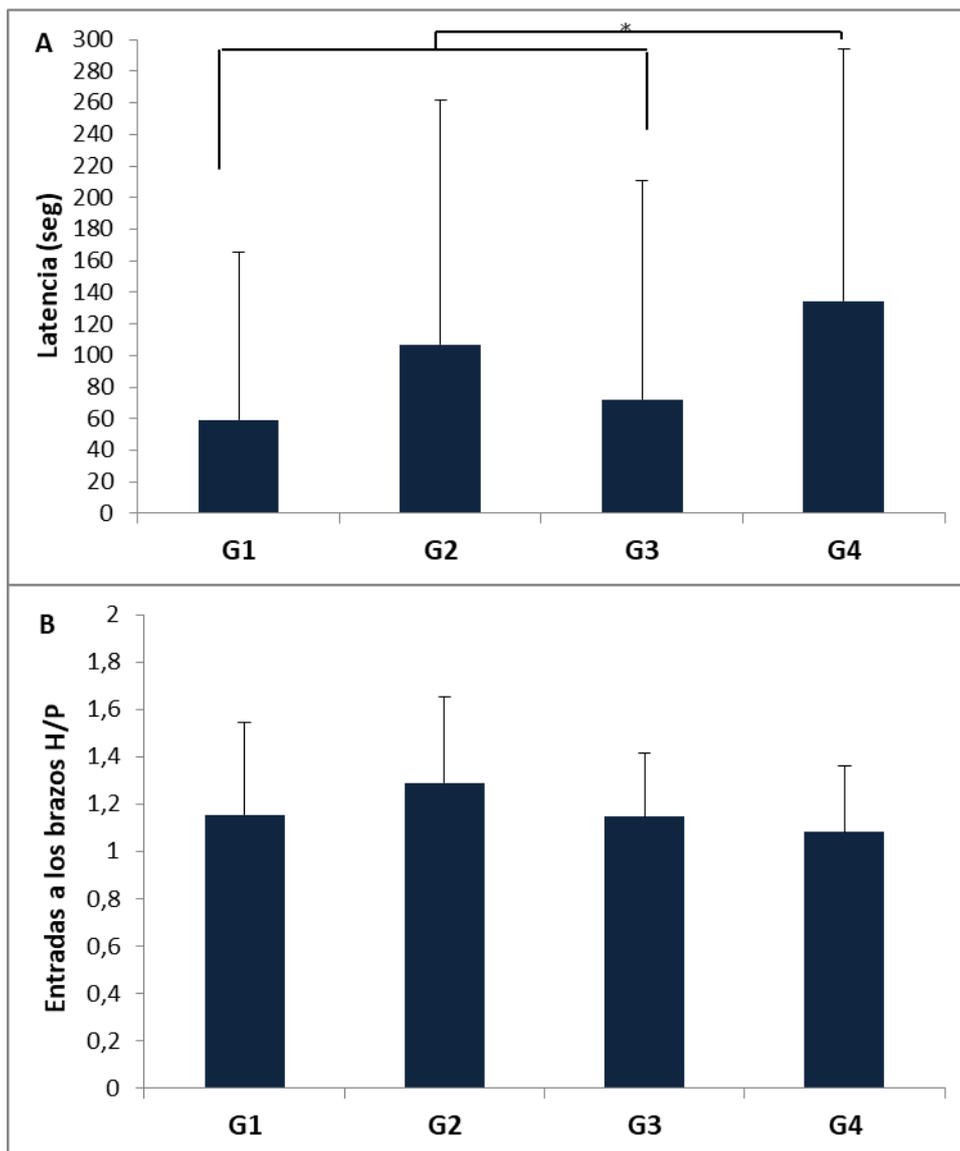


Fig 3. Media (\pm DE) de la latencia (seg) en salir del refugio (A) y relación del número de entradas a los brazos H/P (B) de los grupos G1 (24 hs ayuno, sin inmovilización), G2 (24 hs ayuno, con inmovilización), G3 (80 % peso, sin inmovilización) y G4 (80 % peso, con inmovilización) en el laberinto en Y.

Preferencias de alimentación: En todos los grupos se pudo observar que la mayoría de los tuco-tucos mostraron una preferencia significativa por alimentarse en brazos donde estaba presente el olor del herbívoro por sobre los brazos con olor del predador (Tabla 1).

Tabla 1: preferencia de la zona de alimentación (número de individuos que se alimentaron más del 75% del tiempo en el brazo con olor a herbívoro/total de individuos) de los grupos G1, G2, G3 y G4 de *Ctenomys talarum*.

	Elección de alimento	P (prueba de Chi cuadrado)
G1	14/19	0.038
G2	17/19	<0.001
G3	13/18	0.059
G4	13/18	0.059

Tiempo alimentándose: no se observaron efectos de la condición nutricional o de la exposición previa a señales de predador sobre el tiempo total alimentándose (ANOVA de dos vías, $F = 1.41$, $gl = 1$, $p = 0.23$; $F = 0.44$, $gl = 1$, $P = 0.50$ respectivamente, Fig. 4A). Así mismo, no se observaron efectos significativos de estos factores sobre el índice de tiempo alimentándose (Herbívoro/Predador, ANOVA de dos vías, $F = 0.56$, $gl = 1$, $p = 0.45$; $F = 0.21$, $gl = 1$, $p = 0.26$ respectivamente, Fig. 4B).

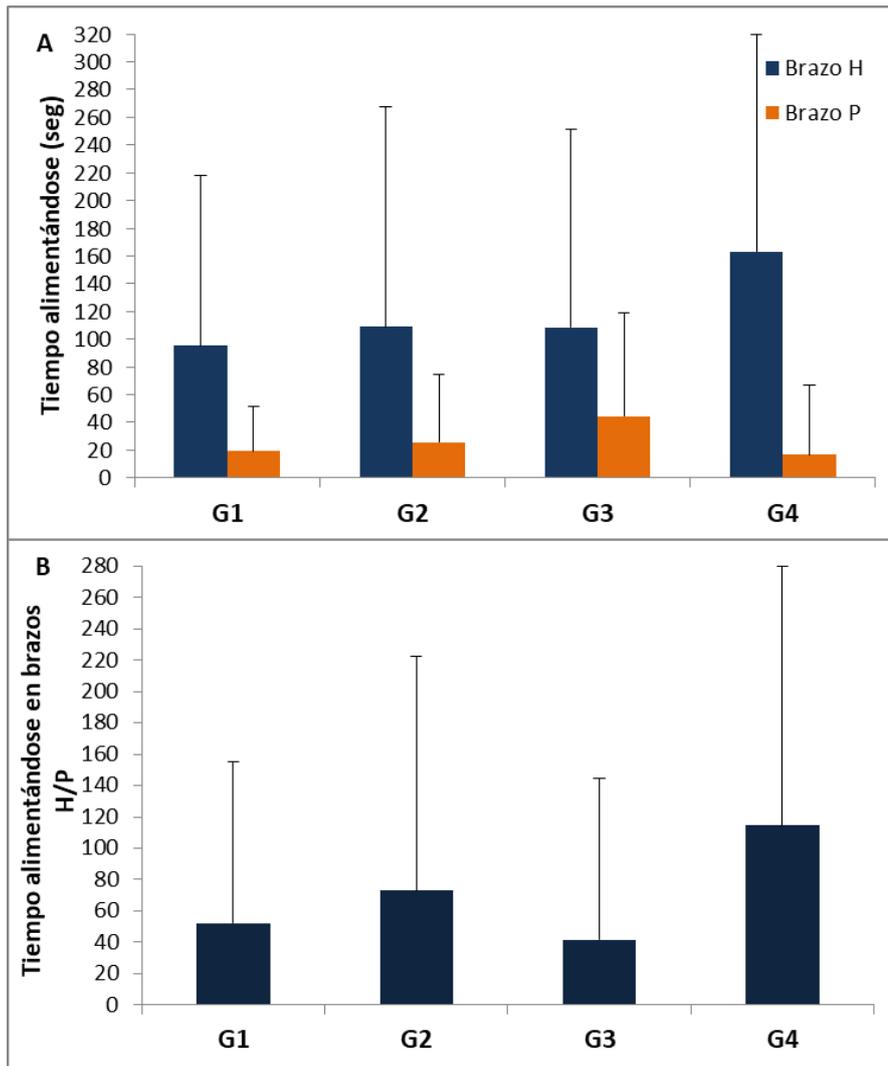


Fig 4. Media (\pm DE) del tiempo comiendo en los brazos H y P (seg) (A) y relación del tiempo comiendo en los brazos H/P (B) de los grupos G1 (24 hs ayuno, sin inmovilización), G2 (24 hs ayuno, con inmovilización), G3 (80 % peso, sin inmovilización) y G4 (80 % peso, con inmovilización) en el laberinto en Y.

DISCUSIÓN

Muchas especies presa usan los olores de los predadores como pistas para evaluar el riesgo de predación y adoptan comportamientos de evitación que les permiten reducir las posibilidades de encuentro con los predadores (Kats y Dill 1998, Apfelbach *et al.* 2005). En muchos casos, los efectos no letales de los predadores pueden afectar la distribución espacial y temporal de las presas, ya que el riesgo de predación es un factor clave en la determinación del sitio y el momento en el cual la

presa elige alimentarse. En consecuencia, es esperable que el esfuerzo de forrajeo y los comportamientos antipredatorios de las presas se ajusten de acuerdo a la percepción del riesgo predatorio (Cremona *et al.* 2014, Verplancke *et al.* 2010).

Consistente con la primera predicción, los resultados del presente experimento mostraron que los tuco-tucos, independientemente del grupo experimental proveniente, prefirieron alimentarse en los sitios que no presentaban señales de la presencia de un predador. Es conocido que cuando se percibe un riesgo aumentado de predación, una gran variedad de respuestas puede aparecer en las presas, incluyendo niveles reducidos de forrajeo y evitación de los sitios de mayor riesgo (Herman y Valone 2000). En el caso particular de *C. talarum*, la presencia de pistas de un predador generó el desplazamiento de los individuos hacia el sitio con menor riesgo de predación, en forma coincidente con diversos trabajos en roedores donde se verificaron variaciones en los patrones de forrajeo asociadas al riesgo predatorio. Por ejemplo, Epple y colaboradores (1993) encontraron que los castores de montaña (*Aplodontia rufa*) disminuyeron la tasa de alimentación en los sitios donde estaba presente la orina de diversos predadores naturales en un test de dos opciones. Además, en un trabajo de campo Severud y colaboradores (2011) encontraron que *Castor canadensis* disminuyó el uso del espacio y permaneció menos tiempo en áreas de forrajeo donde estaba presente el olor de orina de lobo (*Canis lupus*). Por otro lado, en un estudio en condiciones seminaturales, Verplancke y colaboradores (2010) observaron que los olores de los predadores inducían una disminución en la actividad y en la alimentación de *Myodes glareolus*, siendo estos efectos mayores con los olores de los predadores terrestres que los aéreos.

Lima y Bednekoff (1999) sugirieron que las respuestas antipredatorias de las presas son probablemente afectadas por su experiencia previa con eventos predatorios, un factor usualmente olvidado en la evaluación del comportamiento de forrajeo de las presas. En el caso de *C. talarum*, se evaluó si el comportamiento de forrajeo se vio afectado luego de la simulación de un evento predatorio fallido. Resulta interesante destacar que, aunque no afectó el tiempo neto alimentándose ni la exploración de ambos sitios de alimentación, la experiencia reciente de un contacto con pistas directas de predador produjo un aumento notorio en la latencia a ingresar al laberinto. Varios ejemplos han demostrado la disminución en actividad de las presas luego de un

contacto directo o indirecto con predadores (Lima y Dill, 1990; Apfelbach *et al.* 2005, ver Capítulo 1 y 2). En muchos casos, estos menores niveles de actividad se hayan directamente relacionados con el uso de refugios y el aumento del comportamiento de vigilancia (Lima 1998). En su hábitat natural, los tuco-tucos forrajean en las proximidades de las bocas de las cuevas, por lo que es probable que luego de un evento predatorio fallido, los individuos regresen rápidamente a sus cuevas y se mantengan quietos y vigilantes previo a una nueva excursión en superficie en búsqueda de alimento. Aunque la aparición de estos comportamientos antipredatorios puede estar asociada con una disminución en la eficiencia de forrajeo debido a episodios de alimentación menos frecuentes y duraderos (Siepielski *et al.* 2016), el tiempo total alimentándose no varió entre individuos previamente expuestos o no a pistas directas de un predador. Es factible que luego de un periodo de vigilancia y baja movilidad, los tuco-tucos salgan nuevamente a buscar alimento, y al no presentarse señales directas del predador, solo modifiquen sus sitios de forrajeo hacia sitios seguros (sin olor de predador) sin variar el tiempo neto dedicado a esta actividad, balanceando de esta manera los requerimientos energéticos con los riesgos de predación.

Estas tácticas antipredatorias durante el forrajeo, que suelen ser costosas en términos de reducción en el crecimiento, reproducción y hasta supervivencia, debido a una alimentación deficiente (Lima 1998), pueden estar también influenciadas por la condición nutricional de los individuos presa. Es esperable que los animales que presentan presupuestos energéticos positivos tiendan a ser reacios al riesgo, mientras que aquellos con presupuestos energéticos negativos suelen ser más propensos al riesgo (Bateson 2002). Sin embargo, la evidencia científica apoyando esta teoría no suele ser abundante, debido principalmente a la gran cantidad de parámetros ecológicos utilizados por los individuos al momento de tomar decisiones (Kacelnik y Bateson, 1996). Como ejemplos positivos, Rebores y Kacelnik (1991) reportaron en estorninos que los individuos que eran menos eficientes en la obtención de alimento, y por lo tanto recibían menor contenido energético, solían ser más propensos al riesgo que aquellos que se alimentaban mejor. Bajo condiciones naturales, los roedores *Peromyscus leucopus* provenientes de ambientes de alta calidad son menos propensos al riesgo (altos GUDs; giving up densities o densidad remanente de alimento que dejan en el ambiente) que aquellos provenientes de ambientes de baja calidad (Morris y

Davidson 2000). En el presente estudio, los individuos en peor condición nutricional no modificaron ni el tiempo neto alimentándose ni el uso diferencial de los brazos con o sin señal de predador, aunque aquellos con restricción alimentaria fueron los que mostraron una tendencia –si bien no significativa- en utilizar en mayor medida el alimento asociado al brazo con olor de un predador. En forma similar, Krause y Liesenjohann (2012) no encontraron efectos del estrés nutricional en los comportamientos asociados a la toma de riesgo en peces millón, *Poecilia reticulata*, aunque sugirieron que esto podría deberse a que los individuos no se encontraron en una situación nutricional extrema, por lo que el compromiso energético no sería tan fuerte como para afectar la toma de decisiones asociadas al riesgo predatorio. Con respecto a la restricción nutricional utilizada en el presente experimento, una disminución del peso por debajo del 80% del peso corporal o la mantención de ese peso por un largo periodo suele resultar en la muerte de los individuos, por lo que se puede considerar a la condición nutricional utilizada como de carácter severa para *C. talarum*. Otra posible explicación para la ausencia de efecto podría deberse al parámetro (tiempo alimentándose) utilizado para evaluar la respuesta de forrajeo. Mientras que el tiempo alimentándose fue similar entre individuos con y sin restricción severa, podrían existir diferencias en cuanto a la cantidad de alimento ingerida por unidad de tiempo (retorno energético), no cuantificado en este trabajo. Además, si bien el estado nutricional de los individuos puede estar vinculado a variaciones en el comportamiento de forrajeo, es altamente probable que otras variables puedan estar afectando la toma de decisiones. Por ejemplo, el estado inmune y/o la carga parasitaria son dos variables de la condición de los organismos que pueden alterar notoriamente el comportamiento de forrajeo y la evaluación del riesgo potencial de predación (Schwanz *et al.* 2012). Por lo tanto, sería necesario incluir un mayor espectro de variables, en conjunto con experimentos a campo, con el fin de elucidar los componentes que determinan el comportamiento de forrajeo en *C. talarum*. En estos futuros estudios, la perspectiva del paisaje del miedo en relación a los rasgos de personalidad de los individuos parece muy promisorio. Focalizar sobre la variación individual en la respuesta frente a diferentes desafíos se encuentra en un período de creciente interés en el área de la ecología del comportamiento (Bleicher 2017), particularmente considerando el efecto del riesgo predatorio en relación a la expresión de tipos de personalidades (Ioannou *et al.* 2008).

En conclusión, una gran variedad de experimentos y modelos matemáticos han sido desarrollados para predecir como el comportamiento de forrajeo es influenciado por la predación (Lima 1998). La mayoría de estos asumen que la presa prefiere minimizar la exposición a los predadores entre elecciones de sitios de forrajeo que presenten similares disponibilidades de alimento. Así mismo, cuando la disponibilidad de alimento o la condición de los individuos varia, los animales ajustan sus decisiones para lograr una optimización del éxito de forrajeo. En concomitancia con estas predicciones, los resultados de este capítulo demuestran que los tuco-tucos pueden distinguir pistas indicativas de la presencia de un predador y discernir el riesgo asociado a ésta en relación a la de un herbívoro no competidor que no representa riesgo o amenaza para esta especie. Esta percepción del riesgo predatorio se encontró asociada a la preferencia por alimentarse en áreas donde no están presentes las pistas del predador (sitios seguros). Por último, las experiencias predatorias recientes influyeron en la toma de decisiones de forrajeo, aumentando el tiempo sin actividad y en vigilancia previo a una nueva excursión de alimentación. Aunque estos resultados demuestran la importancia de la percepción del riesgo predatorio en el comportamiento de forrajeo de *C. talarum*, es claramente necesario la inclusión de una mayor cantidad de factores para comprender completamente las decisiones de forrajeo de esta especie. Los animales viven en medio ambientes complejos y cambiantes, con diferentes predadores que utilizan diversas tácticas de caza, por lo que solamente la incorporación de esta gran variabilidad en nuestros análisis nos permitirá obtener una visión más global de las tácticas antipredatorias de esta especie de roedor subterráneo.

DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS

La predación se considera un proceso central en la Ecología, siendo inicialmente su foco de análisis la evaluación de los efectos directos asociados al consumo de la presa (Krebs *et al.* 2001). Más tarde - un siglo atrás-, bajo la perspectiva de la biología del estrés, se reconoce que el riesgo de predación puede inducir cambios en la fisiología de la presa (Canon 1915), lo que más tarde se conoce como paradigma de “pelea o vuela” (*fight or flight*, Wingfield *et al.* 1998). Sin embargo, el reconocimiento de la importancia de los efectos no letales sobre las presas por parte de ecólogos y biólogos de la conservación fue lento y tardío, puesto que consideraban que estos eran mayormente transitorios y sin impacto potencial en la demografía (Sheriff y Thaler 2014). Recientemente, se ha reportado que el riesgo predatorio induce cambios en la presa en relación a su comportamiento, morfología, fisiología, inclusive alterando su desarrollo tal que esos cambios persisten en la adultez (e.g. Clinchy *et al.* 2013, Moll *et al.* 2017). Esta acumulación de evidencias ha permitido valorar al riesgo predatorio como un importante factor afectando una serie de variables fuertemente asociadas a la supervivencia y la reproducción, que comprenden en conjunto la “ecología del miedo” (Clinchy *et al.* 2013). Más aún se estima que los efectos no letales pueden representar magnitudes similares o inclusive mayores a los letales (Preisser *et al.* 2005), influenciando la demografía de las presas, la estructura de las comunidades y los procesos ecosistémicos (Sheriff y Thaler 2014).

Dado el impacto negativo del predador sobre ambos componentes del fitness de las presas (supervivencia y reproducción), estas presentan mecanismos tendientes a evitar y defenderse de los predadores. En este contexto, resulta crucial una afinada evaluación del riesgo predatorio y de las ventajas de la defensa dados los costos y compromisos involucrados (Dielenberg y McGregor 2001, Kavaliers y Choleris 2001). La interacción entre los comportamientos antipredatorios y defensivos de un animal y el riesgo predatorio ha sido abordada desde enfoques diferentes. Desde una visión etológica el foco se centra en cómo los animales presa reconocen y responden a las señales predatorias (Apfelbach *et al.* 2005, Hegab *et al.* 2014). Mientras que la ecología del comportamiento se focaliza en las consecuencias ecológicas y evolutivas de las

respuestas a estas señales (Willson y Hopkins 2011). Para los ecólogos cognitivos el interés principal corresponde al procesamiento de la información y los mecanismos de toma de decisiones asociados a las respuestas comportamentales aprendidas e innatas a los predadores (McGregor *et al.* 2002). Los neurocientíficos abordan el impacto de estos factores estresantes sobre la actividad cerebral y la plasticidad, así como el funcionamiento del sistema endocrino (Perrot-Sinal *et al.* 1999, Tsigos y Chrousos 2002, Clinchy *et al.* 2013). Así este modelo también se ha utilizado para examinar el impacto del estrés agudo y crónico en el funcionamiento neuronal (Mackenzie *et al.* 2010).

Desde una perspectiva biomédica es posible considerar que la activación sostenida del eje de estrés puede desencadenar efectos negativos y hasta patológicos (Romero *et al.* 2009). Si bien esto aplicaría en el caso de estudios en animales de laboratorio, en la naturaleza el estrés crónico no parece funcionar de la misma manera. Más allá de los estresores de tipo *reactivos*, los cuales involucran desafíos fisiológicos que afectan directamente la homeostasis (e.g. disminución en la disponibilidad de alimento, sequía), los de tipo *anticipatorio* involucran señales ambientales percibidas por el organismo como una amenaza a la supervivencia, generando una disrupción homeostática y requieren de un procesamiento cognitivo (Boonstra 2013). Este tipo de respuesta puede ocurrir en total ausencia de una amenaza fisiológica real o inclusive antes de una amenaza directa, como es el caso de un intento de predación. El organismo puede interpretar la importancia de los estímulos sensoriales ambientales basándose en respuestas innatas como el miedo instintivo de la presa por su predador y/o en la memoria de experiencias previas por ataques fallidos (Boonstra 2013). Cabe destacar que, el procesamiento de estas señales involucra áreas cerebrales implicadas en la toma de decisiones, tales como el hipocampo, la corteza prefrontal, la amígdala, el tabique y la línea media del tálamo (Herman *et al.* 2003), que regulan de manera inhibitoria (hipocampo y la corteza prefrontal, Herman *et al.* 2005) o estimulante (amígdala, Fanselow y Ponnusamy 2007) el eje HPA (Boonstra *et al.* 2013).

En este contexto, y utilizando un enfoque de análisis que involucra el reconocimiento, procesamiento, respuesta comportamental y fisiológica desde una visión ecológica, esta tesis brinda un aporte al estudio de las respuestas de animales silvestres a situaciones estresantes cotidianas en su ambiente, como el riesgo de predación. Particularmente, el modelo *Ctenomys talarun* resulta de interés en el estudio

de la fisiología y el comportamiento de roedores silvestres. Este modelo de estrés por predador se ha utilizado previamente y resulta muy eficiente en la resolución de preguntas tendientes a conocer mecanismos responsables de la generación de respuestas frente a esta situación (Brachetta *et al.* 2014, Mastrángelo *et al.* 2009). Además, aplicar un desafío natural de este tipo presenta la ventaja de no involucrar estímulos que provean otros factores adicionales como el dolor, o la adición de componentes que representen desafíos fisiológicos como anestésicos o estimulación inmune. En este estudio, se expone a este roedor silvestre subterráneo a un factor de estrés ecológicamente relevante, como las pistas indicativas de la presencia de un predador y luego se evalúa su repuesta comportamental y fisiológica en adultos (Capítulos 1, 2, 3 y 5), así como los efectos en juveniles expuestos prenatalmente (Capítulo 4).

Los resultados de esta tesis muestran que, en tuco-tucos, la exposición a los olores derivados de un predador natural (gato), utilizados como indicadores del riesgo potencial de predación, generan un estado de ansiedad e inducen cambios comportamentales asociados con la disminución de la actividad locomotora y la generación de comportamientos de evitación (Capítulo 1). Además, mientras que los olores de la piel provocaron cambios significativos en los parámetros comportamentales, la orina causó solamente cambios leves en su comportamiento (Capítulo 2). Esto apoyaría la hipótesis de que los olores de la piel resultan más ansiogénicos que la orina, debido a que indicarían mayor inminencia de la presencia de un predador y por lo tanto un mayor riesgo (Staples 2010, Blanchard *et al.* 2003a). Además, se encontró que la presencia del olor se asocia a la aparición de comportamientos defensivos en *C. talarum*, aunque no se observó una relación dependiente de la intensidad entre el olor del predador y los niveles de ansiedad generados (Capítulo 2). Por otro lado, los individuos mostraron una clara habituación a las pistas del predador cuando fueron expuestos repetidamente a ellas (Capítulo 2). Estos resultados proporcionan evidencia valiosa respecto de que diferentes fuentes de olor del predador, junto con la frecuencia de exposición, son determinantes importantes en la aparición, fuerza y extinción de comportamientos defensivos en *C. talarum*. Sin embargo, estos cambios no fueron acompañados de variaciones notorias en los parámetros fisiológicos (cortisol, glucosa, hematocrito y relación N/L) en los

animales (Capítulos 1 y 2). Como se desarrolló anteriormente (Capítulo 3), en los vertebrados, la relación entre la respuesta fisiológica y comportamental es compleja, encontrándose tanto evidencias que la apoyan (Cavigelli 1999, Cockren y Silverin 2002, Yin *et al.* 2017) como otras en las cuales esta relación no es notoria (Pride 2005, Fonner *et al.* 2015).

Para mejorar nuestra comprensión sobre la relación entre el riesgo predatorio, el comportamiento y la respuesta fisiológica de estrés, es crucial explorar con detalle la fisiología que subyace a la respuesta frente a este estresor, y cómo se vincula con los mecanismos comportamentales. Para ello, la manipulación endógena y exógena de GCs permiten comprender estos aspectos, profundizando a su vez el entendimiento de la ecología del estrés en animales silvestres (Sopinka *et al.* 2015, Crossin *et al.* 2016). En referencia a este punto, frente al olor de la piel, -y en mayor medida- a la inmovilización, los tuco-tucos responden fisiológicamente mediante la secreción de cortisol (Capítulo 3). A su vez, esta respuesta fue acompañada por una respuesta comportamental asociada a la aparición de estados de ansiedad, principalmente en los individuos inmovilizados. Sin embargo, la misma no fue notoria cuando se incrementó el cortisol plasmático por vía exógena. Así mismo, estos comportamientos fueron debilitados por la inhibición de la síntesis endógena de GCs (Capítulo 3). Al respecto, se propone que un incremento en GCs no sea suficiente para desencadenar una respuesta antipredatoria sino que la misma esté asociada a la percepción sensorial del propio factor de estrés (Sopinka *et al.* 2015). Así, en la respuesta comportamental podrían estar involucrados otros aspectos o componentes de la respuesta al estrés, incluyendo la activación del SMA (Sapolsky *et al.* 2000, Armario 2006, Boonstra 2013). Por otro lado, luego de la inducción tanto endógena como exógena de los niveles de cortisol, no se observaron diferencias en la proporción N/L y en los niveles de glucosa en sangre (Capítulo 3) de manera similar a lo observado previamente (Capítulos 1 y 2).

Así, los individuos que experimentan un evento predatorio fallido o encuentros con señales indicativas de la amenaza de predadores pueden manifestar efectos significativos en su fisiología y comportamiento a diferentes escalas temporales. Pero más aún, si esto ocurre en una hembra preñada, puede inducir un cambio significativo en el ambiente de desarrollo de la descendencia, lo que puede conducir a modificaciones en el fenotipo de las crías que pueden persistir en las diferentes etapas

de la vida (Mashoodh *et al.* 2009, Love *et al.* 2013, Sheriff *et al.* 2017). En esta tesis se observó que, en tuco-tucos juveniles, la exposición al estrés prenatal por predador desencadenó estados de ansiedad y la aparición de comportamientos antipredatorios tal como fue verificado en los adultos cuando fueron expuestos directamente a esas señales (Capítulo 4). Estos comportamientos fueron más intensos en los juveniles expuestos a señales de estrés por predación (Capítulos 1, 2 y 3). Por otro lado, el estrés prenatal no afectó la respuesta de estrés ni inmunológica a diversos desafíos. En concordancia con lo observado en otras especies, los individuos expuestos prenatalmente a las señales predatorias muestran adaptaciones comportamentales que pueden contribuir a evitar a los predadores en la vida adulta. En los últimos años, estos efectos generacionales han despertado un gran interés desde diversas disciplinas, incluso el área biomédica (Love *et al.* 2013).

Finalmente, en la naturaleza, los organismos se encuentran frecuentemente frente al compromiso que implica la búsqueda de recursos, como el alimento, y el riesgo predatorio (Lima 1998). En este estudio, los tuco-tucos mostraron una clara preferencia por alimentarse en áreas donde estaban presentes las pistas de un herbívoro y no en áreas asociadas a pistas de un predador. Este evitamiento fue aún mayor luego de experimentar estrés por predación y contrariamente a lo esperado, el estado nutricional no afectó su comportamiento (Capítulo 5). La detección de estas pistas corresponde a comportamientos de evitación que permiten minimizar el riesgo predatorio, restringiendo la zona alimentación a sitios menos peligrosos.

A partir del relevamiento de antecedentes realizado, es evidente la necesidad de incrementar estudios que analicen los efectos del riesgo predatorio en un mayor número de especies silvestres para complementar así la información disponible sobre estudios comportamentales, fisiológicos y biomédicos realizados en animales de laboratorio durante las últimas décadas (Boonstra 2013, Clinchy *et al.* 2013). Si bien el marco de la ecología del miedo resulta valioso para la comprensión de los diversos efectos del estrés en la neurofisiología de los animales, sólo la extensión de estudios a especies silvestres en condiciones naturales o seminaturales ofrecerá un claro avance en su validez ecológica. Los principales resultados obtenidos en el presente estudio también revelaron que *C. talarum* no es la excepción, mostrando algunas respuestas comportamentales similares a las observadas en trabajos previos sobre estrés

predatorio, pero otras claramente diferentes, enfatizando la importancia de las características de la historia de vida así como su historia evolutiva – considerando el tiempo de la interacción y la magnitud de las presiones de selección- de cada especie en la conformación de las diversas soluciones encontradas en la naturaleza. En este caso de estudio, el modo de vida subterráneo en el que habitan los tuco-tucos se considera como un amortiguador contra la predación, dado que la cueva en sí misma representa una adaptación que les permite evitar a los predadores (Nevo 1995, Reig *et al.* 1990).

En esta tesis se ha aportado conocimiento sobre los efectos de las pistas de predadores en el comportamiento y la fisiología del roedor subterráneo *C. talarum*. Esto permite plantear nuevos interrogantes para explorar en el futuro, como, por ejemplo:

- Complementar los estudios realizados en el laboratorio con otros a campo, de manera de poner a prueba si la magnitud de la respuesta comportamental se mantiene en los mismos niveles que los observados en el laboratorio y son consecuencia de una baja reactividad asociada a la protección de los predadores que obtiene esta especie a través de las cuevas. Por otro lado, el estrés crónico que representa el cautiverio se conoce que impacta en los niveles de GCs basales, y por lo tanto podría limitar tanto la respuesta fisiológica como la comportamental asociada que se evaluó a lo largo de esta tesis.

- Explorar el rol de la variación individual en las respuestas comportamentales, asociadas a la personalidad, en la modulación de las respuestas comportamentales y fisiológicas de *C. talarum* frente a factores de estrés que ocurren en la naturaleza, entre ellos la predación.

- Investigar si las exposiciones prenatales a factores de estrés durante diferentes etapas del período gestacional desencadenan una respuesta comportamental diferencial en hembras y machos juveniles de *C. talarum*. Del mismo modo, estudiar el posible efecto del estrés por predación en madres amamantando sobre el cuidado parental que ejercen durante el periodo de lactancia y sus consecuencias en el desarrollo de las crías a corto y largo plazo.

- El análisis de otras fuerzas modeladoras del comportamiento, la fisiología y la demografía de los organismos presa, tales como el parasitismo, y su interacción con el riesgo predatorio resultarían un complemento para este estudio de gran interés para

comprender las respuestas a desafíos simultáneos que los organismos silvestres enfrentan en la naturaleza.

Finalmente, dependiendo del organismo objeto de estudio (modelo, silvestres) y los factores de estrés puestos en juego (artificiales, naturales, de relevancia ecológica), las implicancias de los estudios resultantes proveen información de alcance para el ámbito biomédico, biológico (silvestre y cautiverio) y hasta la salud humana. Así, resulta interesante la combinación de un enfoque etológico en la comprensión de las causas y funciones del comportamiento defensivo con análisis farmacológicos de los mecanismos implicados en esta respuesta (Blanchard *et al.* 1990, Blanchard *et al.* 2001). De aquí, surge el interés en considerar las relaciones entre el comportamiento defensivo y las psicopatologías y utilizar estas respuestas para probar la eficacia de fármacos contra trastornos emocionales en humanos, tales como la ansiedad y el pánico (Hegab *et al.* 2014). Por lo tanto, los investigadores biomédicos reconocen muy ventajoso el modelo experimental de estrés por predación para abordar el trastorno de estrés postraumático (PTSD), para lo cual se utilizan prevalentemente animales de laboratorio (Adamec *et al.* 1998, Cohen *et al.* 2010, El-Hage y Belzung 2002, Zoldaz *et al.* 2016). En este sentido, Clinchy y colaboradores (2011) destacan la importancia de la colaboración entre neurocientíficos y ecólogos en el estudio de los efectos neurológicos del miedo y el estrés inducidos por un predador en animales silvestres, dada la clara ventaja de involucrar variabilidad individual en la respuesta a desafíos naturales. Llevado esto al ámbito biomédico, el estudio de las diferencias individuales resulta de gran interés en la dilucidación de la vulnerabilidad y resiliencia que presentan las personas frente a patologías relacionadas al estrés (Armario y Nadal 2013).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, H., Hidaka, N., Kawagoe, C., Odagiri, K., Watanabe, Y., Ikeda, T., Ishizuka, Y., Hashiguchi, H., Takeda, R., Nishimori, T. y Ishida, Y. (2007). Prenatal psychological stress causes higher emotionality, depression-like behavior, and elevated activity in the hypothalamo-pituitary adrenal axis. *Neurosci. Res.* 59, 145-151.
- Adamec, R.E. y Shallow, T. (1993). Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. *Physiol. Behav.* 54, 101-109.
- Adamec, R., Kent, P., Anisman, H., Shallow, T. y Merali, Z. (1998). Neural plasticity, neuropeptides and anxiety in animals—implications for understanding and treating affective disorder following traumatic stress in humans. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 301–318.
- Antinuchi, D. y Busch, C. (1992). Burrow structure in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Mamm. Biol.* 57, 163-168.
- Antinuchi, D. y Schleich, C.E. (2003). Spatial memory in a solitary subterranean rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae). *Bel. J. Zool.* 133, 89-91.
- Apfelbach, R., Blanchard, C.D., Blanchard, R.J., Hayes, R.A. y McGregor I.S. (2005). The effects of predator odors in mammalian prey species: a review of field and laboratory studies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 1123-1144.
- Apfelbach, R., Parsons, M.H., Soini, H.A. y Novotny, M.V. (2015). Are single odorous components of a predator sufficient to elicit defensive behaviors in prey species? *Front. Neurosci.* 9, 263.
- Armario, A. (2006). The hypothalamic–pituitary–adrenal axis: what can it tell us about stressors? *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 5, 485-501.
- Armario, A., Montero, J.L. y Balash, J. (1986). Sensitivity of corticosterone and some metabolic variables to graded levels of low intensity stresses in adult male rats. *Physiol. Behav.* 37, 559-561.
- Armario, A. y Nadal, R. (2013). Individual differences and the characterization of animal models of psychopathology: a strong challenge and a good opportunity. *Front. Pharmacol.* 4, p. 137
- Baker, S., Chebli, M., Rees, S., LeMarec, N., Godbout, R. y Bielajew, C. (2008). Effects of gestational stress: 1. Evaluation of maternal and juvenile offspring behaviour. *Brain Res.* 1213, 98-110.
- Bakker, J.M., van den Dobbelaars, G.P.J.M., Kroes, H., Kavelaars, A., Heijnen, C.J., Tilders, F.J.H. y van Rees, E.P. (1998). Long-term gender- specific effects of manipulation during pregnancy on immune and endocrine responsiveness in rat offspring. *J. Neuroimmunol.* 82, 56-63.
- Banks, P.B., Newsome, A.E. y Dickman, C.R. (2000). Predation by red foxes limits recruitment in populations of eastern grey kangaroos. *Austral Ecol.* 25, 283-291.

- Barbazanges, A., Piazza, P.V., Le Moal, M. y Maccari, S.** (1996). Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. *J. Neurosci.* 16, 3943-3949.
- Bateman, P.W. y Fleming, P.A.** (2014). Switching to Plan B: changes in the escape tactics of two grasshopper species (Acrididae: Orthoptera) in response to repeated predatory approaches. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 68, 457-465.
- Bateson, M.** (2002). Recent advances in our understanding of risk-sensitive foraging preferences. *Proc. Nutr. Soc.* 61(4), 509–516.
- Bauer, C.M., Hayes, L.D., Ebensperger, L.A., Ramírez-Estrada, J., León, C., Davis, G.T. y Romero, L.M.** (2015). Maternal stress and plural breeding with communal care affect development of the endocrine stress response in a wild rodent. *Horm. Behav.* 75, 18-24.
- Berton, F. Vogel, E. y Belzung, C.** (1998). Modulation of mice anxiety in response to cat odor as a consequence of predator's diet. *Physiol. Behav.* 65, 247-254.
- Bian, J.H., Du, S.Y., Wu, Y., Cao, Y.F., Nie, X.H., He, H. y You, Z.B.** (2015). Maternal effects and population regulation: maternal density-induced reproduction suppression impairs offspring capacity in response to immediate environment in root voles *Microtus oeconomus*. *J. Anim. Ecol.* 84, 326-336.
- Blanchard, R.J. y Blanchard, D.C.** (1989). Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *J. Comp. Psychol.* 103, 70-82.
- Blanchard, R.J. y Blanchard, D.C.** (1990). An Ethoexperimental Analysis of Defense, Fear and Anxiety. In N. McNaughton y G. Andrews (eds); pp. 124–133. (Anxiety). Dunedin: Otago University Press.
- Blanchard, R.J., Blanchard, D.C., Griebel, G. y Nutt, D.** (2008). Introduction to the Handbook on Fear and Anxiety. In: R.J. Blanchard, D.C. Blanchard, G. Griebel and D. Nutt (eds), 3–7. Handbook of Anxiety and Fear. London/New York et al: Academic Press.
- Blanchard, D.C., Griebel, G. y Blanchard, R.J.** (2003a). Conditioning and residual emotionality effects of predator stimuli: some reflections on stress and emotion, *Prog. Neuro- Psychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 27, 1177-1185.
- Blanchard, D.C., Markham, C., Yang, M., Hubbard, D., Madarang, E. y Blanchard, R.J.** (2003b). Failure to produce conditioning with low-dose trimethylthiazoline or cat feces as unconditioned stimuli. *Behav. Neurosci.* 117, 360-368.
- Blanchard, R.J. Parmigiani, S. Bjornson, C. Masuda, C. Weiss, S.M. y Blanchard, D.C.** (1995). Antipredator behavior of Swiss-Webster mice in a visible burrow system. *Aggress. Behav.* 21, 123-136.
- Blanchard, R.J., Yang, M., Li, C.I., Gervacio, A. y Blanchard, D.C.** (2001). Cue and context conditioning of defensive behaviors to cat odor stimuli. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25, 587–595.
- Bleicher, S.S.** (2017). The landscape of fear conceptual framework: definition and review of current applications and misuses. *PeerJ* 5:e3772. DOI 10.7717/peerj.3772.

- Boeing, W.J.** (2010). Defensive avoidance. In: Encyclopedia of Animal Behavior. (Breed, M. D., Moore, J., eds). Academic Press, Oxford, UK, pp. 476-480.
- Boersma, G.J. y Tamashiro, K.L.** (2015). Individual differences in the effects of prenatal stress exposure in rodents. *Neurobiol. Stress.* 1, 100-108.
- Boonstra, R.** (2005). Equipped for life: the adaptive role of the stress axis in male mammals. *J. Mamm.* 86, 236-247.
- Boonstra, R.** (2013). Reality as the leading cause of stress: rethinking the impact of chronic stress in nature. *Funct. Ecol.* 27, 11-23.
- Boonstra, R., Barker, J.M., Castillo, J. y Fletcher, Q.E.** (2007). The role of the stress axis in life-history adaptations of rodents. In: *Rodent Societies: An Ecological and Evolutionary Perspective.* (Wolff, J. O., Sherman, P. W., eds). University of Chicago Press, Chicago, pp. 139-149.
- Boonstra, R., Hik, D., Singleton, G.R. y Tinnikov, A.** (1998). The impact of predator-induced stress on the snowshoe hare cycle. *Ecol. Monogr.* 68, 371-394.
- Borowski, Z.** (1998a). Influence of weasel (*Mustela nivalis* Linnaeus, 1766) odour on spatial behaviour of root voles (*Microtus oeconomus* Pallas, 1776), *Can. J. Zool.* 76, 1799-1804.
- Borowski, Z.** (1998b). Influence of predator odour on the feeding behaviour of the root vole (*Microtus oeconomus* Pallas, 1776), *Can. J. Zool.* 76, 1791-1794.
- Borowski, Z. y Owadowska, E.** (2001). Spatial Response of the Field (*Microtus agrestis*) and Bank (*Clethrionomys glareolus*) Voles to Weasel (*Mustela nivalis*) Odour in Natural Habitat. In: *Chemical signals in vertebrates.* vol. 9. A. Marchlewska-Koj, J. Lepri and D. Muller-Schwarze (eds); pp 289–293. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Brachetta, V. Schleich, C.E. y Zenuto, R.R.** (2014). Effects of acute and chronic exposure to predatory cues on spatial learning capabilities in the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae). *Ethol.* 120, 563-576.
- Brachetta, V., Schleich, C.E. y Zenuto, R.R.** (2015). Short term anxiety response of the subterranean rodent *Ctenomys talarum* to odors from a predator. *Physiol. Behav.* 151, 596-603.
- Brachetta, V., Schleich, C.E. y Zenuto, R.R.** (2016). Source Odor, Intensity, and Exposure Pattern Affect Antipredatory Responses in the Subterranean Rodent *Ctenomys talarum*. *Ethol.* 122, 923-936.
- Breuner, C.W., Patterson, S.H. y Hahn, T.P.** (2008). In search of relationships between the acute adrenocortical response and fitness. *Gen. Comp. Endocrinol.* 157, 288-295.
- Bridges, N.J. y Starkey, N.J.** (2004). Sex differences in Mongolian gerbils in four tests of anxiety. *Physiol. Behav.* 83, 119-127.
- Brown, J.S. y Kotler, B.P.** (2004). Hazardous duty pay and the foraging cost of predation. *Ecology Letters.* 7, 999–1014.

- Brown, J.S. y Kotler, B.P.** (2007). Foraging and the ecology of fear. Foraging: behavior and ecology. Chicago University Press; p. 437-480.
- Brown, J.S., Laundré, J.W. y Gurung, M.** (1999). The Ecology of Fear: Optimal Foraging, Game Theory, and Trophic Interactions. *J. Mammal.* 80, 385-399.
- Brunton, P.J.** (2013). Effects of maternal exposure to social stress during pregnancy: consequences for mother and offspring. *Reproduction.* 146, 175-189.
- Brunton, P.J. y Russell, J.A.** (2010). Prenatal social stress in the rat pro-grammes neuroendocrine and behavioural responses to stress in the adult offspring: sex-specific effects. *J. Neuroendocrinol.* 22, 258-271.
- Busch, C., Malizia, A.I., Scaglia, O.A. y Reig, O.A.** (1989). Spatial distribution and attributes of a population of *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *J. Mammal.* 70, 204-208.
- Busch, C., Antinuchi, D., Del Valle, J., Kittlein, M., Malizia, A., Vassallo, A. y Zenuto, R.** (2000). Population ecology of subterranean rodents. In: *Life Underground: The Biology of Subterranean Rodents.* (Lacey, E. A., Patton, J. L., Cameron, G. N., eds). The Univ. of Chicago Press, Chicago, IL, pp. 183-226.
- Bytheway, J.P., Carthey, A.J.R. y Banks, P.B.** (2013). Risk vs. reward: how predators and prey respond to aging olfactory cues. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 67, 715–725.
- Calder, C.J. y Gorman, M.L.** (1991). The effect of red fox, *Vulpes vulpes*, faecal odors on the feeding behaviour of Orkney voles *Microtus arvalis*. *J. Zool. (Lond.).* 224, 599-606.
- Calvo, N. y Volosin, M.** (2001). Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors are involved in the facilitation of anxiety-like response induced by restraint. *Neuroendocrinol.* 73, 261-271.
- Canepuccia, A.** (2005). Efectos del incremento de las precipitaciones sobre la estructura comunitaria de un pastizal del Sudeste de la region Pampeana, Argentina. Doctoral thesis. Univ. Nacional de Mar del Plata.
- Canoine, V., Hyden T.J., Rowe, K., Goymann.** (2002). The stress response of european stonechats depends on the type of stressor. *Behav.* 139, 1303-1311.
- Cannon, W.B.** (1915). *Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage.* D. Appleton and Company, New York, NY.
- Capers, R.G.** (2010). Foraging decisions of nocturnal mice under direct and indirect cues of predation risk. Graduate Theses.
- Carobrez, A.P. y Bertoglio, L.J.** (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus maze model 20 years on. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 1193-1205.
- Cavigelli, S.A.** (1999). Behavioural patterns associated with faecal cortisol levels in free-ranging female ring-tailed lemurs, *Lemur catta*. *Anim. Behav.* 57, 935-944.

- Clinchy, M., Sheriff, M.J. y Zanette, L.Y.** (2013). The ecology of stress: predator-induced stress and the ecology of fear. *Funct. Ecol.* 27, 56-65.
- Clinchy, M., Zanette, L., Boonstra, R., Wingfield, J.C. y Smith, J.N.M.** (2004). Balancing food and predator pressure induces chronic stress in songbirds. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 271, 2473-2479.
- Clinchy, M., Zanette, L., Charlier, T.D., Newman, A.E.M., Schmidt, K.L., Boonstra, R. y Soma, K.K.** (2011). Multiple measures elucidate glucocorticoid responses to environmental variation in predation threat. *Oecologia.* 166, 607–614.
- Cockrem, J.F. y Silverin, B.** (2002). Variation within and between birds in corticosterone responses of great tits (*Parus major*), *Gen. Comp. Endocrinol.* 125, 197-206.
- Coe, C.L., Kramer, M., Kirschbaum, C., Netter, P. y Fuchs, E.** (2002). Prenatal stress diminishes the cytokine response of leukocytes to endotoxin stimulation in juvenile rhesus monkeys. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 675-681.
- Coe, C.L., Lubach, G.R. y Karaszewski, J.W.** (1999). Prenatal stress and immune recognition of self and nonself in the primate neonate. *Biol. Neonate.* 76, 301-310.
- Cohen, H., Zohar, J., Matar, M.A., Kaplan, Z. y Geva, A.B.** (2005). Unsupervised fuzzy clustering analysis supports behavioral cutoff criteria in an animal model of posttraumatic stress disorder. *Biol. Psychiatry.* 58, 640-650.
- Cohen, H., Zohar, J., Gidron, Y., Matar, M.A., Belkind, D., Loewenthal, U., Kozlovsky, N. y Kaplan, Z.** (2006). Blunted HPA axis response to stress influences susceptibility to posttraumatic stress response in rats. *Biol. Psychiatry.* 59, 1208-1218.
- Cohen, H., Kozlovsky, N., Richter-Levin, G. y Zohar, J.** (2010). "Post- traumatic stress disorder in animal models," in *Stress – From Molecules to Behaviour*, eds H. Soreq, A. Friedman, and D. Kaufer (Weinheim: Wiley- VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), 263–282.
- Craske, M.G., Rauch, S.L., Ursano, R., Prenoveau, J., Pine, D.S. y Zinbarg, R.E.** (2009). What is an anxiety disorder? *Depress Anxiety.* 26(12), 1066-85.
- Creel, S.** (2005). Dominance, aggression, and glucocorticoid levels in social carnivores. *J. Mammal.* 86, 255–264.
- Creel, S., J. Winnie, Jr. y D. Christianson.** (2009). Glucocorticoid stress hormones and the effect of predation risk on elk reproduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 12388–12393.
- Cremona T., Crowther M.S. y Webb J.K.** (2014). Variation of prey responses to cues from a mesopredator and an apex predator. *Aust. Ecol.* 39, 749–754.
- Coss, R.G.** (2010). Predator avoidance: mechanisms. In: *Encyclopedia of Animal Behavior*. (Breed, M. D., Moore, J., eds). Academic Press, Oxford, UK, pp. 757-764.

- Crossin, G.T., Love, O.P., Cooke, S.J. y Williams, T.D.** (2016). Glucocorticoid manipulations in free-living animals: considerations of dose delivery, life-history context and reproductive state. *Funct. Ecol.* 30, 116-125.
- Cutrera, A.P., Antinuchi, C.D. y Busch, C.** (2003). Thermoregulatory development in pups of the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Physiol. Behav.* 79, 321-330.
- Cutrera, A.P., Antinuchi, C.D., Mora, M.S. y Vassallo, A.I.** (2006). Home-range size and activity patterns of the South American subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *J. Mammal.* 87, 1183-1191.
- Cutrera A.P., Luna, F., Merlo, J.L., Baldo, M.B. y Zenuto, R.R.** (2014). Assessing the energetic costs and trade-offs of a PHA-induced inflammation in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*: Immune response in growing tuco-tucos. *Comp. Biochem. Physiol. Part A.* 174, 23-28.
- Cutrera, A.P., Zenuto, R.R., Luna, F. y Antenucci, C.D.** (2010). Mounting a specific immune response increases energy expenditure of the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (tuco-tuco): implications for intra and interspecific variation in immunological traits. *J. Exp. Biol.* 213, 715-724.
- Dallman, M.F., Strack, A.M., Akana, S.F., Bradbury, M.J., Hanson, E.S., Scribner, K.A. y Smith, M.** (1993). Feast and famine - critical role of glucocorticoids with insulin in daily energy -flow. *Front. Neuroendocrinol.* 14, 303-347.
- Davis, D.R. y Gabor, C.R..** (2015). Behavioral and physiological antipredator responses of the San Marcos salamander, *Eurycea nana*. *Physiol. Behav.* 139,145-149.
- Davis, A.K., Maney, D.L. y Maerz, J.C.** (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct. Ecol.* 22, 760-772.
- Day, H.E. Masini, C.V. y Campeau, S.** (2004). The pattern of brain c-fosmRNA induced by a component of fox odor, 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT), in rats, suggests both systemic and processive stress characteristics. *Brain Res.* 1025(1-2), 139-151.
- de Kloet, E.R., Joels, M. y Holsboer, F.** (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 463-475.
- De Paula, H.M.G., Gouveia Jr., A., De Almeida, M.V. y Hoshino, K.** (2005). Anxiety levels and wild running susceptibility in rats: assessment with elevated plusmaze test and predator odor exposure. *Behav. Process.* 68 (2), 135-144.
- Dhabhar, F.S. y McEwen, B.S.** (1999). Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96 (3), 1059-1064.
- Dickens, M.J. y Romero, L.M.** (2013). A consensus endocrine profile for chronically stressed wild animals does not exist. *Gen. Comp. Endocrinol.* 191, 177-189.
- Dielenberg, R.A. Arnold, J.C. y Mcgregor, I.S.** (1999). Low-dose midazolam attenuates predatory odor avoidance in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 62, 197-201.

- Dielenberg, R.A. y McGregor, I.S.** (2001). Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25, 597-609.
- Dielenberg, R.A. y McGregor, I.S.** (1999). Habituation of the hiding response to cat odor in rats (*Rattus norvegicus*). *J. Comp. Psychol.* 113, 376–387
- Drake, A.J., Tang, J.I. y Nyirenda, M.J.** (2007). Mechanisms underlying the role of glucocorticoids in the early life programming of adult disease. *Clin. Sci.* 113(5), 219–232.
- El-Hage, W. y Belzung, C.** (2002). Unavoidable predatory stress in mice: an animal model of posttraumatic stress disorder. *Univ. de Tours*, 1-4.
- Emack, J., Kostaki, A., Walker, C.D. y Matthews, S.G.** (2008). Chronic maternal stress affects growth, behavior and hypothalamo-pituitary- adrenal function in juvenile offspring. *Horm. Behav.* 54, 514-520.
- Endres, T. y Fendt, M.** (2007). Conditioned behavioral responses to a context paired with the predator odor trimethylthiazoline. *Behav. Neurosci.* 121, 594-601.
- Ennaceur, A.** (2014). Tests of unconditioned anxiety - pitfalls and disappointments. *Physiol. Behav.* 135, 55-71.
- Epple, G., Mason, J.R., Nolte, D.L. y Campbell, D.L.** (1993). Effects of predator odors on feeding in the mountain beaver (*Aplodontia rufa*). *J. Mammal.* 74, 715-722.
- Estanislau, C. y Morato, S.** (2005). Prenatal stress produces more behavioral alterations than maternal separation in the elevated plus-maze and in the elevated T-maze. *Behav. Brain Res.* 163, 70-77.
- Fanjul, M.S. y Zenuto, R.** (2008). Female reproductive responses to photoperiod and male odours in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Acta Theriol.* 53, 73-85.
- Fanselow, M.S. y Ponnusamy, R.** (2007). Amygdala. *Encyclopedia of Stress* (ed G. Fink), pp. 161–165. Academic Press, London.
- Fendt, M., Endres, T., Lowry, C.A., Apfelbach, R. y McGregor, I.S.** (2005). “TMT induced autonomic and behavioral changes and the neural basis of its processing”. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 1145-1156.
- Ferrero, D.M., Lemon, J.K., Fluegge, D., Pashkovski, S.L., Korzan, W.J., Datta, S.R., Spehr, M., Fendt, M., Liberles, S.D.** (2011). Detection and avoidance of a carnivore odor by prey. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108, 11235-40.
- Figueiredo, H.F., Bodie, B.L., Tauchi, M., Dolgas, C.M. y Herman, J.P.** (2003). Stress integration after acute and chronic predator stress: differential activation of central stress circuitry and sensitization of the hypothalamopituitary-adrenocortical axis. *Endocrinol.* 144, 5249-5258.
- File, S.E., Zangrossi, H.Jr, Sanders, F.L. y Mabbutt, P.S.** (1993). Dissociation between behavioral and corticosterone responses on repeated exposures to cat odor. *Physiol. Behav.* 54, 1109-1111.

- Fonner, K.** (2015). Testing the predation stress hypothesis: behavioural and hormonal responses to predator cues in Allegheny Mountain dusky salamanders. *Behav.* 152, 797-819.
- Götz, A.A. y Stefanski, V.** (2007). Psychosocial maternal stress during pregnancy affects serum corticosterone, blood immune parameters and anxiety behaviour in adult male rat offspring. *Physiol. Behav.* 90, 108-115.
- Götz, A.A., Wittlinger, S. y Stefanski V.** (2007). Maternal social stress during pregnancy alters immune function and immune cell numbers in adult male Long–Evans rat offspring during stressful life-events. *J. Neuroimmunol.* 185, 95–102.
- Grissom, N. y Bhatnagar, S.** (2009). Habituation to repeated stress: get used to it. *Neurobiol. Learn. Mem.* 92, 215-224.
- Guo, A., Nappi, R.E., Criscuolo, M. Ficarra, G., Amram, A., Trentini, G.P., Petraglia, F. y Genazzani, A.R.** (1993). Effect of chronic intermittent stress on rat pregnancy and postnatal development. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 51, 41-55.
- Hegab, I.M. y Wei, W.** (2014). Neuroendocrine changes upon exposure to predator odors. *Physiol. Behav.* 131, 149–155.
- Hegab, I.M., Kong, S., Yang, S., Mohamaden, W.I. y Wei, W.** (2015). The ethological relevance of predator odors to induce changes in prey species. *Acta Ethol.* 18, 1-9.
- Hegab, I.M., Shang, G., Ye, M., Jin, Y., Wang, A., Yin, B., Yang, S. y Wei, W.** (2014). Defensive responses of Brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*) to chronic predatory stress. *Physiol. Behav.* 126, 1-7.
- Herman, J.P., Figueiredo, H., Mueller, N.K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M.M., Choi, D.C. y Cullinan, W.E.** (2003). Central mechanisms of stress integration: Hierarchical circuitry controlling hypothalamo–pituitary–adreno-cortical responsiveness. *Front. Neuroendocrinol.* 24, 151–180.
- Herman, J.P., Ostrander, M.M., Mueller, N.K. y Figueiredo, H.** (2005). Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 29, 1201–1213.
- Herman, C.S. y Valone, T.J.** (2000). The effect of mammalian predator scent on the foraging behavior of *Dipodomys merriami*. *Oikos.* 91, 139–145.
- Hik, D.S., Mc Coll, C.J. y Boonstra, R.** (2001). Why are Arctic ground squirrels more stressed in the boreal forest than in alpine meadows? *Ecoscience.* 8, 275- 288.
- Hogg, S. y File, S.E.** (1994). Responders and nonresponders to cat odor do not differ in other tests of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49, 219–222.
- Holmes, A. Parmigiani, S. Ferrari, P.F. Palanza, P. y Rodgers, R.J.** (2000). Behavioral profile of wild mice in the elevated plus-maze test for anxiety. *Physiol. Behav.* 71, 509-516.

- Ioannou, C.C., Payne, M. y Krause, J.** (2008). Predator effects on prey population dynamics in open systems. *Oecologia*. 157, 177–182.
- Jamie, G.A.** (2017). Signals, cues and the nature of mimicry. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 284(1849), 20162080.
- Johnston, A.L. y File, S.E.** (1991). Sex differences in animal tests of anxiety. *Physiol. Behav.* 49, 245–250.
- Johnstone, C.P. Reina, R.D. y Lill, A.** (2012). Interpreting indices of physiological stress in freelifving vertebrates: a review. *J. Comp. Physiol. B.* 182, 861–879.
- Jones, B.C., Smith, A.D., Bebus S.E. y Schoech, S.J.** (2016). Two seconds is all it takes: European starlings (*Sturnus vulgaris*) increase levels of circulating glucocorticoids after witnessing a brief raptor attack. *Horm. Behav.* 78, 72-78.
- Kacelnik, A. y Bateson, M.** (1996). Risky theories—the effects of variance on foraging decisions. *Am. Zool.* 36, 402-434.
- Kapoor, A. y Matthews, S.G.** (2005). Short periods of prenatal stress affect growth, behaviour and hypothalamo–pituitary–adrenal axis activity in male guinea pig offspring. *J. Physiol.* 566, 967-977.
- Kats, L.B. y Dill, L.M.** (1998). The scent of death: chemosensory assessment of predation risk by prey animal. *Ecoscience*. 5, 361-394.
- Kavaliers, M. y Choleris, E.** (2001). Antipredator responses and defensive behavior: ecological and ethological approaches for the neurosciences. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25, 577-586.
- Kavaliers, M., Wiebe, J.P. y Galea, L.A.M.** (1994). Reduction of predator odor-induced anxiety in mice by the neurosteroid 3 α -hydroxy-4-pregnen-20-one (3 α HP). *Brain Res.* 645, 325–329.
- Kay, G., Tarcic, N., Poltyrev, T. y Weinstock, M.** (1998). Prenatal stress depresses immune function in rats. *Physiol. Behav.* 63, 397-402.
- Kemble, E.D. y Bolwahn, B.L.** (1997). Immediate and long term effects of novel odors on risk assessment in mice. *Physiol. Behav.* 61, 543-549.
- Kittlein, M.J., Vassallo, A.I. y Busch, C.** (2001). Differential predation upon sex and age classes of tuco-tucos (*Ctenomys talarum* Rodentia: Octodontidae) by owls. *Mamm Biol*, 66, 281–289.
- Koolhaas, J.M., Meerlo, P., De Boer, S.F., Strubbe, J.H. y Bohus, B.** (1997). The temporal dynamics of the stress response. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 775–782.
- Kotler, B.P.** (1997). Patch use by gerbils in a risky environment: manipulating food and safety to test four models. *Oikos*. 78, 274-282.
- Krause, E.T. y Liesenjohann, T.** (2012). Predation pressure and food abundance during early life alter risk-taking behaviour and growth of guppies (*Poecilia reticulata*). *Behaviour*. 149, 1-14.
- Krebs, C.J., Boutin, S. y Boonstra, R.** (eds). (2001). *Ecosystem Dynamics of the Boreal Forest*. The Kluane Project. Oxford University Press, New York.

- Lagos, P.A., Meier, A., Tolhuysen, L.O., Castro, R.A., Bozinovic, F. y Ebensperger, L.A. (2009). Flight initiation distance is differentially sensitive to the costs of staying and leaving food patches in a small-mammal prey. *Can. J. Zool.* 87(11), 1016-1023(8).
- Laloux, C., Mairesse, J., Van Camp, G., Giovine, A., Branchi, I., Bouret, S., Morley-Fletcher, S., Bergonzelli, G., Malagodi, M., Gradini, R., Nicoletti, F., Darnaude, M. y Maccari, S. (2012). Anxiety-like behaviour and associated neurochemical and endocrinological alterations in male pups exposed to prenatal stress. *Psychoneuroendocrinol.* 37, 1646-1658.
- Leussis, M.P. y Bolivar, V.J. (2006). Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 30(7), 1045–1064.
- Lima S.L. (1998). Nonlethal effects in the ecology of predator-prey interactions. *Bioscience.* 48, 25–34.
- Lima, S. y Bednekoff, P. (1999). Temporal variation in danger drives antipredator behavior: The predation risk allocation hypothesis. *Am. Nat.* 153(6), 649-659.
- Lima, S.L. y Dill, L.M. (1990). Behavioral decisions made under the risk of predation: A review and prospectus. *Can. J. Zool.* 68, 619–640.
- Lordi, B., Patin, V., Protais, P., Mellier, C. y Caston, J. (2000). Chronic stress in pregnant rats: effects on growth rate, anxiety and memory capabilities of the offspring. *Int. J. Psychophysiol.* 37, 195-205.
- Lordi, B., Protais, P., Mellier, D. y Caston, J. (1997). Acute stress in pregnant rats: effects on growth rate, learning, and memory capabilities of the offspring. *Physiol. Behav.* 62, 1087-1092.
- Love, O.P., McGowan, P.O. y Sheriff, M.J. (2013). Maternal adversity and ecological stressors in natural populations: the role of stress axis programming in individuals, with implications for populations and communities. *Funct. Ecol.* 27, 81-92.
- Maccari S., Piazza, P.V., Kabbaj, M., Barbazanges, A., Simon, H. y Le Moal, M. (1995). Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. *J. Neurosci.* 15, 110-6.
- Malizia, A.I. y Busch, C. (1991). Reproductive parameters and growth in the fossorial rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *Mammalia.* 55 (2), 293-305.
- Malizia, A.I., Zenuto, R.R. y 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.
- Manaf, P. Morato, S. y Oliveira, E.S. (2003). Profile of wild Neotropical spiny rats (*Trinomys, Echimyidae*) in two behavioral tests. *Physiol. Behav.* 79, 129–133.
- Marin, M.T., Cruz, F.C. y Planeta, C.S. (2007). Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiol. Behav.* 90(1), 29–35.

- Mashoodh, R., Sinal, C.J. y Perrot-Sinal, T.S.** (2009). Predation threat exerts specific effects on rat maternal behaviour and anxiety-related behaviour of male and female offspring. *Physiol. Behav.* 96, 693–702.
- Masini, C.V. Sauer, S. y Campeau, S.** (2005). Ferret odor as a processive stress model in rats: neurochemical, behavioral, and endocrine evidence. *Behav. Neurosci.* 119, 280–292.
- Mastrángelo, M. Schleich, C.E. y Zenuto, R.R.** (2009). Short term effects of an acute exposure to predatory cues on the spatial memory performance in a subterranean rodent. *Anim. Behav.* 77, 685–692.
- Mateo, J.M.** (2007). Ecological and hormonal correlates of antipredator behavior in adult Belding's ground squirrels (*Spermophilus beldingi*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 62, 37–49.
- Maynard Smith, J., Harper, D.** (2003). *Animal signals*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Mackenzie, L., Nalivaiko, E., Beig, M.I., Day, T.A. y Walker, F.R.** (2010). Ability of predator odour exposure to elicit conditioned versus sensitised post-traumatic stress disorder-like behaviours, and forebrain deltaFosB expression, in rats. *Neuroscience*. 169(2), 733–742.
- McGhee, K.E., Pintor, L. M., Suhr, E.L. y Bell, A.M.** (2012). Maternal exposure to predation risk decreases offspring antipredator behaviour and survival in threespined stickleback. *Funct. Ecol.* 26(4), 932–940.
- McGregor, I. Schrama, L. Ambermoon, P. y Dielenberg, R.** (2002). Not all 'predator odours' are equal: cat odour but not 2,4,5 trimethylthiazoline (TMT; fox odour) elicits specific defensive behaviours in rats. *Behav. Brain Res.* 130 (1–2), 1–16.
- Meaney, M., Szyf, M. y Seckl, J.R.** (2007). Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health. *Trends Mol. Med.* 13, 269–277.
- Merlo, J.L., Cutrera, A.P. y R.R. Zenuto.** (2014). Inflammation in response to phytohemagglutinin injection in the Talas tuco-tuco (*Ctenomys talarum*): implications for the estimation of immunocompetence in natural populations of wild rodents. *Can. J. Zool.* 92, 689–697.
- Merlot, E., Couret, D. y Otten, W.** (2008). Prenatal stress, fetal imprinting and immunity. *Brain Behav. Immun.* 22, 42-51.
- Moll, R.J., Redilla, K.M., Mudumba, T., Muneza, A.B., Gray, S.M., Abade, L., Hayward, M.W., Millspaugh, J.J. y Montgomery, R.A.** (2017). The many faces of fear: a synthesis of the methodological variation in characterizing predation risk. *J. Anim. Ecol.* 86, 749-765.
- Monclús, R., Palomares, F., Tablado, Z., Martínez-Fontírbel, A. y Palme, R.** (2009). Testing the threat-sensitive predator avoidance hypothesis: physiological responses and predator pressure in wild rabbits. *Oecologia*. 158, 615–623.
- Monclús, R., Rödel, H.G. y von Holst, D.** (2006). Fox odour increases vigilance in European rabbits: a study under semi-natural conditions. *Ethol.* 112, 1186-1193.

- Monclús, R., Rödel, H.G., von Holst, D. y de Miguel, J.** (2005). Behavioural and physiological responses of naïve rabbits to predator odour. *Anim. Behav.* 70, 753–761.
- Monclús, R., Tiulim, J. y Blumstein, D.T.** (2011). Older mothers follow conservative strategies under predator pressure: the adaptive role of maternal glucocorticoids in yellow-bellied marmots. *Horm. Behav.* 60, 660–665.
- Montiglio, P.O, Garant, D. Thomas, D. y Réale, D.** (2010). Individual variation in temporal activity patterns in open-field tests. *Anim. Behav.* 80, 905–912.
- Morris, D.W. y Davidson, D.L.** (2000). Optimally foraging mice match patch use with habitat differences in fitness. *Ecology.* 81, 2061–2066.
- Müller, C., Jenni-Eiermann, S. y Jenni, L.** (2011). Heterophils/lymphocytes-ratio and circulating corticosterone do not indicate the same stress imposed on Eurasian kestrel nestlings. *Funct. Ecol.* 25, 566–576.
- Muñoz-Abellan, C. Andero, R. Nadal, R. y Armario, A.** (2008). Marked dissociation between hypothalamic–pituitary–adrenal activation and long-term behavioral effects in rats exposed to immobilization or cat odor. *Psychoneuroendocrinol.* 33, 1139–1150.
- Muñoz-Abellan, C., Armario, A. y Nadal, R.** (2010). Do odors from different cats induce equivalent unconditioned and conditioned responses in rats? *Physiol. Behav.* 99, 388–394.
- Muñoz-Abellán, C. Rabasa, C. Daviu, N. Nadal, R. y Armario, A.** (2011). Behavioral and endocrine consequences of simultaneous exposure to two different stressors in rats: interaction or independence? *PLoS One* 6 (6), e21426.
- Narayan, E., Cockrem, J.F. y Hero, J.M.** (2013). Are baseline and short-term corticosterone stress responses in free-living amphibians repeatable? *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 164, 21–28.
- Navarro-Castilla, A. y Barja, I.** (2014). Does predation risk, through moon phase and predator cues, modulate food intake, antipredatory and physiological responses in wood mice (*Apodemus sylvaticus*)? *Behav. Ecol. Sociobiol.* 68, 1505–1512.
- Nevo, E.** (1995). Mammalian evolution underground: the ecological–genetic–phenetic interfaces. *Acta Theriol.* 3, 9–31.
- Newman, A.E.M., Zanette, L.Y. Clinchy, M., Goodenough, N. y Soma, K.K.** (2013). Stress in the wild: Chronic predator pressure and acute restraint affect plasma DHEA and corticosterone levels in a songbird. *Stress.* 16(3), 363–367.
- Palanza, P.** (2001). Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25, 219–233.
- Papes, F., Logan, D.W. y Stowers, L.** (2010). The vomeronasal organ mediates interspecies defensive behaviors through detection of protein pheromone homologs. *Cell.* 141, 692–703.

- Patin, V., Lordi, B., Vincent, A. y Caston J.** (2005). Effects of prenatal stress on anxiety and social interactions in adult rats. *Develop. Brain Res.* 160(2), 265-74.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. y Briley, M.** (1985). Validation of open: closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14, 149-167.
- Perrot-Sinal, T.S., Ossenkopp, K.P. y Kavaliers, M.** (1999). Brief predator odour exposure activates the HPA axis independent of locomotor changes. *Neuro. Report.* 10, 775-780.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D. y R Core Team.** (2014). nlme: linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1-117. Available at <http://CRAN.R-project.org/package=nlme>.
- Powell, F. y Banks, P.B.** (2004). Do house mice modify their foraging behaviour in response to predator odours and habitat? *Anim. Behav.* 67, 753-759.
- Preisser, E.L. y Bolnick, D.I.** (2008). The Many Faces of Fear: Comparing the Pathways and Impacts of Nonconsumptive Predator Effects on Prey Populations. *PLoS One* 3 (6) e2465.
- Preisser, E.L., Bolnick, D.I., Benard, M.F.** (2005). Scared to death? The effects of intimidation in predator-prey interactions. *Ecology.* 86, 501-509.
- Pride, R.E.** (2005). Foraging success, agonism, and predator alarms: behavioral predictors of cortisol in *Lemur catta*. *Int. J. Primatol.* 26, 295–319.
- Reboreda, J.C. y Kacelnik.** (1991). Risk sensitivity in starlings: variability in food amount and food delay. *Behav. Ecol.* 2, 301-308.
- Reeder, D.M. y Kramer, K.M.** (2005) Stress in free-ranging mammals: integrating physiology, ecology, and natural history. *J. Mammal.* 86, 225–235.
- Reichman, O. y Smith, S.** (1990). Burrows and burrowing behavior by mammals. In: *Current Mammalogy* (Ed. by H. Genoways). 197-243.
- Reig, O.A. Busch, C. Ortells, O. y Contreras, J.L.** (1990). An Overview of Evolution, Systematics, Population Biology, Cytogenetics, Molecular Biology and Speciation in *Ctenomys*, in: E. Nevo, O.A. Reig (Eds.), *Evolution of Subterranean Mammals at the Organismal and Molecular Levels*, Allan R. Liss, Inc., New York, NY, pp. 71–96.
- Ricklefs, R.E. y Wikelski, M.** (2002). The physiology-life history nexus. *Trends Ecol. Evol.* 17, 462-468.
- Roberts, S. Gosling, L. Thornton, E. y McChung, J.** (2001). Scentmarking by male mice under the risk of predation. *Behav. Ecol.* 12, 698-705.
- Rodgers, R.J. y Dalvi, A.** (1997). Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 801–810.
- R Core Team.** (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

- Romero, L.M. (2004). Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research, *Trends Ecol. Evol.* 19 (5), 249–255.
- Romero, M., Dickens, M. y Cyr, N. (2009). The Reactive Scope Model — a new model integrating homeostasis, allostasis, and stress. *Horm. Behav.* 55, 375–389.
- Rotllant, D., Ons, S., Carrasco, J. y Armario, A. (2002). Evidence that metyrapone can act as a stressor: effect on pituitary–adrenal hormones, plasma glucose and brain *c-fos* induction. *Eur. J. Neurosci.* 16, 693–700.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M. y Munck, A.U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 21, 55–89.
- Sapolsky, R.M. (1992). Neuroendocrinology of the stress-response. In: Becker JB, Breedlove SM, Crews D (eds) *Behavioural endocrinology*. MIT Press, Cambridge, pp. 287-324.
- Sapolsky, R.M. (2002). Endocrinology of the stress response. *Behavioral Endocrinology*, 2nd edn (eds J.B. Becker, S.M. Breedlove, D. Crews & M. McCarthy), MIT Press, Cambridge, pp. 409-450.
- Schleich, C.E. (2010). Ontogeny of Spatial Working Memory in the Subterranean Rodent *Ctenomys talarum*. *Developmental Psychobiology.* 52, 592-597.
- Schleich, C.E. y Zenuto, R.R. (2007). Use of vegetation chemical signals for digging orientation in the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae), *Ethol.* 113, 573–578.
- Schleich, C.E., Zenuto, R.R. y Cutrera, A.P. (2015). Immune challenge but not dietary restriction affects spatial learning in the wild subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Physiol. Behav.* 139, 150-156.
- Schöpfer, H., Palme, R., Ruf, T. y Huber, S. (2012). Effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis function over two generations of guinea pigs (*Cavia aperea f. porcellus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 176 (1), 18-27.
- Schwanz, L.E., Previtali, M.A., Gomes-Solecki, M., Brisson, D. y Ostfeld, R. S. (2012). Immunochallenge reduces risk sensitivity during foraging in white-footed mice. *Anim. Behaviour.* 83, 155–161.
- Searle, K.R., Stokes, C.J. y Gordon I.J. (2008). When foraging and fear meet: using foraging hierarchies to inform assessments of landscapes of fear. *Behav. Ecol.* 19, 475-482.
- Severud, W.J., Belant, J.L., Bruggink, J.G. y Windels, S.K. (2011). Predator cues reduce American beaver use of foraging trails. *Human-Wildl. Interac.* 5, 296–305.
- Sheriff, M.J., Bell, A., Boonstra, R., Dantzer, B., Lavergne, S.G., McGhee, L.E., MacLeod, K.J., Winandy, L., Zimmer, C. y Love, O.P. (2017). Integrating ecological and evolutionary context in the study of maternal stress. *Integr. Comp. Biol.* 57, 437–449.

- Sheriff, M.J., Bosson, C.O., Krebs, C.J. y Boonstra, R.** (2009a). A non-invasive technique for measuring fecal cortisol metabolites in snowshoe hares (*Lepus americanus*). *J. Comp. Physiol. B.* 179, 305–313.
- Sheriff, M.J., Krebs, C.J. y Boonstra, R.** (2009b). The sensitive hare: sublethal effects of predator stress on reproduction in snowshoe hares. *J. Anim. Ecol.* 78, 1249–1258.
- Sheriff, M.J., Krebs, C.J. y Boonstra, R.** (2011). From process to pattern: how fluctuating predation risk impacts the stress axis of snowshoe hares during the 10-year cycle. *Oecologia.* 166, 593–605.
- Sheriff, M.J., McMahon, E.K., Krebs, C.J. y Boonstra, R.** (2015). Predator-induced maternal stress and population demography in snowshoe hares: the more severe the risk, the longer the generational effect. *J. Zool.* 296, 305–310.
- Sheriff, M.J. y Love, O.P.** (2013). Determining the adaptive potential of maternal stress. *Ecol. Lett.* 16, 271–280.
- Sheriff, M.J. y Thaler, J.S.** (2014). Ecophysiological effects of predation risk; an integration across disciplines. *Oecologia.* 176, 607–611.
- Shine, R. y Downes, S.J.** (1999). Can pregnant lizards adjust their offspring phenotypes to environmental conditions? *Oecologia.* 119, 1–8.
- Siepielski, A., Fallon, E. y Boersma, K.** (2016). Predator olfactory cues generate a foraging–predation trade-off through prey apprehension. *R. Soc. Open Sci.* 3(2), 150537, doi:10.1098/rsos.150537.
- Sikes, R.S. y The Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists.** (2016). Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education. *J. Mammal.* 97(3), 663–688.
- Silverin, B.** (1998). Behavioural and hormonal responses of the pied fly-catcher to environmental stressors. *Anim. Behav.* 55, 1411–1420.
- Smith, A.S., Lieberwirth, C. y Wang, Z.** (2013). Behavioral and physiological responses of female prairie voles (*Microtus ochrogaster*) to various stressful conditions. *Stress.* 16 (5), 531–539.
- Sobrian, S.K., Vaughn, V.T., Ashe, W.K., Markovic, B., Djuric, V. y Jankovic, B.D.** (1997). Gestational exposure to loud noise alters the development and postnatal responsiveness of humoral and cellular components of the immune system in offspring. *Environ. Res.* 73, 227–241.
- Sopinka, N.M., Patterson, L.D., Redfern, J.C., Pleizier, N.K., Belanger, C.B., Midwood, J.D., Crossin, G.T. y Cooke, S.J.** (2015). Manipulating glucocorticoids in wild animals: basic and applied perspectives. *Conserv. Physiol* 3: doi:10.1093/conphys/cov031.
- Staples, L.G.** (2010). Predator odor avoidance as a rodent model of anxiety: learning mediated consequences beyond the initial exposure. *Neurobiol. Learn. Mem.* 94, 435–445.

- Staples, L.G., McGregor, I.S. y Hunt, G.E.** (2009). Longlasting *FosB/DFosB* immunoreactivity in the rat brain after repeated cat odor exposure. *Neurosci. Lett.* 462, 157-161.
- Starkey, N.J. y Bridges, N.J.** (2010). The effects of acute, chronic and withdrawn progesterone in male and female Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) in two tests of anxiety. *Behav. Brain Res.* 207, 490–499.
- Storm, J.J. y Lima, S.L.** (2010). Mothers forewarn offspring about predators: a transgenerational maternal effect on behavior. *American Naturalist.* 175, 382–390.
- Sullivan, T. P., Nordstrom, L.O. y Sullivan, D.S.** (1985). Use of predator odors as repellents to reduce feeding damage by herbivores I. Snowshoe hares (*Lepus americanus*). *J. Chem. Ecol.* 11, 903–919.
- Sullivan, T.P. y Crump, D.** (1986). Feeding responses of snowshoe hares (*Lepus americanus*) to volatile constituents of red fox (*Vulpes fulpes*) urine. *J. Chem. Ecol.* 12,729–739.
- Sullivan, T. Crump, D. y Sullivan, D.** (1988). Use of predator odors as repellents to reduce feeding damage by herbivores: 4. Northern pocket gophers (*Thomomys talpoides*). *J. Chem. Ecol.* 14, 370–390.
- Sundell, J. y Ylönen, H.** (2004). Behaviour nad choice of refuge by voles under predation risk. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 56, 263-269.
- Suselbeek, L., Emsens W.J., HirschB.T., Kays R. y Rowcliffe J.M.** (2014). Food acquisition and predator avoidance in a Neotropical rodent. *Anim. Behav.* 88, 41-48.
- Takahashi, L.K. Nakashima, B.R. Hong, H. y Watanabe, K.** (2005). The smell of danger: a behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 1157–1167.
- Thomas, O.** (1898). Description of two Argentine rodents. *Annu. Mag. Nat. Hist. Ser 7.* 1, 283–286.
- Tidhar, W.L. Bonier, F. y Speakman, J.R.** (2007). Sex- and concentration-dependent effects of predator feces on seasonal regulation of body mass in the bank vole *Clethrionomys glareolus*. *Horm. Behav.* 52, 436–444.
- Toumi, M.L., Merzoug, S., Baudin, B. y Tahraoui, A.** (2013). Quercetin alleviates predator stress-induced anxiety-like and brain oxidative signs in pregnant rats and immune count disturbance in their offspring. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 107, 1–10.
- Tsigos, C. y Chrousos, G.P.** (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psychosom. Res.* 53(4), 865–871.
- Tuchscherer, M., Kanitz, E., Otten, W. y Tuchscherer, A.** (2002). Effects of prenatal stress on cellular and humoral immune responses in neonatal pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 86, 195–203.
- Vallee, M., Mayo, W., Dellu, F., Le Moal, M., Simon, H. y Maccari S.** (1997). Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. *J. Neurosci.* 17, 2626–2636.

- Vanbesien-Mailliot, C.C., Wolowczuk, I., Mairesse, J., Viltart, O., Delacre, M., Khalife, J., Chartier-Harlin, M.C. y Maccari, S.** (2007). Prenatal stress has pro-inflammatory consequences on the immune system in adult rats. *Psychoneuroendocrinol.* 32, 114–124.
- Vassallo, A. Kittlein, M. y Busch, C.** (1994). Owl predation on two sympatric species of tuco-tucos (Rodentia: Octodontidae). *J. Mammal.* 75, 725–732.
- Vasilieva, N.Y., Cherepanova, E.V. y Safranova, L.D.** (1999). Influence of Cat's Urinary Chemosignals on Sexual Maturation and Meiosis in Campbell's Hamster Males (*Phodopus campbelli*). In: *Advances in Chemical Signals in Vertebrates*. R.D. Johnston, Muller-Schwarze & P.W. Sorensen, (eds); pp. 445-455, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Vasilieva, N.Y. Cherepanova, E.V. von Holst, D.** (2000). Apfelbach, Predator odour and its impact on male fertility and reproduction in *Phodopus campbelli* hamsters, *Naturwissenschaften.* 87, 312–314.
- Vasilieva, N.Y., Parfenova, V. y Apfelbach, R.** (2001). The effect of predator odour on reproduction success in three rodent species. In: Pelz, H.-J., Cowan, D.P., Feare, C.J., (Eds.), *Advances in Vertebrate Pest Management II*. Filander, Fürth.
- Vera, F., Antenucci, C.D. y Zenuto, R.R.** (2011). Cortisol and corticosterone exhibit different seasonal variation and responses to acute stress and captivity in tuco-tucos (*Ctenomys talarum*), *Gen. Comp. Endocrinol.* 170, 550–557.
- Vera, F., Zenuto, R. y Antenucci, 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., Part A Mol. Integr. Physiol. Behav. Sci.* 151, 232–238.
- Vera, F., Zenuto, R.R. y Antenucci, C.D.** (2012). Differential responses of cortisol and corticosterone to adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in a subterranean rodent (*Ctenomys talarum*). *J. Exp. Zool. A Ecol. Genet. Physiol.* 317, 173-184.
- Vera, F., Zenuto, R. y Antenucci, C.D.** (2017). Expanding the actions of cortisol and corticosterone in wild vertebrates: A necessary step to overcome the emerging challenges. *Gen. Comp. Endocrinol.* 246, 337–353.
- Verplancke, G., Le Boulengé, É, Diederich, C.** (2010). Differential foraging in presence of predator and conspecific odors in bank voles: a field enclosure study. *Ecol. Res.* 25 (5), 973-981.
- Veru, F., Laplante, D.P., Luheshi, G. y King, S.** (2014). Prenatal maternal stress exposure and immune function in the offspring. *Stress.* 17, 133-148.
- Voelkl, B., Firth, J.A. y Sheldon, B.C.** (2016). Nonlethal predator effects on the turn-over of wild bird flocks. *Sci. Rep.* 6, 33476.

- Voigt, G.L.** (2000). Hematology techniques and concepts for veterinary technicians. Nueva York, USA: John Wiley & Sons.
- Walker, S.E., Zanoletti, O., Guillot de Suduiraut, I. y Sandi, C.** (2017). Constitutive differences in glucocorticoid responsiveness to stress are related to variation in aggression and anxiety-related behaviors. *Psychoneuroendocrinol.* 84, 1–10.
- Wallace, K.J. y Rosen, J.B.** (2000). Predator odor as an unconditioned fear stimulus in rats: elicitation of freezing by trimethylthiazoline, a component of fox feces. *Behav. Neurosci.* 114, 912-922.
- Weinberg, M.S., Bhatt, A.P., Girotti, M., Masini, C.V., Day, H.E., Campeau, S. y Spencer, R.L.** (2009). Repeated ferret odor exposure induces different temporal patterns of same-stressor habituation and novel-stressor sensitization in both hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and forebrain *c-fos* expression in the rat. *Endocrinol.* 150, 749-761.
- Weinstock, M.** (2008). The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32, 1073-1086.
- Williams, J.I., Baez, C., Hadky, K.J. y Camacho, C.A.** (2005). Effects of a synthetic predator odor (TMT) on freezing, analgesia, stereotypy, and spatial memory. *Psychol. Rec.* 55, 3-38.
- Wilson, D.A.** (2009). Olfaction as a model system for the neurobiology of mammalian short-term habituation. *Neurobiol. Lear. Mem.* 92, 199-205.
- Willson, J.D. y Hopkins, W.A.** (2011). Preymorphology constrains the feeding ecology of an aquatic generalist predator. *Ecology.* 92(3), 744–754.
- Wilson, C.A., Vazdarjanova, A. y Terry, A.V. Jr.** (2013). Exposure to variable prenatal stress in rats: Effects on anxiety-related behaviors, innate and contextual fear, and fear extinction. *Behav. Brain Res.* 238, 279–288.
- Wingfield, J.C.** (2005). The concept of allostasis: coping with a capricious environment. *J. Mammal.* 86, 248–254.
- Wingfield, J.C., Breuner, C., Jacobs, J., Lynn, S., Maney, D., Ramenofsky, M. y Richardson, R.** (1998). Ecological Bases of Hormone-behavior Interactions: the “Emergency Life History Stage”. *Amer Zool.* 38,191–206.
- Wingfield, J.C. y Sapolsky, R.M.** (2003). Reproduction and resistance to stress: when and how. *J. Neuroendocrinol.* 15, 711–724.
- Yin, B., Yang, S., Shang, G. y Wei, W.** (2017). Effects of predation risk on behavior, hormone levels, and reproductive success of plateau pikas. *Ecosphere* 8(1):e01643. 10.1002/ecs2.1643.
- Ylönen, H., Eccard, J.A., Jokinen, I. y Sundell, J.** (2006). Is the antipredatory response in behaviour reflected in stress measured in faecal corticosteroids in a small rodent? *Behav. Ecol. Sociobiol.* 60, 350–358.

- Zangrossi, H. y File, S.E.** (1992). Behavioral consequences in animal tests of anxiety and exploration of exposure to cat odor, *Brain Res. Bull.* 29, 381–388.
- Zangrossi, H. Jr. y File, S.E.** (1994). Habituation and generalization of phobic responses to cat odor. *Physiol. Behav.* 33, 189-194.
- Zapata, S.C., Procopio, D.E. y Travani, A.** (2015). Caviomorphs as prey: general patterns for mammalian carnivores and a local study for raptors in Patagonia. Pp 295-322, en: *Biology of caviomorph rodents: Diversity and Evolution* (D Antenucci y A Vasallo, eds.). SAREM series A: Investigaciones Mastozoológicas. Buenos Aires, Argentina.
- Zenuto, R.** (2010). Dear enemy relationships in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*: the role of memory of individual odours. *Anim. Behav.* 79, 1247-1255.
- Zenuto, R.R., Antinuchi, C.D. y Busch, C.** (2002). Bioenergetics of reproduction and pup development in a subterranean rodent (*Ctenomys talarum*). *Physiol. Biochem. Zool.* 75 (5), 469-478.
- Zenuto, R. R., Estavillo C. y Fanjul M.S.** (2007). Familiarity and mating behaviour in the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (tuco-tuco). *Can. J. Zool.* 85, 944–955.
- Zenuto, R., Fanjul, M.S. y Busch, C.** (2004). Use of chemical communication by subterranean rodent *Ctenomys talarum* during the reproductive season. *J. Chem. Ecol.* 30, 2111-2126.
- Zenuto, R.R., Malizia, A.I. y Busch, C.** (1999). Sexual size dimorphism and mating system in two populations of *Ctenomys talarum* (Rodentia, Octodontidae). *J. Nat. Hist.* 33, 305-314.
- Zenuto, R.R., Vassallo, A.I. y Busch, C.** (2001). A method for studying social and reproductive behavior of subterranean rodents in captivity. *Acta Theriol.* 46, 161-170.
- Zimmerberg, B. y Farley, M.** (1993). Sex differences in anxiety behavior in rats: role of gonadal hormones, *Physiol. Behav.* 54, 1119-1124.
- Zoladz, P.R. y Diamond, D.** Psychosocial predator stress model of PTSD based on clinically relevant risk factors for trauma-induced psychopathology. In: Bremner, JD (ed). *Posttraumatic stress disorder: From neurobiology to treatment*, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2016.