



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

CONDUCTA DE MARCAJE DEL
MENTÓN EN CONEJOS DOMÉSTICOS:
DOMINANCIA EN MACHOS Y
ELECCIÓN FEMENINA DE PAREJA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MARÍA DE LOURDES ARTEAGA CASTAÑEDA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ROBYN ELIZABETH HUDSON

COMITÉ TUTOR: DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN
DR. GABRIEL ROLDÁN ROLDÁN

MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

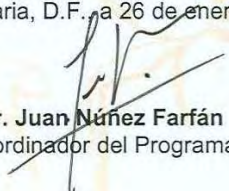
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de agosto de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORADO EN CIENCIAS** de la alumna **ARTEAGA CASTAÑEDA MARÍA DE LOURDES** con número de cuenta **504014826** con la tesis titulada **“Conducta de marcaje del mentón en conejos domésticos: dominancia en machos y elección femenina de pareja”**, realizada bajo la dirección de la **Dra. Robyn Elizabeth Hudson**:

Presidente: DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES
Vocal: DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN
Vocal: DRA. GABRIELA GONZÁLEZ MARISCAL
Vocal: DR. FRANCISCO AURELIO GALINDO MALDONADO
Secretario: DRA. ROBYN ELIZABETH HUDSON
Suplente: DR. GABRIEL ROLDÁN ROLDÁN
Suplente: DRA. IVETTE CALDELAS SÁNCHEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”
Cd. Universitaria, D.F., a 26 de enero de 2010.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

La realización de esta tesis fue posible gracias al financiamiento otorgado por CONACyT 124787 MLAC, Proyecto CONACyT 48692 RH, Apoyo para Asistencia a Congreso DGEP MLAC, ISDP NIH Travel Awardee, PROMEP UATLX-223 MLAC, PROMEP UATLX-EXB-156.

Esta tesis contó también con el apoyo académico del Comité Tutor, integrado por los Dres. Rosalinda Guevara y Gabriel Roldán.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

La realización de esta tesis requirió de apoyo académico y logístico que fue posible gracias a la participación de varias personas.

Robyn Hudson, directora de tesis.

Los Dres. Carolina Escobar, Gabriela González-Mariscal, Ivette Caldelas y Francisco Galindo, miembros del Jurado, por la cuidadosa revisión y valiosas sugerencias.

Los Dres. Carlos Cordero y Alejandro Córdoba, primer comité tutor, por sus valiosas críticas al trabajo.

Jorge Rodríguez Antolín y Margarita Martínez Gómez, líderes del grupo de investigación y gestores de todo aquello necesario para la realización de los trabajos que realiza nuestro grupo.

Amando Bautista Ortega, análisis estadísticos, gráficas y figuras.

Leticia Nicolás Toledo, determinación de niveles sanguíneos de testosterona.

Margarita Juárez Romero, realización de algunas pruebas conductuales.

Cecilia Cuatianquiz Lima, análisis de videos de conducta.

Laura García Rivera, aprovisionamiento de materiales y reactivos de laboratorio.

Carolina Rojas Castañeda, obtención de material bibliográfico.

Verónica Reyes Meza, Eliseo Cruz Sánchez, Humberto Pérez Roldán y Esmeralda García Torres críticas constructivas al trabajo y valiosas sugerencias.

Judith Galicia, Rebeca Sánchez López, Alejandro Díaz Xochicale, Graciela Fabris del Toro, Maribel Pérez Alarcón, apoyo administrativo.

Armando Gallegos Hernández, Sergio Márquez Cuauhtecatl y Saúl Hernández Tlapale, mantenimiento y limpieza de animales, arenas de observación y cuarto de conducta.

Miguel Ángel Morales, registro de peso corporal, cuidado de los animales.

En especial, dedico esta tesis a

*Cecavie Sánchez García
Eric Cecavie Sánchez Astorga
Jesús Lechipilli Frazedós Astorga
Andrea Fernanda Ielo Astorga
Sergio Astorga Castañeda
Lorena Astorga Castañeda
Liliana Astorga Castañeda
Sergio Astorga Enriquez
María de Lourdes Castañeda Nava*

También la dedico a

*María Elena Nava Gutiérrez
Vicente Castañeda
Cristina Enriquez
Manuel Astorga*

*Nicol Pérez Talavera
Sergio Astorga Pérez
Emilio Astorga Pérez
Lorena Angelina López Astorga
Mariana Navarrete Astorga
Gabriel Castro Merced
Antar Gabriel Castro Astorga
Emiliano Castro Astorga*

*Maura Andrea García
Francisco Nava y Mariela Luna
María Nava y Luz María Martínez
Verónica Sánchez García
Elsa García Mejía, esposa, hijos, nuera y nietos*

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	
ABSTRACT	
I INTRODUCCIÓN	1
1. Comunicación química en mamíferos.....	1
1.1. Marcaje odorífero, testosterona, competencia entre machos y territorialidad.....	1
1.2. Marcaje odorífero y elección femenina de pareja.....	3
2. Modelo de estudio: el conejo doméstico.....	4
2.1. Fuentes de olores.....	5
2.2. Conducta de marcaje por frotamiento del mentón.....	6
2.3. Testosterona en los machos del conejo.....	9
3. Hipótesis.....	11
4. Referencias.....	11
II SCENT MARKING, DOMINANCE AND SERUM TESTOSTERONE LEVELS IN MALE DOMESTIC RABBITS	16
III RESPUESTA DE LAS HEMBRAS DE CONEJO A LAS MARCAS DEL MENTÓN DE LOS MACHOS	17
Resumen.....	17
1. Introducción.....	18
2. Métodos.....	21
2.1. Animales.....	21
2.2. Procedimiento experimental.....	22
2.3. Análisis de datos.....	24
3. Resultados.....	25
4. Discusión.....	28
5. Referencias.....	32
IV PROPUESTA DE UN MÉTODO PARA REALIZAR PRUEBAS DE ELECCIÓN FEMENINA DE PAREJA EN CONEJOS	37
Resumen.....	37
1. Introducción.....	38
2. Descripción general del método para realizar pruebas de elección femenina de pareja en conejos.....	41
3. Métodos.....	41
3.1. Animales.....	41
3.2. Procedimiento experimental.....	42
3.3. Análisis de datos.....	45
4. Resultados.....	45
5. Discusión.....	49
6. Referencias.....	52
V COMENTARIO FINAL	55
ANEXO 1. COMUNICACIÓN QUÍMICA EN MAMÍFEROS DOMÉSTICOS	57
ANEXO 2. OLFACTORY GUIDANCE OF NIPPLE ATTACHMENT AND SUCKLING IN KITTENS OF THE DOMESTIC CAT: INBORN AND LEARNED RESPONSES	58



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

La presente tesis contiene cinco Capítulos y dos Anexos. El Capítulo I es una introducción a la comunicación química en los mamíferos, un medio de comunicación común en este grupo taxonómico. Las señales odoríferas que transmiten información entre los individuos, son típicamente mezclas complejas de moléculas y frecuentemente están involucradas en conductas tales como el marcaje territorial y elección de pareja. Usualmente, dichas señales están contenidas en las secreciones corporales, que pueden ser emitidas directamente o depositadas activamente sobre objetos o coespecíficos mediante conductas especializadas (marcaje odorífero). Las marcas odoríferas pueden proveer información sobre el individuo que realizó el marcaje, tal como sexo o nivel de andrógenos, se ha reportado que las hembras pueden utilizar dichas marcas para valorar la calidad de los machos cuando seleccionan pareja.

El conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) es una de las especies utilizadas en estudios pioneros sobre comunicación química en mamíferos. Su vida social depende fundamentalmente de las señales odoríferas, como lo sugieren varias glándulas odoríferas que posee y otras fuentes de estas señales como la orina o las heces, además utiliza una variedad de conductas de marcaje en un amplio rango de contextos sociales. Una de las conductas más conspicua es la de marcaje por frotamiento del mentón, en la que los animales de ambos sexos frota su barbilla sobre objetos o coespecíficos, impregnándolos así con la secreción de estas bien desarrolladas glándulas del mentón.

En el Capítulo II se presenta un trabajo publicado en la revista indexada *Physiology and Behavior*, en el que se planteó la hipótesis de que la frecuencia de marcaje por frotamiento del mentón en los machos sexualmente maduros indica dominancia social potencial y que ésta se correlaciona positivamente con la concentración de testosterona. Como se predijo, los machos mostraron diferencias individuales significativas y estables en la frecuencia de marcaje del mentón, ésta se correlacionó positivamente con dominancia en pruebas de confrontación social entre pares de machos y, aunque más débil, con los niveles de testosterona de los individuos. Entonces, se formuló la pregunta ¿responden fuertemente (o *prefieren*) las hembras a las marcas del mentón de estos machos marcadores, potencialmente dominantes?

Así, en el Capítulo III se reporta un estudio diseñado para probar la predicción de que las hembras sexualmente maduras podrían ser más atraídas a las marcas del mentón de los machos más activamente marcadores y dominantes que a las marcas de los machos subordinados del estudio previo (Capítulo II). Contrario a lo que se esperaba, las hembras no marcaron más con el mentón los objetos previamente marcados por machos “dominantes” en comparación con subordinados, y no visitaron más o pasaron más tiempo en el sitio de los objetos previamente marcados por los machos dominantes. De hecho, no respondieron diferencialmente a los objetos marcados *versus* control, no marcados. Se discuten las posibles razones, particularmente dificultades metodológicas, que explican la inesperada carencia de efecto de las marcas del mentón de los machos sobre la conducta de las hembras.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

En el Capítulo IV se presenta una propuesta para realizar pruebas de elección femenina de pareja en conejos, diseñada para corregir algunas de las dificultades discutidas en el Capítulo III. Utilizando una arena de doble elección, se propuso la predicción de que las hembras sexualmente maduras podrían pasar más tiempo en el sitio de un macho intacto sexualmente maduro, así como hacer más contactos con la nariz en la puerta divisora de malla de alambre del encierro del macho *versus* el sitio de uno castrado. De hecho, en presencia de los machos estímulo, las hembras marcaron con el mentón significativamente más, cambiaron de lado a lado en la arena con significativamente mayor frecuencia e hicieron significativamente más contactos con la nariz en la puerta que en las pruebas en las que los machos no estaban presentes. Sin embargo, contrario a lo esperado, las hembras no pasaron más tiempo en el lado del macho intacto, ni lo visitaron y marcaron con el mentón más, ni hicieron más contactos con la nariz en la puerta divisora *versus* el lado del macho castrado. Otra vez, se discuten las posibles razones de por qué las hembras no discriminaron, con este análisis conductual, entre los dos tipos de machos estímulo en esta prueba.

El Capítulo V provee una discusión general de la tesis en relación a las dificultades metodológicas y problemas conceptuales que aún asedian el área de la comunicación química en mamíferos, también se sugiere cómo afrontar tales dificultades en estudios futuros.

El Anexo I es una revisión sobre comunicación química en animales domésticos preparado como una de las actividades complementarias requeridas en el programa del Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM y publicado en la revista nacional indexada en el CONACYT *Veterinaria México*. El Anexo II es un reporte sobre comunicación química entre madre y cría durante el amamantamiento en el gato doméstico, escrito durante el periodo doctoral y publicado en la revista indexada *Developmental Psychobiology*. Los resultados apoyan la hipótesis de que las crías utilizan señales odoríferas, tanto feromonales como aprendidas, para localizar los pezones y succionar. Estos dos artículos revisan y exploran las posibles funciones y mecanismos de comunicación química en mamíferos como un complemento de tópicos similares explorados en la tesis.

ABSTRACT

The present work consists of five chapters and two appendices. Chapter I provides an introduction to chemical communication in mammals, a common but still poorly understood means of communication in this taxonomic group. Odiferous cues that transmit information between individuals are typically complex mixtures of molecules and are frequently involved in behaviors such as territorial marking and mate choice. They are usually contained in body secretions, and are either emitted directly into the atmosphere or actively deposited on objects or conspecifics by means of specialized behaviors (scent marking). Scent marks can provide information about the marker such as sex or androgen levels, and females are reported to assess the quality of males when selecting mates using such marks.

The European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) is one of the pioneer species in the study of mammalian chemical communication. Its social life depends importantly on such cues, as suggested by the various scent glands and other sources of odor signals such as urine and feces it employs using a variety of marking behaviors in a wide range of social contexts. One of the most conspicuous of these behaviors is chin marking, in which animals of both sexes rub their chin on objects or conspecifics, impregnating them with secretion from well-developed chin glands.

Chapter II reports a study published in the indexed journal *Physiology and Behavior* in which we hypothesized that the frequency of chin marking by sexually mature male rabbits indicates potential social dominance and correlates positively with serum testosterone. As predicted, males showed significant and stable individual differences in the frequency of chin marking, this was positively correlated with dominance behavior in pair-wise social confrontation tests, and – although less strongly – with individuals' testosterone levels. We then asked if females would respond more strongly to (“prefer”) the chin marks from such active-marking, potentially dominant males?

Chapter III thus reports a study designed to test the prediction that sexually mature female rabbits would be more attracted to the chin marks of the most actively marking, more dominant males of the previous study (Chapter II) than to the marks of the more subordinate males. Contrary to expectation, females did not chin-mark objects marked by “dominant” males more frequently than objects marked by “subordinate” males, and did not more frequently visit or spend more time in the vicinity of objects marked by dominant males. In fact, they did not respond differentially to marked *versus* unmarked, control objects. Possible reasons, particularly methodological difficulties, accounting for the unexpected lack of effect of male chin marks on the females' behavior are discussed.

Chapter IV presents a proposal for testing female mate choice in rabbits designed to overcome some of the difficulties discussed in Chapter III. Using a two-choice arena, we predicted that sexually mature females would spend more time on the side enclosing an intact, sexually mature male than on the side enclosing a castrated adult male. We also predicted that females would chin mark more often on the side with the intact male and would make nose contacts with the separating mesh divider more often than on the side with the castrated male. Indeed, in the presence of stimulus males the females chin marked significantly more frequently, changed sides in

the apparatus significantly more frequently, and made significantly more nose contacts with the mesh dividers than in control tests with no males present. However, contrary to expectation, they did not spend more time on the side of the arena with the intact male, nor visit it, chin mark there, or make nose contacts with the mesh divider more often than on the side with the castrated male. Again, we discuss possible reasons for the failure of females to differentiate behaviorally between the two types of stimulus males in this test.

Chapter V provides a general discussion of the thesis in relation to methodological difficulties and conceptual problems that still beset the area of chemical communication in mammals, as well as suggestions how to confront these in future studies.

Appendix I is a review on chemical communication in domestic animals prepared as one of the complementary activities required in the postgraduate program of Biological Sciences, UNAM, and published in the national, CONACYT-indexed journal *Veterinaria México*. Appendix II is a report on chemical communication between mother and young during suckling in the domestic cat, written during the doctoral period and now published in the indexed journal *Developmental Psychobiology*. The results support the hypothesis that kittens use odor cues, both pheromonal and learned, to locate nipples and suckle. These two articles thus review and explore possible functions and mechanisms of chemical communication in mammals as a compliment to similar issues explored in the thesis itself.

I INTRODUCCIÓN

1. Comunicación química en mamíferos

La comunicación por medio de sustancias químicas es común entre los mamíferos, cuyos sistemas sociales son complejos y utilizan dichas sustancias como señales odoríferas para transmitir información entre los individuos. Las señales odoríferas, generalmente mezclas complejas de moléculas, influyen profundamente la vida social de muchas especies de mamíferos. Por ejemplo, la mayoría puede reconocer a los miembros de su colonia o familia, discriminar entre uno y otro individuo, su sexo y estado reproductivo u otro estado fisiológico con base en el olor. Las señales odoríferas están contenidas en la orina, heces y secreciones de diversas glándulas cutáneas. Una de las funciones básicas que está profundamente influenciada por el olfato es la reproducción (Brown & MacDonald 1985, Arteaga *et al* 2007). Las primeras observaciones sobre la importancia de la olfacción en la reproducción en los mamíferos se realizaron en roedores, lagomorfos y ungulados. Por ejemplo, la orina de los ratones macho adultos contiene una feromona que induce el estro en las hembras (Whitten 1956 citado en Vandenberg 1983). Además, la orina de los machos contiene una feromona que acelera la pubertad en las hembras juveniles (Vandenberg 1967). En los hámsteres las hembras en estro despliegan conducta de marcaje vaginal cuando un macho se aproxima. El macho olfatea estas secreciones y despliega conducta copulatoria (Johnston 1975, 1977). Dichas señales odoríferas pueden ser emitidas o depositadas en el ambiente por medio de despliegues conductuales generalmente estereotipados. A éstos se les conoce como conductas de marcaje odorífero (Johnson 1973, Brown & MacDonald 1985).

1.1. Marcaje odorífero, testosterona, competencia entre machos y territorialidad

Según Dewsbury (1982), la dominancia es una asimetría agonística persistente entre dos individuos, él reconoció la dificultad que implica su evaluación. El 'rango de dominancia' podría emplearse para enfatizar el uso empírico de establecer entre individuos diferencias estables en su relación y discutió como se han utilizado diferentes patrones de conducta agonista para asignar tal rango. Dewsbury distinguió tres tipos de tales patrones: a) desplazamientos con respecto al espacio o a algún recurso; b) amenazas, vocalizaciones y gestos; y c) peleas. Se considera que para algunas especies, el rango social basado en el grado de dominancia está relacionado con la actividad copulatoria y la reproducción diferencial. Los individuos dominantes pueden tener ventajas sobre los subordinados para tener más apareamientos e incrementar su éxito reproductivo.

En algunas especies de mamíferos el individuo dominante puede reforzar su rango realizando marcaje odorífero, que es una forma común de señalización. En los machos el marcaje



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ocurre en dos contextos, marcaje territorial en el cual las marcas odoríferas son utilizadas en la delimitación del territorio o como una “amenaza”, y en sistemas de apareamiento por dominancia (Ralls 1971, Johnson 1973). Además, las marcas territoriales de los machos pueden proveer información general sobre el individuo que realizó el marcaje, tal como sexo, nivel de andrógenos (Gosling *et al* 1996) y la habilidad competitiva del emisor, es decir, la presencia o ausencia de marcas odoríferas dentro de un territorio indica la capacidad del residente para defenderlo y dominar a los competidores (Rich & Hurst 1999). Dichas marcas son colocadas en lugares estratégicos para interceptar al receptor (Parker 1974, Gosling 1990, Gosling & Roberts 2001).

Los individuos que entran en un territorio ocupado (intrusos) pueden olfatear las marcas e ignorarlas, permaneciendo más tiempo en el territorio, o bien, pueden evitarlas; ello dependerá de los costos y beneficios potenciales. Si los costos para el intruso son menores que los beneficios (como utilizar los recursos defendidos), entonces permanecerá más tiempo en el territorio. En contraste, cuando los costos para el intruso pueden ser bastante altos, como el riesgo de ser detectado y atacado por el propietario del territorio, entonces será mejor evitarlo. Por ejemplo, los topos (*Talpa europea*), que viven en túneles subterráneos, evitan las marcas de territorios vecinos, se ha discutido que posiblemente se debe a que realizar una huída en estos túneles es difícil y las peleas pueden ser costosas, ya que el intruso del territorio puede resultar herido (Stone & Gorman 1990).

Los costos de entrar en un territorio ocupado dependen de la habilidad competitiva del intruso. Por ejemplo, los machos del ratón (*Mus domesticus*) con bajo peso corporal evitaron el área artificialmente marcada con orina de otros machos donadores con los que nunca habían interactuado; en contraste, los machos pesados fueron atraídos al área marcada. El estudio propone que posiblemente estos machos pueden tener menores posibilidades de resultar dañados, si ocurriera una contienda con el propietario del área, así que defender el recurso valía la pena para los machos pesados (Gosling *et al* 1996). Los ratones también pueden evitar las marcas de orina en una arena experimental pequeña que no contiene recursos y con marcas frescas que pueden indicar que el propietario del territorio regresará pronto (Jones & Novell 1973a, b, 1989, Sawyer 1978).

Algunos estudios proponen que los intrusos pueden valorar a sus oponentes potenciales mediante tres mecanismos: 1) utilizar información intrínseca de las propias marcas, 2) aprender el olor de las marcas de un oponente con el que se ha enfrentado previamente y 3) utilizar las marcas previamente asociadas con un individuo para identificar al propietario del territorio (Gosling 1982, 1990).

Los machos contramarkan cualquier marca de otro macho que esté en su territorio (Hurst 1990). Rich y Hurst (1998) han propuesto que el contramarcaje es un mecanismo de competencia entre machos de territorios vecinos, ya que las hembras de roedores son más atraídas al olor de un macho propietario de un territorio, marcado exclusivamente por él, y muestran conducta sexual cuando interactúan con ese macho.

Además, otro estudio realizado con ratas de la cepa Long-Evans demostró que las hembras exhibían una notable preferencia para aparearse con machos dominantes en comparación con los subordinados. Los resultados del mismo estudio sugieren que la dominancia tiene ventajas para los machos al incrementar su adecuación de dos formas; los machos dominantes compiten exitosamente por las hembras e inhiben la conducta de apareamiento de los subordinados, además, los machos dominantes son más “atractivos” para las hembras (Carr *et al* 1982).

En conclusión, la información disponible en mamíferos, aunque casi exclusivamente sobre roedores, sugiere que las señales químicas son de vital importancia en la elección femenina de pareja (Gosling & Roberts 2001).

1.2. Marcaje odorífero y elección femenina de pareja

Existen atributos por los que las hembras son atraídas y pueden utilizarlos para seleccionar un macho, como la capacidad para dominar a rivales o indicadores de condición fisiológica, entre otros (Kavaliers & Colwell 1995, Rich & Hurst 1998). El alto rango social, el tamaño corporal grande, la buena condición física y la buena habilidad para forrajear pudieran ser atributos interrelacionados y atractivos a las hembras, ya que los machos son capaces de dominar a sus rivales si son fuertes y están bien alimentados, no podrían tener esos atributos a menos que consuman cantidades suficientes de alimento y no se debiliten por causa de enfermedades y parásitos (Freeland 1981). Se ha propuesto que las hembras se verían beneficiadas si adquieren la base genética de determinados atributos de los machos y la transmiten a sus crías. Sus crías podrían ser dominantes, tener éxito reproductivo y podrían beneficiarse adquiriendo resistencia a las enfermedades o buena habilidad para forrajear.

Se ha argumentado también que las hembras de mamíferos pueden valorar la calidad de los machos por medio de sus marcas odoríferas. Existe evidencia de que las hembras responden a la información contenida en las marcas odoríferas, muestran respuestas fisiológicas y preferencias conductuales en relación con la familiaridad y rango social del macho donador de olor.

Por ejemplo, las hembras de los ratones (*Mus musculus*) eligen como pareja machos cuyas marcas odoríferas predominan en el sitio (Rich & Hurst 1999) y no eligen a los machos subordinados (Hurst 1987). También utilizan el olor mediado por el complejo principal de genes de histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés “*major histocompatibility complex*”) para seleccionar machos en relación a su parentesco genético (Yamazaki *et al* 1994, Jordan & Bruford 1998) y utilizan el olor para distinguir entre machos saludables y enfermos (Penn & Potts 1998). Las hembras son atraídas a los machos por medio de sus marcas odoríferas con orina y son capaces de discriminar el olor de un macho parasitado de aquel no parasitado, siendo más atraídas hacia el olor de machos no parasitados (Kavaliers & Colwell 1995). Las hembras utilizan las marcas odoríferas para comparar el olor de un macho con las marcas previamente encontradas

en el ambiente para seleccionar así compañeros de apareamiento (Rich & Hurst 1998, 1999). Los resultados encontrados en un estudio realizado por Reece-Engel (1988) sugieren los mismos resultados en las hembras del conejo europeo, cabe mencionar que dichos resultados se obtuvieron con solo dos machos y seis hembras.

A pesar de los estudios arriba mencionados realizados principalmente con roedores, falta explorar mejor el papel de las señales químicas en la elección femenina de pareja. El conejo europeo es un buen modelo de mamífero para realizar estudios sobre comunicación química en la elección femenina de pareja, ya que posee diversas fuentes de olores y probablemente algunos de estos olores en los machos deben ser utilizados por las hembras para evaluar a una pareja potencial. El estudio de Reece-Engel (1988) previamente referido, no menciona algún olor en particular de los machos que las hembras pudieran haber utilizado para discriminar entre éstos.

2. Modelo de estudio: el conejo doméstico

El conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) es una especie que depende fundamentalmente de las señales odoríferas para regular su vida social. Es un modelo clásico de mamífero en el campo y el laboratorio para estudios de fisiología y conducta. Además, es una de las especies empleadas en estudios pioneros de comunicación química (Mykytowycz 1962, 1964, 1965, 1966a, b, c, 1968, Mykytowycz & Dudzinski 1966, Hesterman & Mykytowycz 1968, Mykytowycz & Gambale 1969).

Los conejos son animales nocturnos, gregarios y territoriales, generalmente viven en pequeños grupos (8-10 individuos de ambos sexos) relativamente permanentes. Cada grupo ocupa un territorio donde construye un sistema de madrigueras con diversas entradas. Los machos del grupo y algunas veces las hembras defienden su territorio (von Holst *et al* 1999). Éste es marcado con orina, heces de consistencia dura combinadas con las secreciones de las glándulas anales depositadas sobre superficies planas llamadas letrinas, que sirven como centros de comunicación entre los individuos (Mykytowycz 1968, Mykytowycz & Gambale 1969).

Las relaciones de dominancia se establecen por medio de encuentros agresivos (Bell 1980). Cuando un macho dominante es desplazado, entre los machos ocurren nuevas interacciones agresivas y generalmente el segundo en la jerarquía ocupa el lugar (Mykytowycz 1964). La territorialidad está estrechamente relacionada con la organización social y la reproducción. Al inicio de la temporada reproductiva machos y hembras de un grupo establecen una jerarquía de dominancia intrasexo. Los conejos constantemente refuerzan su jerarquía mediante persecuciones a los otros miembros del grupo (Mykytowycz 1965). Al inicio de la temporada reproductiva las peleas por el territorio son más intensas y disminuyen durante el transcurso de la temporada, después sólo es suficiente una conducta ritualizada (correr en paralelo y rascar) para prevenir que los intrusos entren en el territorio (von Holst *et al* 1999).

El rango social influye la conducta de los animales; machos y hembras dominantes despliegan con mayor frecuencia conductas ofensivas contra los miembros del grupo de su mismo

sexo. Los machos dominantes tienen acceso a las hembras y participan en más interacciones sociopositivas con las hembras de su grupo. También, algunos parámetros fisiológicos son diferentes entre los animales del grupo y están relacionados con el rango social. Los machos dominantes son más pesados y presentan niveles bajos de corticosteroides, que están asociados con menor estrés; también, tasas bajas de ritmo cardíaco en comparación con los subordinados. Además, el éxito reproductivo es mayor en los machos dominantes, el 90% de las crías son sus hijos. Las hembras de alto rango tienen una fecundidad (número de crías nacidas) más alta y la mortalidad de sus crías es menor (von Holst *et al* 1999, von Holst *et al* 2002).

2.1. Fuentes de olores

Las diversas fuentes de señales químicas que poseen los conejos sugieren la importancia de la comunicación química en esta especie. Así, la orina, las heces y las secreciones de diversas glándulas cutáneas (Fig. 1) contienen señales odoríferas que sirven para identificar el rango social, el estado reproductivo, también sirven para distinguir a los miembros del grupo y de los extraños y para marcar el territorio (Mykytowycz 1970, Black-Cleworth & Verberne 1975, Bell 1980, 1985, Hayes *et al* 2002a, b).

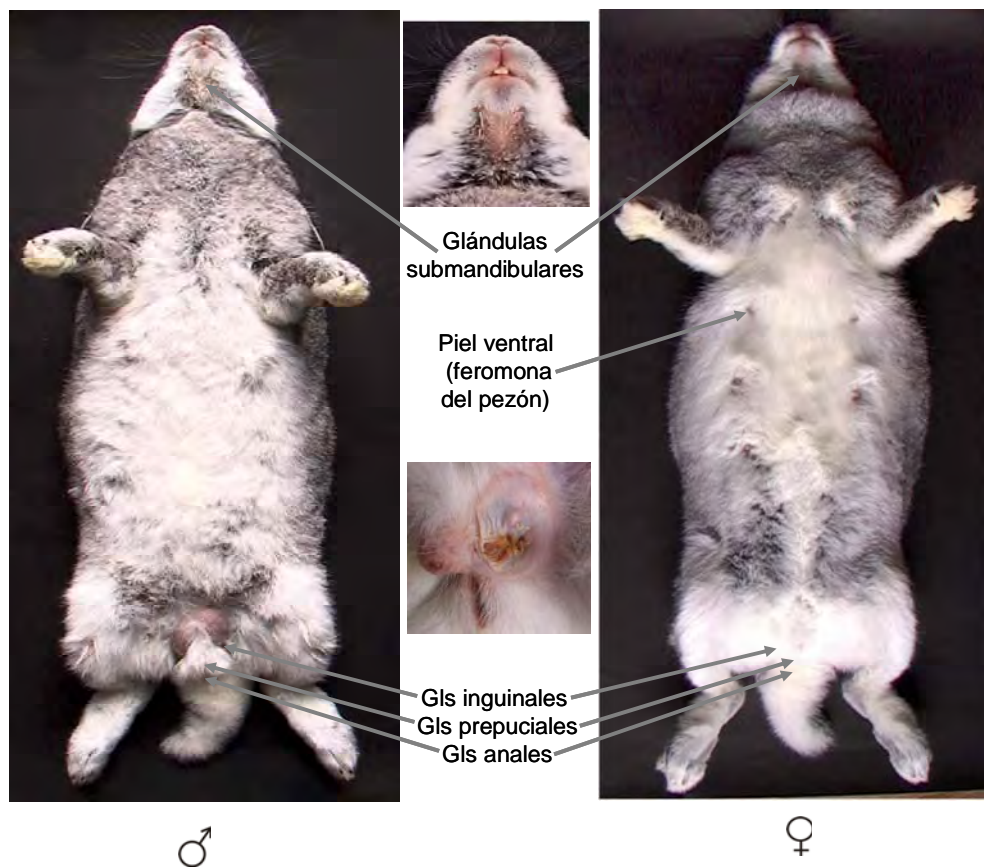


Fig. 1. Fuentes de señales químicas en el conejo.

Un ejemplo de glándulas cutáneas son las submandibulares o del mentón, presentes en ambos sexos y utilizadas en la comunicación química. Éstas son sudoríparas con secreción apocrina que se desarrollan a partir de folículos pilosos y se localizan en cada lado de la mandíbula. Cada una está compuesta de tres grupos de lóbulos, dos grupos laterales profundos situados en la parte interna de la capa muscular y un grupo situado más superficialmente en la hipodermis externa y unido por la línea media con el grupo contralateral correspondiente. Los lóbulos de cada grupo forman una sola masa glandular, cada lóbulo con su propio conducto secretor que llega hasta la superficie de la piel y con los conductos de los lóbulos de los tres grupos arreglados en forma de “V” sobre la barbilla (Fig. 2 A, B; Lyne *et al* 1964).

Se conoce poco sobre la composición química de la secreción de estas glándulas, aunque las técnicas de electroforesis indican que las proteínas son su constituyente principal. Se han encontrado también trazas de lípidos y carbohidratos (Goodrich & Mykutowycz 1972), así como constituyentes volátiles unidos a las proteínas. Cuando la secreción es depositada en el ambiente, los volátiles son liberados lentamente de las proteínas (Müller-Schwarze & Silverstein 1980). Además, se ha identificado un compuesto fijador (2-fenoxietanol) que posiblemente participe en la liberación gradual de señales volátiles (Hayes *et al* 2003). Los conejos de ambos sexos depositan la secreción de las glándulas submandibulares sobre los objetos por medio de una conducta estereotipada conocida como conducta de marcaje por frotamiento del mentón, que se describe a continuación.

2.2. Conducta de marcaje por frotamiento del mentón

Las superficies que no son marcadas con orina y heces, como las entradas de las madrigueras, hojas, pastos, raíces y heces de otros animales, son marcadas con la secreción de las glándulas submandibulares mediante la conducta de marcaje por frotamiento del mentón. Ésta es una de las formas conductuales más sobresalientes en los conejos de ambos sexos, consiste en que el animal frota su mentón sobre objetos o coespecíficos impregnándolos así con la secreción glandular; usualmente esta conducta es precedida por olfateo exploratorio; a pesar de la domesticación, aparentemente esta conducta no difiere de la de los conejos silvestres (Fig. 2 C, D; Mykutowycz 1964, Mykutowycz 1965, Mykutowycz *et al* 1976).

Conducta de marcaje por frotamiento del mentón en los machos. A partir de los años cincuenta se realizaron diversos estudios conductuales para determinar la función de ésta conducta. Se utilizaron poblaciones de animales silvestres y se concluyó que los machos despliegan dicha conducta principalmente para la delimitación, establecimiento y mantenimiento de su territorio (Mykutowycz 1962, 1965, Hayes *et al* 2002a, b). En los machos adultos el marcaje del mentón también ocurre después de los encuentros agresivos entre éstos y durante el cortejo el macho puede marcar a la hembra con la secreción de sus glándulas submandibulares. Los individuos

juveniles también son marcados por el macho para facilitar la aceptación de éstos por el grupo (Mykytowycz 1965).

En el laboratorio se ha observado que la frecuencia de marcaje en ambos sexos incrementa cuando están presentes las marcas odoríferas de coespecíficos (Martínez-Gómez *et al* 1997). Diversos estudios sugieren que en ambos sexos existen marcadas diferencias individuales en la frecuencia de marcaje del mentón (Martínez-Gómez *et al* 1997, Arteaga 2002).

El aumento de tamaño de las glándulas del mentón ocurre en la pubertad, cuando se hace evidente el marcaje territorial en los animales jóvenes (Mykytowycz 1965). En los machos adultos la frecuencia de marcaje por frotamiento del mentón alta se relaciona con niveles altos de testosterona. La castración de los machos antes de la pubertad produce en el animal adulto que las glándulas sean más ligeras y menos activas (Wales & Ebling 1971). Los estudios en el laboratorio muestran que en los animales adultos la castración reduce la frecuencia de marcaje por frotamiento del mentón, estos efectos se revierten si se administra testosterona. Estos resultados sugieren que dicha conducta depende ampliamente de los esteroides gonadales (Chirino *et al* 1993, González-Mariscal *et al* 1993, Martínez-Gómez *et al* 1997).

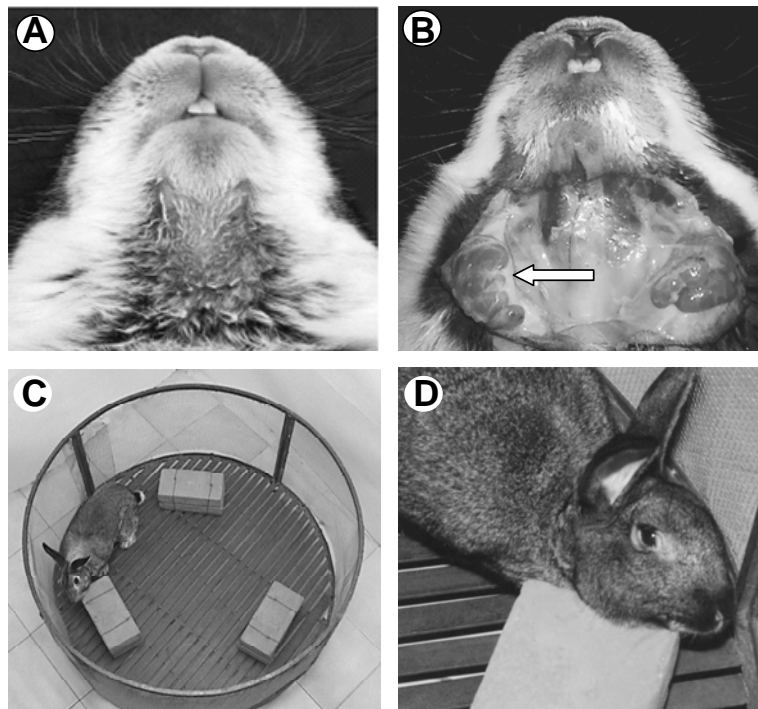


Fig. 2. A) Vista ventral de la cabeza de un macho adulto con el pelo impregnado con las secreciones de las glándulas submandibulares. **B)** Piel retraída después de realizar una incisión medial para mostrar los lóbulos de las glándulas submandibulares (flecha), éstas se han desplazado de su posición medial normal. **C)** Arena de observación que contiene tres bloques utilizados para realizar la prueba conductual de marcaje por frotamiento del mentón. **D)** Macho marcando con el mentón un bloque.

Conducta de marcaje por frotamiento del mentón en las hembras. Esta conducta en las hembras adultas está influenciada por su estado reproductivo. Durante el estro la frecuencia de marcaje es alta, después del apareamiento disminuye. Durante la gestación y lactancia la frecuencia es baja, aumenta inmediatamente después del parto y al destete. Así, se propone que esta conducta es un componente e indicador de estro (Soares & Diamond 1982, González-Mariscal *et al* 1990, Hudson *et al* 1990, Hudson & Vodermyer 1992). Los cambios en la conducta de marcaje son concomitantes a los que ocurren con la apariencia de la vulva. Es decir, se observa que los labios de la vulva aumentan de tamaño y adquieren una coloración más intensa al mismo tiempo que incrementa la frecuencia de marcaje, de la misma manera se observa que la vulva disminuye de tamaño y tiene una apariencia pálida al mismo tiempo que la frecuencia de marcaje disminuye. Cuando los días son largos (16 h luz por 8 h de oscuridad) se presenta el estro e incrementa la frecuencia de marcaje; cuando los días son cortos el estro se suprime y se reduce el marcaje (Hudson & Vodermyer 1992). También se ha determinado que las hembras son capaces de discriminar las marcas del mentón de coespecíficos hembras y machos según el estado hormonal de éstos. Las hembras frotan el mentón más sobre objetos que han sido previamente marcados por machos que por hembras, también marcan más los objetos marcados por coespecíficos mantenidos en días largos que en días cortos, ya que en su hábitat nativo en Europa la duración de los días es mayor en la estación reproductiva. Además, marcan los objetos impregnados con la secreción de las glándulas del mentón más que con orina (Hudson & Distel 1990, Hudson & Vodermyer 1992).

Efecto de los esteroides gonadales sobre la histología de las glándulas submandibulares en ambos sexos. Dichas hormonas tienen efecto sobre la histología de las glándulas submandibulares en ambos sexos (Cerbón *et al* 1996). Como se ha mencionado en un párrafo anterior, las glándulas submandibulares están compuestas por un lóbulo central y dos laterales, cada lóbulo está formado por túbulos en los que se han identificado tres tipos de células: 1) tipo A que son células no vacuoladas, 2) tipo B que son vacuoladas y secretoras, y 3) oscuras. Las glándulas submandibulares de los machos están compuestas por dos tipos de túbulos, vacuolados y no vacuolados, las mismas glándulas en las hembras están formadas sólo por túbulos no vacuolados (Lyne *et al* 1964). Las células oscuras están presentes en ambos sexos y son más numerosas en los machos que en las hembras (Mykytowycz 1965). El diámetro de los túbulos es menor en las hembras que en los machos dominantes, además, la castración en los machos reduce el diámetro de los túbulos y el grosor del epitelio secretor (Mykytowycz 1965, Wales & Ebling 1971), dicho efecto es revertido por la administración de testosterona (Wales & Ebling 1971).

En las hembras, la ovariectomía produce un aumento en el diámetro de los túbulos y en el grosor del epitelio secretor (Mykytowycz 1965). La estructura y actividad de las glándulas submandibulares varía a través del ciclo reproductivo, es decir, durante el estro, gestación y lactancia (Cerbón *et al* 1996).

Se ha estudiado el efecto de la etapa del ciclo reproductivo en las hembras sobre tres parámetros histológicos que pueden reflejar la actividad secretora de las glándulas

submandibulares, número y diámetro de los acini (un acino es la unidad funcional de las glándulas exocrinas, donde se produce la secreción, en plural acini) y presencia de secreción apocrina. En las glándulas submandibulares de las hembras, el diámetro de los acini es menor en comparación con los machos. Dichas glándulas de las hembras en estro muestran un número significativamente más alto de acini, en comparación con las mismas glándulas de hembras gestantes y lactantes. El porcentaje de acini con secreción apocrina aumenta en las glándulas submandibulares de hembras preparturientas en comparación con aquellas de las hembras en estro, dicho porcentaje disminuye en las lactantes. La ovariectomía reduce el número de acini/campo de observación, reduce el porcentaje de acini con secreción apocrina e incrementa su diámetro.

En los machos, la castración reduce el número de acini y disminuye su diámetro. Los resultados muestran que existe dimorfismo sexual en la histología de las glándulas submandibulares y que los esteroides gonadales participan en su regulación fisiológica (Cerbón *et al* 1996).

Se ha investigado la presencia de receptores a estrógenos y progesterona en las células de los acini de las glándulas submandibulares en hembras y machos adultos. Los receptores a estas hormonas se observan en el núcleo de las células acinares. Las hembras en estro, ovariectomizadas y ovariectomizadas tratadas con benzoato de estradiol muestran variación en el número de células con receptores a estradiol. Las hembras en estro tienen el número más alto de estas células, las ovariectomizadas muestran un ligero incremento y las ovariectomizadas tratadas con benzoato de estradiol muestran una disminución significativa en el número de células con receptores a estradiol. Las células con receptores a progesterona son más abundantes en las hembras en estro en comparación con las ovariectomizadas. La administración de benzoato de estradiol a las hembras ovariectomizadas aumenta el número de células con receptores a progesterona (Camacho-Arroyo *et al* 1999). Estos resultados sugieren que el estado hormonal de las hembras regula la actividad secretora de las glándulas del mentón.

Los machos intactos muestran un número significativamente menor de células con receptores a estradiol y de células con receptores a progesterona en comparación con las hembras en estro. Estos hallazgos sugieren que las glándulas submandibulares son un tejido blanco para el estradiol y la progesterona, y que el tipo de regulación hormonal de estas glándulas es diferente al de las hembras (Camacho-Arroyo *et al* 1999). Cabe mencionar que falta realizar estudios sobre receptores a testosterona en las células de estas glándulas en ambos sexos.

2.3. Testosterona en los machos del conejo

En los machos de mamíferos la testosterona está asociada con diversas funciones tales como la espermatogénesis, expresión de características sexuales secundarias, actividad de glándulas odoríferas, así como con algunas conductas como el marcaje territorial, conducta agresiva y sexual. En los machos del conejo doméstico, diversos estudios han reportado niveles basales de

testosterona (prom. \pm e.e.) 45 ± 7.7 $\mu\text{g}/100$ ml (Saginor & Horton 1968), 1.16 ± 0.26 ng/ml (Schanbacher & Ewing 1975), 2.92 ± 1.35 ng/ml (Farabollini 1987), 4.97 ± 0.99 ng/g (Castro *et al* 2002), 5.29 ± 1.06 ng/ml (Briganti *et al* 2003). También se han reportado los siguientes rangos, 0.9 – 11.9 nmol/litro (Reece-Engel 1988), 0.3 – 10.0 ng/ml (Silván *et al* 1990), 0.51 – 9.16 ng/g (Castro *et al* 2002), 0.26 – 5.16 ng/ml (Arteaga *et al* 2008; Capítulo 2).

La concentración de testosterona es variable entre los individuos (Younglai *et al* 1976, Castro *et al* 2002) y también puede variar de acuerdo a diversos factores, por ejemplo, la concentración disminuye con la castración (Saginor & Horton 1968, Castro *et al* 2002). Los estímulos sociales durante las interacciones agonistas entre machos, pueden producir cambios en la concentración de testosterona. En los conejos domésticos liberados en encierros al aire libre, se ha reportado que antes de la interacción con otros machos, la testosterona se correlaciona positivamente con la actividad motora, después de la interacción con otros machos la testosterona se correlaciona positivamente con la conducta sexual y rascado (Farabollini 1987, Girolami *et al* 1997).

Se ha reportado que la concentración sanguínea de testosterona aumenta después de la formación de jerarquías sociales en machos dominantes y disminuye en los de rangos bajos (Farabollini 1987, Girolami *et al* 1997, Briganti *et al* 2003). Briganti y sus colaboradores (2003) permitieron la interacción de un grupo de machos en un encierro, los separó después en cajas individuales y les administró propionato de testosterona (PT). Después del tratamiento con PT se observó un aumento significativo en el marcaje, rascado y conducta defensiva en todos los animales independientemente del rango social. Cuando los colocó nuevamente juntos dentro del encierro, observó que en los machos de alto rango aumentó la frecuencia de conductas agonistas (persecución, ataque, mordida) e interactiva (aproximarse, olfatear, acicalar a un coespecífico), además se enfatizaron las diferencias de rango. También, las conductas defensiva y territorial incrementaron en los machos tratados con PT, finalmente el rango social no cambió con la administración de éste.

Reece (1985 citado en Bell 1986) reportó en conejos europeos silvestres, que la concentración de testosterona es más alta en los machos dominantes al inicio de la temporada de reproducción, y que en los individuos de segundo rango la concentración aumenta al final de la temporada.

En presencia de una hembra receptiva el nivel de testosterona aumenta y más aún cuando el macho copula con ésta (Saginor & Horton 1968, Bell 1986, Farabollini 1987). Después de dicha interacción con la hembra receptiva los niveles de testosterona aumentan significativamente en los machos dominantes en comparación con los subordinados (Reece 1985 citado en Bell 1986).

Otro factor que contribuye a la variación de la concentración de testosterona en los machos es el ciclo luz/oscuridad a que estén sometidos en el laboratorio; por ejemplo, mantenidos con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad la concentración aumenta a lo largo del día (Silván *et al* 1990).

Castro y sus colaboradores (2002), mostraron que los niveles sanguíneos de testosterona se correlacionan positivamente con el número de células de Leydig, y sugieren que el aumento de testosterona en sangre puede deberse al incremento de estas células secretoras.

Con base en estos antecedentes surgen las siguientes preguntas ¿Existen diferencias individuales en la frecuencia de marcaje por frotamiento del mentón en los machos? ¿Son estables estas diferencias? ¿Es el marcaje por frotamiento del mentón un indicador intrínseco de dominancia en los machos? ¿Está asociado con los niveles sanguíneos de testosterona? ¿Son atraídas las hembras a las marcas del mentón de los machos dominantes? ¿Qué método puede utilizarse para evaluar las preferencias de las hembras?

3. Hipótesis

1. La frecuencia de marcaje por frotamiento del mentón es un indicador de dominancia en los machos del conejo doméstico.
2. Las hembras utilizan el olor de las marcas del mentón para evaluar la “calidad” de los machos para elegir parejas potenciales.

4. Referencias

Arteaga ML (2002) Papel del sistema vomeronasal en la percepción de las señales químicas contenidas en la secreción de las glándulas submandibulares de coespecíficos en el conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*). Tesis de maestría. Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana. Jalapa, México.

Arteaga ML, Martínez-Gómez M, Guevara-Guzmán R, Hudson R (2007) Comunicación química en mamíferos domésticos. *Vet Méx* 38:105-123.

Arteaga L, Bautista A, Martínez-Gómez M, Nicolás L, Hudson R (2008) Scent marking, dominance and serum testosterone levels in male domestic rabbits. *Physiol Behav* 94:510-515.

Bell DJ (1980) Social olfaction in lagomorphs. *Symp Zool Soc Lond* 45:141-164.

Bell DJ (1985) The rabbits and hares: order Lagomorpha. En Brown R, MacDonald D (Eds) *Social odours in mammals*. Vol 1, Clarendon Press, Oxford. Pp 507-530.

Bell DJ (1986) Social effects on physiology in the European rabbit. *Mammal Rev* 16: 131-137.

Black-Cleworth P, Verberne G (1975) Scent-marking, dominance and flehmen behavior in domestic rabbits in an artificial laboratory territory. *Chem Senses Flav* 1:465-494.

Briganti F, Della Seta D, Fontani G, Lodi L, Lupo C (2003) Behavioral effects of testosterone in relation to social rank in male rabbits. *Aggr Behav* 29:269-278.

Brown RE, Macdonald DW (1985) *Social odours in mammals*. Vol 1 y 2, Oxford, Clarendon Press.

- Camacho-Arroyo I, Cerbón MA, Gamboa-Domínguez A, González-Agüero G, González-Mariscal G (1999) Immunocytochemical detection of estrogen and progesterone receptors in the rabbit submandibular gland. *Comp Biochem Physiol* 123:179-186.
- Carr WJ, Kimmel KR, Anthony SL, Schlocker DE (1982) Female rats prefer to mate with dominant rather than subordinate males. *Bull Psychon Soc* 20:89-91.
- Castro ACS, Berndtson WE, Cardoso FM (2002) Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cells and spermatogenic efficiency of rabbits. *Braz J Med Biol Res* 35:493-498.
- Cerbón MA, Camacho-Arroyo I, Gamboa-Domínguez A, González-Mariscal G (1996) The rabbit submandibular gland: sexual dimorphism, effects of gonadectomy, and variations across the female reproductive cycle. *J Comp Physiol A* 178:351-357.
- Chirino R, González-Mariscal G, Carrillo P, Pacheco P, Hudson R (1993) Effect of removing the chin gland on chin marking behavior in male rabbits of the New Zealand race. *Z Säugetierkunde (actualmente Mamm Biol)* 58:116-121.
- Dewsbury DA (1982) Dominance rank, copulatory behavior, and differential reproduction. *Quart Rev Biol* 57:135-159.
- Farabollini F (1987) Behavioral and endocrine aspects of dominance and submission in male rabbits. *Aggr Behav* 13:247-258.
- Freeland WJ (1981) Parasitism and behavioral dominance among male mice. *Science* 213:461-462.
- Girolami L, Fontani G, Lodi L, Lupo C (1997) Agonistic behavior, plasma testosterone, and hypothalamic estradiol binding in male rabbits. *Aggr Behav* 23:33-40.
- González-Mariscal G, Melo AI, Zavala A, Beyer C (1990) Variations in chin-marking behavior of New Zealand female rabbits throughout the whole reproductive cycle. *Physiol Behav* 48:361-365.
- González-Mariscal G, Melo A I, Zavala A, Chirino R, Beyer C (1993) Sex steroid regulation of chin marking behavior in male New Zealand rabbits. *Physiol Behav* 54:1035-1040.
- Goodrich BS, Mykytowycz R (1972) Individual and sex differences in the chemical composition of pheromone-like substances from the skin glands of the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *J Mammal* 53:540-548.
- Gosling LM (1982) A reassessment of the function of scent marking in territories. *Z Tierpsychol (actualmente J Comp Physiol)* 60:89-118.
- Gosling LM (1990) Scent marking by resource holders: Alternative mechanisms for advertising the costs of competition. En Macdonald DW, Natynczuk S, Müller-Schwarze (Eds) *Chemical signals in vertebrates* 5. Oxford University Press, Oxford. Pp 315-328.
- Gosling LM, Atkinson NW, Collins SA, Roberts RJ, Walters RL (1996) Avoidance of scent-marked areas depends on the intruder's body size. *Behaviour* 133:491-502.
- Gosling LM, Roberts SC (2001) Scent-marking by male mammals: cheat-proof signals to competitors and mates. En Slater PJB, Rosenblatt JS, Snowdon CT, Roper TJ (Eds) *Advances in the study of behavior* Vol 30. Academic Press, New York, Vol 30. Pp 169-217.
- Hayes RA, Richardson BJ, Wyllie SG (2002a) Semiochemicals and social signaling in the wild European rabbit in Australia. I. Scent profiles of chin gland secretion from the field. *J Chem Ecol* 28:363-384.

- Hayes RA, Richardson BJ, Claus SC, Wyllie SG (2002b) Semiochemicals and social signaling in the wild European rabbit in Australia. II. Variations in chemical composition of chin gland secretion across sampling sites. *J Chem Ecol* 28:2613-2625.
- Hayes RA, Richardson BJ, Wyllie SG (2003) To fix or not to fix: the role of 2-phenoxyethanol in rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, chin gland secretion. *J Chem Ecol* 29:1051-1064.
- Hesterman ER, Mykytowycz R (1968) Some observations on the odours of anal gland secretions from the rabbit, *Oryctolagus cuniculus* (L.). *CSIRO Wildl Res* 13:71-81.
- Hudson R, Distel H (1990) Sensitivity of female rabbits to changes in photoperiod as measured by pheromone emission. *J Comp Physiol A* 167:225-230.
- Hudson R, González-Mariscal G, Beyer C (1990) Chin-marking behavior, sexual receptivity and pheromone emission in steroid-treated, ovariectomized rabbits. *Horm Behav* 24:1-13.
- Hudson R, Vodermyer T (1992) Spontaneous and odour-induced chin marking in domestic female rabbits. *Anim Behav* 43:329-336.
- Hurst JL (1987) Behavioural variation in wild house mice (*Mus domesticus* Ratty): a quantitative assessment of female social organization. *Anim Behav* 35:1846-1857.
- Hurst JL (1990) Urine marking in populations of wild house mice *Mus domesticus* Ratty. I. Communication between males. *Anim Behav* 40:209-222.
- Johnson RP (1973) Scent marking in mammals. *Anim Behav* 21:521-535.
- Johnston RE (1975) Scent marking by male golden hamsters (*Mesocricetus auratus*): I. Effects of odors and social encounters. *Z Tierpsychol (actualmente Mamm Biol)* 37:75-98.
- Johnston RE (1977) The causation of two scent-marking behaviour patterns in female hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Anim Behav* 25:317-327.
- Jones RB, Novell NW (1973a) Aversive and aggression-promoting properties of urine from dominant and subordinate male mice. *Anim Learn Behav* 1:207-210.
- Jones RB, Novell NW (1973b) Aversive effects of the urine of a male mouse upon the investigatory behaviour of its defeated opponent. *Anim Behav* 21:707-710.
- Jones RB, Novell NW (1989) Aversive potency of urine from dominant and subordinate male laboratory mice (*Mus musculus*): resolution of a conflict. *Aggr Behav* 15:291-296.
- Jordan WC, Bruford MW (1998) New perspectives on mate choice and the MHC. *Heredity* 81:127-133.
- Kavaliers M, Colwell DD (1995) Discrimination by female mice between the odours of parasitized and non-parasitized males. *Proc R Soc L* 261:31-35.
- Lyne AG, Molyneux GS, Mykytowycz R, Parakkal PF (1964) The development, structure and function of the submandibular cutaneous (chin) gland in the rabbit. *Aust J Zool* 12:340-348.
- Martínez-Gómez M, Guarneros M, Zempoalteca R, Hudson R (1997) A comparison of spontaneous and odour-induced chin marking in male and female domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Ethology* 103:893-901.
- Müller-Schwarze D, Silverstein RM (1980) Chemical signals: vertebrates and aquatic invertebrates. Plenum Press, New York.

- Mykytowycz R (1962) Territorial function of chin gland secretion in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus* (L.). Nature Lond 193:799.
- Mykytowycz R (1964) Territoriality in rabbit populations. Aust Nat Hist 14:326-329.
- Mykytowycz R (1965) Further observations on the territorial function and histology of the submandibular cutaneous (chin) gland in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus* (L.). Anim Behav 13:400-412.
- Mykytowycz R (1966a) Observations of odoriferous and other glands in the Australian wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, and the hare, *Lepus europaeus*. I. The anal gland. CSIRO Wildl Res 11:11-29.
- Mykytowycz R (1966b) Observations of odoriferous and other glands in the Australian wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, and the hare, *Lepus europaeus*. II. The inguinal glands. CSIRO Wildl Res 11:49-64.
- Mykytowycz R (1966c) Observations of odoriferous and other glands in the Australian wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, and the hare, *Lepus europaeus*: P. III. Harder's, lachrymal, and submandibular glands. CSIRO Wildl Res 11: 65-90.
- Mykytowycz R (1968) Territorial marking by rabbits. Sci Am 218:116-126.
- Mykytowycz R (1970) The role of skin glands in mammalian communication. En Johnson JW, Moulton DG, Turk A (Eds) Advances in chemoreception. I. Communication by chemical senses. Appleton-Century-Crofts, New York. Pp 327-360.
- Mykytowycz R, Dudzinski ML (1966) A study of the weight of odiferous and other glands in relation to social status and degree of sexual activity in the wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus* (L.). CSIRO Wildl Res 11:31-47.
- Mykytowycz R, Gambale S (1969) The distribution of dunghills and the behaviour of free-living rabbits, *Oryctolagus cuniculus* (L.), on them. Forma et Functio 1:333-349.
- Mykytowycz R, Hesterman ER, Gambale S, Dudzinski ML (1976) A comparison of the effectiveness of the odors of rabbits, *Oryctolagus cuniculus*, in enhancing territorial confidence. J Chem Ecol 2:13-24.
- Parker GA (1974) Assessment strategy and the evolution of fighting behaviour. J Theor Biol 47:223-243.
- Penn D, Potts WK (1998) Chemical signals and parasite-mediated sexual selection. Trends Ecol Evol 13:391-396.
- Ralls K (1971) Mammalian scent marking. Science 171:443-449.
- Reece C (1985) Aspects of reproduction in the European rabbit. PhD Thesis, University of East Anglia, UK.
- Reece-Engel C (1988) Female choice of resident male rabbits *Oryctolagus cuniculus*. Anim Behav 36:1241-1242.
- Rich TJ, Hurst JL (1998) Scent marks as reliable signals of the competitive ability of mates. Anim Behav 56:727-735.
- Rich TJ, Hurst JL (1999) The competing countermarks hypothesis: reliable assessment of competitive ability by potential mates. Anim Behav 58:1027-1037.

- Saginer M, Horton R (1968) Reflex release of gonadotropin and increased plasma testosterone concentration in male rabbits during copulation. *Endocrinology* 82:627-630.
- Sawyer TF (1978) Aversive odours of male mice: experiential and castration effects, and the predictability of the outcomes of agonistic encounters. *Aggr Behav* 4:263-275.
- Schanbacher BD, Ewing LL (1975) Simultaneous determination of testosterone, 5 α -androstane-17 β -ol-3-one, 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol and 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol in plasma of adult male rabbits by radioimmunoassay. *Endocrinology* 97:787-792.
- Silvan G, Illera JC, Martin J, Manjon R, Illera M (1990) Variaciones fotoperiodicas de las concentraciones plasmaticas de testosterona en conejo. *Revista Esp Fisiol* 46:177-182.
- Soares MJ, Diamond M (1982) Pregnancy and chin marking in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Anim Behav* 30:941-943.
- Stone RD, Gorman ML (1990) Mutual avoidance by European moles *Talpa europea*, En Macdonald DW, Natynczuk S, Muller-Schwarze (Eds) *Chemicals signals in vertebrates 5*. Oxford University Press, Oxford. Pp 367-377.
- Vandenbergh JG (1967) Effect of the presence of a male on the sexual maturation of female mice. *Endocrinol* 81:345-349.
- Vandenbergh JG (1983) *Pheromones and reproduction in mammals*. Academic Press, New York.
- von Holst D, Hutzelmeyer H, Kaetzke P, Khaschei M, Schonheiter R (1999) Social rank, stress, fitness, and life expectancy in wild rabbits. *Naturwissenschaften* 86:388-393.
- von Holst D, Hutzelmeyer H, Kaetzke P, Khaschei M, Rodel HG, Schrutka H (2002) Social rank, fecundity and lifetime reproductive success in wild European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Behav Ecol Sociobiol* 51:245-254.
- Wales NAM, Ebling FJ (1971) The control of the apocrine glands of the rabbit by steroid hormones. *J Endocrinol* 51:763-770.
- Whitten W (1956) Modification of the oestrus cycle of the mouse by external stimuli associated with the male. *J Endocrinol* 13:399-404.
- Yamazaki K, Beauchamp GK, Shen FW, Bard J, Boyse EA (1994) Discrimination of odortypes determined by the major histocompatibility complex among outbred mice. *Proc Natl Acad Sci* 91:3735-3738.
- Younglai EV, Moor BC, Dimond P (1976) Effects of sexual activity on luteinizing hormone and testosterone levels in the adult male rabbit. *J Endocr* 69:183-191.

II SCENT MARKING, DOMINANCE AND SERUM TESTOSTERONE LEVELS IN MALE DOMESTIC RABBITS

El trabajo que a continuación se presenta se publicó a partir de los datos conductuales de marcaje por frotamiento del mentón y confrontaciones entre pares de machos, así como de datos fisiológicos (concentración de testosterona en plasma sanguíneo) que se obtuvieron de machos del conejo doméstico de la raza chinchilla.

Los resultados mostraron que entre los animales existen diferencias individuales significativas en la frecuencia de marcaje por frotamiento del mentón. Estas diferencias fueron estables durante el tiempo que duró el estudio. Además, la frecuencia de marcaje por frotamiento del mentón se correlacionó con indicadores conductuales y fisiológicos de dominancia (montas en confrontaciones entre machos y concentraciones sanguíneas de testosterona).



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Scent marking, dominance and serum testosterone levels in male domestic rabbits

Lourdes Arteaga^a, Amando Bautista^a, Margarita Martínez-Gómez^{a,b}, Leticia Nicolás^a, Robyn Hudson^{b,*}

^a Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala-Universidad Nacional Autónoma de México, Tlaxcala 90070, Mexico

^b Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 June 2007

Received in revised form 7 February 2008

Accepted 6 March 2008

Keywords:

Chin marking

Scent glands

Social confrontation

Oryctolagus cuniculus

ABSTRACT

The European rabbit, both in its wild and domesticated forms, has been a pioneer species in the study of mammalian chemical communication, and illustrates well the difficulty of understanding the functional significance of these often complex signals. Here we investigate the performance of one of the rabbit's most conspicuous chemical signaling behaviors, chin marking (chinning), and the hypothesis that this expresses social dominance. In tests of 21 chinchilla-strain sexually mature males we predicted 1) that animals would show marked and stable individual differences in the frequency of chinning, 2) that these differences would correlate with behaviors associated with dominance such as intrasexual mounting, and 3) that individual differences in the frequency of chinning and dominance-related behaviors would correlate with individual differences in a commonly used physiological indicator of dominance, concentration of serum testosterone. Supporting these predictions and consistent with previous reports, animals showed large and stable individual differences in the frequency of chinning which correlated with the behavioral indicators of dominance and less strongly, with serum testosterone. As our animals had been kept in single cages and without direct contact with other males since weaning, these findings raise the question as to how and when during development such differences among individuals arise. We are currently investigating the possible relation between pups' intrauterine position, postnatal competition among littermates for milk and thermally advantageous positions in the litter huddle, and later differences in indicators of dominance such as those reported here.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Mammals, many of which are mainly nocturnal, use chemical signals to communicate in a wide range of contexts: to mark territories, select mates, signal danger, identify members of the social group, to locate nipples or teats, and of particular interest here, to evaluate the social status, actual or potential, of conspecifics [reviewed in [1,11]]. A good example is the European rabbit *Oryctolagus cuniculus*, a pioneer species in the study of mammalian chemical communication [34,37,7,8]. In addition to the urine and feces used by many mammals for chemical communication, rabbits possess a notable array of odoriferous skin glands [53,36–38,44,7,8,30]. Of these the chin glands have been best studied, probably because of the conspicuous and readily quantifiable chin-marking behavior (referred to here as chinning) used by rabbits of both sexes to deposit secretion from these glands on objects in the environment [[34,35,31,38,53, 9,44,46,19–22,27–29,12–14], summary in [32]].

In males, studies both in nature and the laboratory suggest the importance of chinning for territorial defense and in signaling the social dominance characteristic of rabbit social groups [34,35,9,39, 40,7,47,17,18,50–52,23,24]. Consistent with these not mutually exclusive functions [cf. [7]], castration reduces aggression among males (own observations), changes chin-gland morphology, reduces gland size and secretory activity, and reduces or eliminates chinning, whereas testosterone replacement reverses such effects [53,20,21,14,13,32].

It was our aim here to extend previous studies by investigating the relation between individual differences among male rabbits in the frequency of chinning and behavioral and physiological indicators of dominance, as well the stability of such differences across time. Following previous studies we used the frequency of intrasexual mounting among pairs of males as a behavioral indicator of dominance [rabbits: [9,47,17]; other mammals: summary in [41]], and levels of serum testosterone as a physiological indicator of aggressiveness and dominance [rabbits: [18,10]; other mammals: summaries in [33,50]]. As part of an on-going project investigating the early developmental origins of individual differences in rabbit physiology and behavior [15,4–6,42], we used sexually mature males that had been raised without post-weaning contact with other males. We predicted: 1) that animals would show marked and stable individual differences in the frequency of chinning, 2) that individual differences in the frequency of chinning

* Corresponding author. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, Distrito Federal 04510, Mexico. Tel.: +52 55 5622 3828; fax: +52 55 5550 0044.

E-mail address: rhudson@biomedicas.unam.mx (R. Hudson).

would correlate with behaviors indicative of dominance, and 3) that individual differences in the frequency of chinning and dominance-related behaviors would correlate with individual differences in concentrations of serum testosterone.

2. Methods

We collected data between December 2005 and January 2007 from chinchilla-strain domestic rabbits bred and maintained at the Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Tlaxcala, Mexico. Throughout the study, animals were kept and handled according to the guidelines for the treatment of animals in research of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and according to the current laws of Mexico.

2.1. Animals

We used 21 sexually experienced males, mean 11.42, SD 0.92 months old and weighing mean 3.84, SD 0.43 kg; body weights did not differ significantly at the start and end of the experimental series (paired *t*-test: $t=0.87$, $df=20$, $p=0.43$). Animals were kept in the colony room in individual stainless steel cages 90×60×40 cm high, and on a constant 16:8 h light:dark cycle to approximate conditions at the height of the summer breeding season for rabbits in their native Europe [27]; rabbits respond behaviorally and physiologically to even small changes in photoperiod [reviewed in [25,26,28,29]]. Ambient temperature was maintained at 20±4 °C, water was available continuously, and 150 g of Purina rabbit chow per animal was provided daily, sufficient to maintain the animals in good physical condition without them becoming overweight. Extraction fans provided ventilation in the windowless vivarium. Depending on the availability of animals and due to the limited number that could be feasibly tested at any one time (see below), the 21 males were divided into three cohorts of five, seven and nine individuals.

2.2. Experimental procedure

For each animal we obtained three sets of measures: concentrations of serum testosterone, frequency of chinning, and behavior in paired confrontation tests pitting every male against every other male of the same cohort. The schedule for testing each of the three cohorts is summarized in Fig. 1 and consisted of the following steps:

Habituation. At the start of the experiment we placed each animal individually in an empty test arena for 10 min for five consecutive days (Fig. 1). The arena was a circular wire mesh enclosure 1 m in diameter and was located in a separate, quiet room. These and all subsequent sessions were conducted throughout the day, balancing the number of morning and afternoon sessions for each individual.

Testosterone. On the day after the habituation phase and on two subsequent occasions during the test series (Fig. 1) we took 1 ml of blood from the central ear vein of each animal. The first sample was to determine baseline values of serum testosterone before the animals had encountered other test animals, and the two further samples were taken immediately before and after the second block of confrontations to test whether these affected hormone concentrations. All samples were taken in the late morning to control for possible effects of time of day. The blood was left to coagulate at room temperature for 45 min,

Treatment	H	T1	M1	C1	M2	T2	C2	T3	M3	C3
Duration (days)	5	1	5	5, 7, 9	5	1	5, 7, 9	1	5	5, 7, 9

Fig. 1. Sequence of testing each of the three cohorts: H = habituation to the test arena; T = blood taken to measure testosterone; M = tests of chin-marking behavior; C = confrontation tests between pairs of males. Different numbers of test days for the paired confrontations were due to differences in the number of animals in the three cohorts. Time between each block of tests varied but was always at least 2 days.

centrifuged at 3500 rpm for 15 min and the serum stored at -30 °C. After extraction with diethyl ether, concentrations of testosterone in the serum were determined in duplicate and standards in triplicate by ELISA, using the same kit (Active® Testosterone EIA DSL-10-4000, Diagnostic Systems Laboratories, Webster, Texas, USA) for all samples from the same cohort. Unfortunately, due to problems during storage, samples from cohort three had to be discarded and analysis based on the values from the 12 animals of cohorts one and two. The intra- and interassay coefficients of variation were 4.5 and 6.3%, respectively.

Chinning. Two days after taking the first blood sample and on two subsequent occasions during the test series (Fig. 1) we placed the animals individually in pseudorandom order (see *Habituation* above) for 10 min a day for five consecutive days in the test arena, which now contained three 15-cm high bricks arranged in a triangle 0.5 m apart [19–22,27–29,14,32]. The number of times an animal rubbed its chin across a brick was recorded. Fresh, unmarked bricks were used for each test with each animal. To investigate the stability of individual differences in chinning frequency we conducted three such five-day tests at least one week apart (Fig. 1). At the end of each test day, including confrontation tests (see below), the arena was thoroughly washed with detergent.

Paired confrontations. Two days after the first tests of chinning and on two subsequent occasions during the test series (Fig. 1) we placed animals in pseudorandom order for 10 min a day in the arena without the bricks but together with another member of their cohort. Pairs of test animals were determined in such a way that all animals were paired with each other once but so that each animal was only tested once a day. This meant that the five animals of the first cohort were each tested in four confrontations, the seven animals of the second cohort in six confrontations, and the nine animals of the third cohort in eight confrontations. Thus it took between 5 and 9 days to complete one full series of confrontation tests depending on the size of the cohort. As for chinning, we investigated the stability of individual differences in behavior during these tests by conducting three confrontation series, each at least one week apart (Fig. 1). Trials were recorded using a digital video camera (Sony HANDYCAM DCR-HC32) mounted 2 m above the arena. Recordings were transferred to a PC using the program Windows Movie Maker 2.1 (Microsoft) and analyzed using the behavioral program Noldus Observer XT 6.0. The number of aggressive, dominance-related behaviors such as biting, scratching, boxing and chasing, as well as the number of intrasexual mounts performed by each member of each pair were scored [35,9,47,17].

Animals were weighed each week to the nearest 20 g as part of general colony management.

2.3. Data analysis

As the behavioral measures were recorded as frequencies and the measures of testosterone were not normally distributed, values for these variables are given as medians and interquartile ranges, and were analyzed using non-parametric tests. Results of the confrontation tests (number of confrontations won) are presented as percentages to take into account the different number of confrontations faced by individuals from the differently sized cohorts (*Paired confrontations* above). Tests were two-tailed except where we predicted directional (positive) correlations between individual differences in the frequency of chinning, performance in the confrontation tests, and in concentrations of testosterone. We took $p \leq 0.05$ as the level of significance throughout. Analyses were performed using the program GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc) except for calculating Kendall coefficients of concordance, where we used the program Statistica 7.1 (Stat-Soft).

3. Results

Comparing the behavioral data from morning and from afternoon sessions, we did not find a statistically significant difference either in

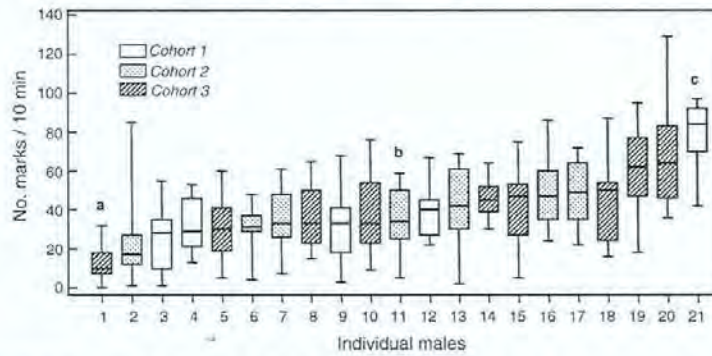


Fig. 2. Frequency of chinning by individual rabbits of the three cohorts for the 15 test days (three, five-day blocks), arranged in ascending order of individuals' chinning frequency. Central horizontal lines give the medians, the upper and lower limits of the boxes give the interquartile ranges, and the "whiskers" give the absolute ranges. Letters indicate significant differences between the lowest, middle and most frequently marking individuals as reported by Dunn's multiple paired comparisons following a Kruskal Wallis ANOVA (see text).

the frequency of chinning (Wilcoxon signed-ranks test corrected for ties: $T=64$, $n=21$, $p>0.07$) or in the number of mounts ($T=82$, $n=21$, $p>0.60$). Thus, we have combined data from across the day in all subsequent analyses.

3.1. Behavioral tests

Animals adjusted quickly to the arena and by the end of the five-day habituation period they moved around freely, sniffing at the floor and sniffing at and rearing up against the wall, or lying down in an apparently relaxed posture.

Chinning. When placed in the arena containing the bricks, most animals started within seconds to rub their chin across the bricks in the

species-typical manner, sometimes leaving clearly visible damp marks from the deposited secretion. The number of chinnings per 10 min session ranged from 0 (just once) to 129, and there were large and statistically significant differences in the total number of chinnings performed by individual animals of all three cohorts (Fig. 2; Kruskal Wallis one-way ANOVA: $H_{20}=123.7$, $p<0.0001$). Furthermore, differences among individuals in the frequency of chinning were largely maintained across the three, five-day test blocks (Kendall coefficient of concordance: $W=0.70$, $n=21$, $p<0.003$). No relation was found between body weight and number of chinnings (Spearman rank correlation coefficient: $r_s=0.14$, $n=21$, $p=0.27$).

Confrontations. The behavior of males when placed pair-wise in the arena was very similar for all pairs and in all sessions. Almost

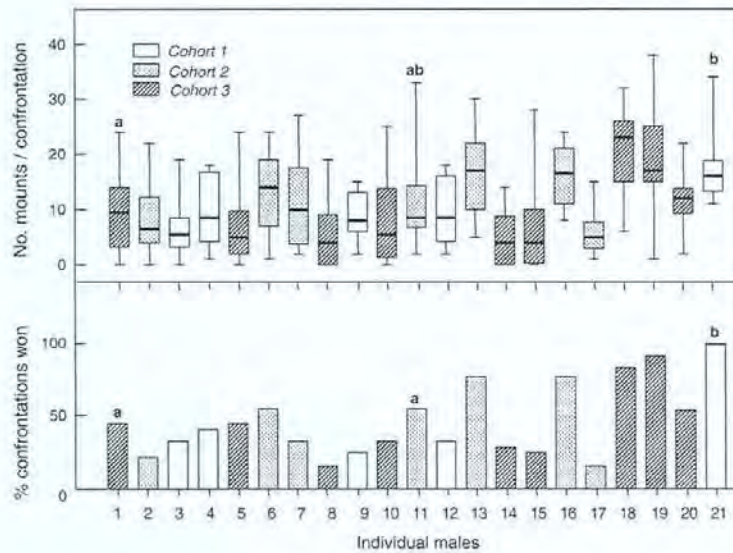


Fig. 3. Performance in the confrontation tests of individual animals from the three cohorts. Top panel: Number of mounts per 10-min confrontation. Central horizontal lines give the medians, the upper and lower limits of the boxes give the interquartile ranges, and the "whiskers" give the absolute ranges. Letters indicate significant differences between the lowest, middle and most frequently chin-marking individuals (see Fig. 2) as reported by Dunn's multiple paired comparisons following a Kruskal Wallis ANOVA (see text). Bottom panel: Percent of confrontations won by individuals of the three cohorts. Values are expressed as percentages because of the different number of animals in each cohort and thus in the number of encounters they could potentially win. Again, letters indicate significant differences between the lowest, middle, and most frequently chin-marking individuals as reported by multiple paired G tests after an overall G test including all 21 animals reported significant individual differences (see text). Note that individual animals have been arranged in the same order as in Fig. 3.

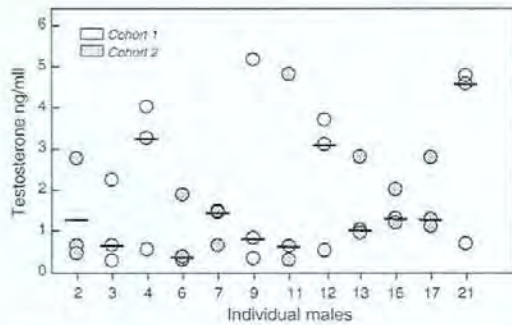


Fig. 4. Concentrations of serum testosterone for the 12 animals of cohorts 1 and 2. Circles give the values for each of the three sampling times (Fig. 1) and horizontal bars indicate the medians. The same numbers have been used to identify individuals as in Figs. 2 and 3.

Immediately animals started circling each other while maintaining tight body contact, each attempting to mount the other while apparently trying to avoid being mounted. When one animal succeeded in mounting the other it assumed the typical copulatory posture, gripping the mounted animal's flanks between its forelegs and performing repeated bouts of vigorous pelvic thrusting. The mounted animal usually resisted this, abruptly moving away or circling tightly apparently trying, often successfully, to throw the mounting male off. However, some mounts lasted as long as 52 s (in one case 128 s) until the mounting male, panting heavily, either dismounted or was dislodged by the mounted animal circling or abruptly moving away as described above. Animals' high motivation to perform such mounts was shown in pilot tests at the start of the study using a different set of males. When we tested competition in the arena for food or water between pairs of food- or water-deprived males they showed the same intense mounting behavior as described above and paid no attention to the food or water, leading us to abandon competition for these resources as tests of dominance.

Overtly aggressive behaviors such as biting, scratching or chasing were so rare that we have not considered them here. However, males sometimes sprayed urine at their test partner.

The number of mounts performed by individual animals per 10 min session ranged from 0 to 38, and there were large and statistically significant differences in the median number of mounts performed per session among animals of all three cohorts (Fig. 3 top panel; Kruskal Wallis one-way ANOVA: $H_{20} = 146.6$, $p < 0.0001$). Furthermore, median differences among individuals in the frequency of mounting were largely maintained across the three test blocks (Kendall coefficient of concordance: $W = 0.76$, $n = 21$, $p = 0.0014$).

Considering the number of confrontations won by individuals, with the winner defined as the animal that mounted its partner more often than it was itself mounted in each 10-min test, we found statistically significant differences among individuals on this measure also (Fig. 3 bottom panel; G test: $G = 100.19$, $df = 20$, $p < 0.0001$). Differences ranged from animals that won only 17% of encounters to an animal that won 100%. And again, as for the other behavioral variables, ranked individual differences in winning encounters were largely maintained across the three test blocks (Kendall coefficient of concordance: $W = 0.73$, $n = 21$, $p = 0.0014$). Although we did not find a correlation between body weight and median number of mounts per 10-min session (Spearman rank correlation coefficient: $r_s = 0.19$, $n = 21$, $p = 0.20$), we did find a correlation between body weight and the percent of confrontations won ($r_s = 0.43$, $n = 21$, $p = 0.03$).

3.2. Testosterone

Concentrations of serum testosterone across all samples for the 12 animals of cohorts 1 and 2 ranged from 0.26 ng/ml to 5.16 ng/ml, and

median values for individual animals from 0.35 ng/ml to 4.56 ng/ml (Fig. 4). These values are within the range reported for male rabbits in the literature [43,45,54,17,18,10]. However, there was considerable variability in the values obtained for each animal for the three time points sampled, which differed by 0.813 ng/ml for animal 16 with the smallest range, and 4.83 ng/ml for animal 9 with the largest range (Fig. 4). Relative differences among individuals in concentrations of testosterone were not maintained across the three sampling times (Kendall coefficient of concordance: $W = 0.19$, $n = 12$, $p = 0.83$), nor did we find a consistent overall pattern of differences between the three sampling times which might, for example, have been associated with the behavioral tests (Friedman one-way ANOVA by ranks for repeated measures: $F_{1,2,3} = 0.18$, $p = 0.97$).

3.3. Relation among measures

Our prediction that chinning would be associated with the behavioral indicators of dominance was generally supported by the data; the correlation between individual differences in the median frequency of chinning ranked across the 21 animals and individual differences in their median number of mounts per confrontation approached significance (Fig. 5 top panel; Spearman rank correlation coefficient: $r_s = 0.35$, $n = 21$, $p = 0.062$), and reached significance in relation to individual differences in the percent of confrontations won (Fig. 5 middle panel; $r_s = 0.38$, $n = 21$, $p = 0.044$). Weakly consistent with our prediction, the correlation between individual differences in the median frequency

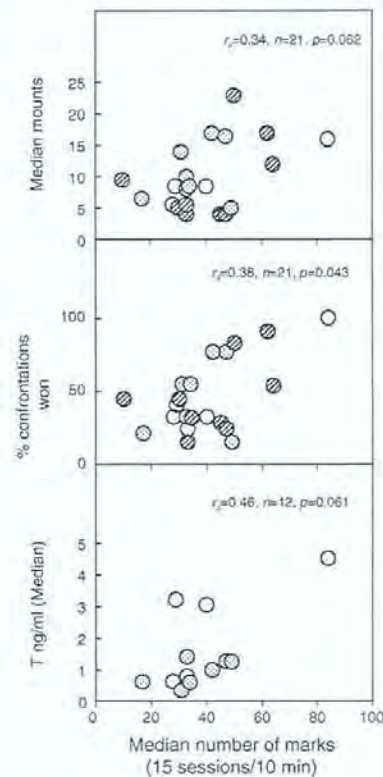


Fig. 5. Correlation between individual animals' median number of chin marks per 10 min session and median number of mounts per confrontation (top panel), percent of confrontations won (middle panel), and median concentrations of serum testosterone (bottom panel). Note that values for testosterone were only available for 12 of the 21 animals. Open circles = cohort 1, shaded circles = cohort 2, dark circles = cohort 3.

of chinning and median concentrations of testosterone for the 12 animals of cohorts 1 and 2 also approached significance (Fig. 5 bottom panel; $r_s=0.46$, $n=12$, $p=0.061$).

No correlation was found between individual differences in median concentrations of testosterone and individual differences in the median frequency of mounts ($r_s=0.25$, $n=12$, $p=0.21$) or in the percent of confrontations won ($r_s=0.20$, $n=12$, $p=0.25$).

4. Discussion

The results of the present study largely confirmed our predictions. First, we found large differences in the frequency of chinning among the animals of all three cohorts. Furthermore, and extending the findings of previous studies, these differences remained stable across the test period, which in the case of the largest cohort lasted over 4 months. Consistent with previous reports [20–22,9,47,32], animals usually started marking immediately they were placed in the arena, with the most active animals sometimes marking more than 100 times during a 10 min test. This supports both the adequacy of the test situation and the importance of chinning in the communication system of the rabbit. It also suggests that the performance of this behavior reflects some aspect of stable, replicable individual differences among animals reared and subsequently maintained under essentially the same conditions.

Second, the predicted correlation between individual differences in the frequency of chinning and number of mounts performed by individuals in the confrontation tests approached significance, while the predicted correlation between chinning frequency and number of encounters won reached significance. The weaker association between frequency of chinning and number of mounts may be explained by the fact that animals could, and sometimes did, win encounters according to our criterion (mounting an opponent more than they themselves were mounted) by performing only few mounts but of long duration. Thus, number of encounters won, that is, an animal's superior ability in being able to mount another individual while avoiding being mounted itself may be a more reliable indicator of dominance than simply total number of mounts. However, in either case the results are generally consistent with previous reports of a positive association between frequency of chinning and behavioral indicators of dominance such as mounting [34,35,9,17].

Particularly notable was the intensity of mounting behavior [see also [9,47]]. We had expected various forms of overt aggression such as biting and scratching, but mounting was performed almost immediately and to the virtual exclusion of all else. What intrasexual mounts mean is not entirely clear although most probably, as in other mammals such as macaque monkeys and wolves [summary in [41]], they are associated with the establishment and maintenance of social dominance in which the mounter is the dominant animal [35,9]. Although the intense mounting activity observed here was almost certainly an artifact of the test situation from which mountees could not escape, attempted mounting by socially dominant male rabbits has also been reported in the wild [35,37].

And third, as expected, individual differences in testosterone levels correlated positively with the frequency of chinning, although not quite reaching significance. The results were thus consistent with reports that castration reduces or eliminates chinning in rabbits while testosterone replacement restores it [21,14,32]. Nevertheless, the high variability in the concentrations of testosterone measured for the same individuals across the three sample times suggests that the factors influencing testosterone levels are complex. One such factor, not investigated in the present study but needing to be considered in future work, is the well-documented influence of social relationships including the outcome of recent social encounters on testosterone concentrations, indicating testosterone levels to be a result rather than a cause of aggressive, dominance-related interactions [[17,18,10], reviewed in [33,50,16]]. Indeed, this would potentially explain our failure to find a correlation between concentrations of serum testosterone and our measures of

dominance based on a few brief social encounters in otherwise singly housed animals. Nor is it clear if the positive correlation found between concentrations of serum testosterone and frequency of chinning was due to the action of testosterone itself, or rather to one or more of its metabolites as has been shown in previous studies [21,18]. In addition, differences among animals in sensitivity to testosterone or its metabolites due to differences centrally in the number of membrane receptors might help explain the weak relationship found here between concentrations of serum testosterone and the behavioral measures [summary in [18]].

Finally, we failed to find a consistent relationship between body weight and chinning or mounting behavior. While in many mammalian species, including rabbits, body weight is correlated with social dominance under natural conditions [2,51], in captive animals housed singly and fed a standard diet it is unlikely to be associated with differences in physiology and behavior to any notable extent.

Taken together, the present results are consistent with reports that in wild rabbits chinning by males is associated with territoriality and social dominance; dominant males have larger chin glands and mark more frequently, and particularly at the borders and core areas of their territories [34,35,38,23]. However, perhaps the most interesting and to our knowledge new aspect of the present findings is that clear and stable individual differences in chinning and other dominance-associated behaviors were apparent among individuals that prior to testing had had no opportunity since weaning at 25 days of age to interact directly with other animals and to establish any form of social hierarchy. This suggests that the differences observed had their origin in intrinsic differences either in the animals' genetic make-up, differential exposure to hormones associated with intrauterine position as has been established for various rodent species [49,48,55] and has also been reported for the rabbit [3], differential success among littermates during the highly competitive daily struggle for milk or thermally advantageous positions within the litter huddle [15,4–6], or to a combination of these. The possible relation between individual differences in such early experiences and later differences in behavioral and physiological indicators of potential dominance are currently under investigation in our laboratory, including in female rabbits, which also vigorously chin-mark and have clear dominance hierarchies [46,19,20,22,27–29,32,51,52].

Acknowledgments

Grant support was provided by CONACYT (124787 and 48692-Q), PAPIIT (IN229907), and PIFOP (UAT-2000-30-30). We thank Laura García, Carolina Rojas and Cecilia Cuatrecasas for excellent technical assistance, Arturo Salame-Méndez for help in establishing the testosterone assay, Arturo Estrada-Torres for statistical advice, and Gabriel Roldán and Rosalinda Guevara for valuable discussion.

References

- [1] Albone ES, Shirley SG. Mammalian semiochemistry: the investigation of chemical signals between mammals. Chichester: Wiley and Sons; 1984.
- [2] Archer J. The behavioural biology of aggression. Cambridge: Cambridge University Press; 1988.
- [3] Bánszegi O, Bilkó Á, Altbácker V. The effects of intrauterine position on sexual development in rabbits. Proc XXIX Internat Ethol Conf, Hungary; 2005. p. 20.
- [4] Bautista A, Mendoza-Degante M, Coureaud G, Martínez-Gómez M, Hudson R. Scramble competition in newborn domestic rabbits for an unusually restricted milk supply. Anim Behav 2005;70:1011–21.
- [5] Bautista A, García-Torres E, Martínez-Gómez M, Hudson R. Do newborn domestic rabbits *Oryctolagus cuniculus* compete for thermally advantageous positions in the litter huddle? Behav Ecol Sociobiol 2008;62:331–9.
- [6] Bautista A, Martínez-Gómez M, Hudson R. Mother–young and within-litter relations in the European rabbit *Oryctolagus cuniculus*. In: Cello Alves P, Ferrand N, Hackländer K, editors. Lagomorph biology: evolution, ecology and conservation. Berlin: Springer; 2008. p. 211–223.
- [7] Bell DJ. Social olfaction in lagomorphs. Symp Zool Soc Lond 1980;45:141–64.
- [8] Bell DJ. The rabbits and hares: order Lagomorpha. In: Brown RE, MacDonald DW, editors. Social odours in mammals. Oxford: Clarendon Press; 1985. p. 507–30.

- [9] Black-Cleworth P, Verberne G. Scent-marking, dominance and flehmen behavior in domestic rabbits in an artificial laboratory territory. *Chem Senses Flavor* 1975;1:465–94.
- [10] Briganti F, Della Seta D, Fontani G, Lodi L, Lupo C. Behavioral effects of testosterone in relation to social rank in male rabbits. *Aggr Behav* 2003;29:269–78.
- [11] Brown RE, MacDonald DW, editors. Social odours in mammals. Oxford: Clarendon Press; 1985.
- [12] Camacho-Arroyo I, Cerbón MA, Gamboa-Domínguez A, González-Agüero, González-Mariscal G. Immunocytochemical detection of estrogen and progesterone receptors in the rabbit submandibular gland. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 1999;123:179–86.
- [13] Cerbón MA, Camacho-Arroyo I, Gamboa-Domínguez A, González-Mariscal G. The rabbit submandibular gland: sexual dimorphism, effects of gonadectomy, and variations across the female reproductive cycle. *J Comp Physiol A* 1996;178:351–7.
- [14] Chirino MA, González-Mariscal G, Carillo P, Pacheco P, Hudson R. Effect of removing the chin gland on chin-marking behavior in male rabbits of the New Zealand race. *Z Säugetierkd* 1993;58:116–21.
- [15] Drummond H, Vázquez E, Sánchez-Colón S, Martínez-Gómez M, Hudson R. Competition for milk in the domestic rabbit: survivors benefit from littermate deaths. *Ethology* 2000;106:511–26.
- [16] Dugatkin LA. Bystander effects and the structure of dominance hierarchies. *Behav Ecol* 2001;12:348–52.
- [17] Farabolini F. Behavioral and endocrine aspects of dominance and submission in male rabbits. *Aggr Behav* 1987;13:247–58.
- [18] Girolami L, Fontani G, Lodi L, Lupo C. Agonistic behavior, plasma testosterone, and hypothalamic estradiol binding in male rabbits. *Aggr Behav* 1997;23:33–40.
- [19] González-Mariscal G, Melo AI, Zavala A, Beyer C. Variations in the chin-marking behavior of New Zealand female rabbits throughout the whole reproductive cycle. *Physiol Behav* 1990;48:361–5.
- [20] González-Mariscal G, Melo AI, Zavala A, Beyer C. Chin-marking behavior in male and female New Zealand rabbits: onset, development, and activation by steroids. *Physiol Behav* 1992;52:889–93.
- [21] González-Mariscal G, Melo AI, Zavala A, Chirino R, Beyer C. Sex steroid regulation of chin-marking behavior in male New Zealand rabbits. *Physiol Behav* 1993;54:1035–40.
- [22] González-Mariscal G, Albonetti ME, Cuamatzi E, Beyer C. Transitory inhibition of scent marking by copulation in male and female rabbits. *Anim Behav* 1997;53:323–33.
- [23] Hayes RA, Richardson BJ, Wyllie SG. Semiochemicals and social signaling in the wild European rabbit in Australia: I. Scent profiles of chin gland secretion from the field. *J Chem Ecol* 2002;28:363–84.
- [24] Hayes RA, Richardson BJ, Wyllie SG. To fix or not to fix: the role of 2-phenoxyethanol in rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, chin gland secretion. *J Chem Ecol* 2003;29:1051–64.
- [25] Hudson R, Distel H. Nipple-search pheromone in rabbits: dependence on season and reproductive state. *J Comp Physiol A* 1984;155:13–7.
- [26] Hudson R, Distel H. Sensitivity of female rabbits to changes in photoperiod as measured by pheromone emission. *J Comp Physiol A* 1990;167:225–30.
- [27] Hudson R, González-Mariscal G, Beyer C. Chin-marking behavior, sexual receptivity and pheromone emission in steroid-treated, ovariectomized rabbits. *Horm Behav* 1990;24:1–13.
- [28] Hudson R, Voderhayer T. Spontaneous and odour-induced chin marking in domestic female rabbits. *Anim Behav* 1992;43:329–36.
- [29] Hudson R, Melo AI, González-Mariscal G. Effect of photoperiod and exogenous melatonin on correlates of estrus in the domestic rabbit. *J Comp Physiol A* 1994;175:573–9.
- [30] Hudson R, Rojas C, Arteaga I, Martínez-Gómez M, Distel H. Rabbit nipple-search pheromone versus rabbit mammary pheromone revisited. In: Hurst JL, Benyon RJ, Roberts SC, Wyatt TD, editors. Chemical signals in vertebrates II. New York: Springer; 2008. p. 315–24.
- [31] Lyne AG, Molyneux GS, Mykytowycz R, Parakkal PF. The development, structure and function of the submandibular cutaneous (chin) glands in the rabbit. *Aust J Zool* 1964;12:340–8.
- [32] Martínez-Gómez M, Guarneros M, Zempoaltéca R, Hudson R. A comparison of spontaneous and odour-induced chin marking in male and female domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus domesticus*). *Ethology* 1997;103:893–901.
- [33] Mazur A, Booth A. Testosterone and dominance in men. *Behav Brain Sci* 1998;21:353–97.
- [34] Mykytowycz R. Territorial function of chin gland secretion in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus* (L.). *Nature* 1962;193:798.
- [35] Mykytowycz R. Further observations on the territorial function and histology of the submandibular cutaneous (chin) glands in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus* (L.). *Anim Behav* 1965;13:400–12.
- [36] Mykytowycz R. The behavioural role of the mammalian skin glands. *Naturwissenschaften* 1972;4:133–9.
- [37] Mykytowycz R, Goodrich BS. Skin glands as organs of communication in mammals. *J Invest Dermatol* 1974;62:124–31.
- [38] Mykytowycz R, Dudzinski ML. A study of the weight of odiferous and other glands in relation to social status and degree of sexual activity in the wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus* (L.). *CSIRO Wildl Res* 1966;11:31–47.
- [39] Mykytowycz R, Hesterman ER. An experimental study of aggression in captive European rabbits, *Oryctolagus cuniculus* (L.). *Behaviour* 1975;52:104–23.
- [40] Mykytowycz R, Hesterman ER, Gambale S, Dudzinski ML. A comparison of the effectiveness of the odors of rabbits, *Oryctolagus cuniculus*, in enhancing territorial confidence. *J Chem Ecol* 1976;2:13–24.
- [41] Reinhardt V, Reinhardt A, Bercovitch FB, Goy RW. Does intermale mounting function as a dominance demonstration in rhesus monkeys? *Folia Primatol* 1986;47:55–60.
- [42] H.G. Rödel, G. Prager, V. Stefanski, D. von Holst, R. Hudson. Separating maternal and litter-size effects on early postnatal growth in two species of altricial small mammals. *Physiol Behav* doi:10.1016/j.physbeh.2007.11.074.
- [43] Saginor M, Horton R. Reflex release of gonadotropin and increased plasma testosterone concentration in male rabbits during copulation. *Endocrinology* 1968;82:627–30.
- [44] Schalken APM. Three types of pheromones in the domestic rabbit, *Oryctolagus cuniculus* (L.). *Chem Senses* 1976;2:139–55.
- [45] Schanbacher BD, Ewing LL. Simultaneous determination of testosterone, 5 α -androstane-17 β -ol-3-one, 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol and 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol in plasma of adult male rabbits by radioimmunoassay. *Endocrinology* 1975;97:787–92.
- [46] Soares MJ, Diamond M. Pregnancy and chin marking in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Anim Behav* 1982;941–3.
- [47] Verberne G, Blom F. Scentmarking, dominance and territorial behaviour in male domestic rabbits. In: Meyers K, McInnes CD, editors. *Proc World Lagomorph Conf* 1979. Guelph: University of Ontario; 1981. p. 280–90.
- [48] vom Saal FS. Variation in phenotype due to random intrauterine positioning of male and female fetuses in rodents. *J Reprod Fert* 1981;62:633–50.
- [49] vom Saal FS, Bronson FH. Sexual characteristics of adult female mice are correlated with their blood testosterone levels during prenatal development. *Science* 1980;208:597–9.
- [50] von Holst D. The concept of stress and its relevance for animal behavior. *Adv Study Behav* 1998;27:1–131.
- [51] von Holst D, Hutzelmeyer H, Kaetzke P, Khaschei M, Schönheiter R. Social rank, stress, fitness, and life expectancy in wild rabbits. *Naturwissenschaften* 1999;86:388–93.
- [52] von Holst D, Hutzelmeyer H, Kaetzke P, Khaschei M, Rödel HG, Schrutka G. Social rank, fecundity and lifetime reproductive success in wild European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Behav Ecol Sociobiol* 2002;51:245–54.
- [53] Wales NAM, Ebling FJ. The control of the apocrine glands of the rabbit by steroid hormones. *J Endocrinol* 1971;51:763–70.
- [54] Younglai EV, Moor BC, Dimond P. Effects of sexual activity on luteinizing hormone and testosterone levels in the adult male rabbit. *J Endocr* 1976;69:183–91.
- [55] Zielinski WJ, vom Saal FS, Vandenbergh JG. The effect of intrauterine position on the survival, reproduction and home range size of female house mice (*Mus musculus*). *Behav Ecol Sociobiol* 1992;30:185–91.

III RESPUESTA DE LAS HEMBRAS DE CONEJO A LAS MARCAS DEL MENTÓN DE LOS MACHOS

El trabajo que a continuación se presenta, se realizó a partir de datos conductuales de marcaje por frotamiento del mentón de las hembras en respuesta a marcas del mentón de machos particulares, utilizando conejos domésticos de la raza chinchilla. La intención inicial del presente trabajo era su publicación en una revista indexada, misma que no fue posible por la obtención de resultados negativos y dificultades metodológicas en la interpretación de éstos. La publicación del presente trabajo requiere de un ajuste metodológico y realización de las pruebas correspondientes, mismas que por la inversión de tiempo que requieren se realizarán posteriormente.

Resumen

La selección sexual se define como la competencia entre individuos del mismo sexo y especie por individuos del sexo opuesto y la elección diferencial de individuos de un sexo por aquellos del sexo opuesto. Usualmente los machos compiten entre ellos por las hembras y éstas seleccionan a unos machos más que a otros, ya que generalmente son ellas las que realizan mayor inversión parental que los machos. Las hembras de mamíferos responden a las señales odoríferas de los machos y pueden utilizarlas para elegir una pareja. Los olores de los machos pueden informar a las hembras sobre su "calidad" y pueden funcionar para atraer hembras al mismo tiempo que para intimidar a machos rivales. El presente experimento investigó una de las posibles funciones del marcaje por frotamiento del mentón en los machos del conejo, que es la atracción de una pareja. Se pretendía conocer si las hembras marcaban más un objeto previamente marcado por un macho dominante en comparación con uno marcado por un subordinado. Además, si visitaban más el sitio ocupado con un objeto previamente marcado por un macho dominante en comparación con un objeto marcado por un subordinado. Los resultados mostraron que las hembras no marcaron más los objetos previamente marcados por machos en comparación con objetos limpios control y no marcaron más con el mentón los objetos previamente marcados por los machos dominantes, ni visitaron más los sitios de dichos machos. Se discutieron las posibles causas de por qué las hembras no respondieron como se esperaba: poca cantidad de marcas del mentón colectada de los machos, hora de colección de las marcas del mentón de los machos, acción microbiana sobre la secreción del mentón que pudo influir la producción de señales odoríferas y mensaje de las marcas del mentón de los machos que pudo estar dirigido a otros machos y no a hembras.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Introducción

La selección sexual se ha definido como 1) la competencia entre individuos del mismo sexo y especie por individuos del sexo opuesto y 2) elección diferencial de individuos de un sexo por aquellos del sexo opuesto (Darwin 1871 citado en Trivers 1972). Usualmente los machos compiten entre ellos por las hembras y éstas seleccionan a unos machos más que a otros. Este fenómeno puede explicarse por la inversión energética que cada sexo realiza en sus gametos. Los machos invierten menor cantidad de energía en la producción de sus gametos, que son bastante más pequeños en comparación con los de las hembras, éstas realizan una inversión energética mayor en sus células sexuales. Se ha argumentado que el éxito reproductivo de los machos está limitado por el número de hembras (gametos femeninos) que pueden fertilizar y varía en función del número de cópulas. En contraste, el éxito reproductivo de las hembras está limitado, por lo menos en parte, por el número de gametos que pueden producir (Bateman 1948 citado en Trivers 1972).

Además, usualmente las hembras realizan mayor inversión parental que los machos (Trivers 1972). Entonces, la inversión parental incluye el gasto metabólico realizado en la producción de células sexuales, y alimentación y cuidado de las crías. En los mamíferos, las hembras son generalmente las que realizan una alta inversión parental (gestación, parto, lactación y cuidado de las crías). En este sentido las hembras son selectivas con los machos con los que se reproducirán. Además, pueden obtener beneficios directos o indirectos al “seleccionar” un macho particular, para ello pueden utilizar diversas señales de los machos, como las odoríferas. Por ejemplo, las hembras pueden obtener beneficios directos al evitar enfermedades contagiosas utilizando señales odoríferas para elegir como pareja a machos saludables.

Otra teoría es la del “indicador”, que también ofrece beneficios indirectos a las hembras. Si los machos expresan o despliegan una característica, por ejemplo, un olor intenso en proporción a su salud y viabilidad, y si la viabilidad es hereditaria, entonces las hembras que seleccionen a los machos con estos olores se beneficiarán con los genes para esta característica los cuales heredarán sus hijos (Anderson 1994). Esta idea es la base de diversos modelos tales como el “*handicap*” y buenos genes (Zahavi 1975). La teoría del *handicap* de señalización honesta argumenta que los caracteres sexuales elaborados proveen indicadores honestos de la condición y calidad de un individuo debido a que aquellos con alta calidad pueden pagar los costos de tener dichos caracteres (Zahavi 1975).

Las características sexuales secundarias elaboradas utilizadas por los machos para atraer hembras incluyen su carga parasitaria y resistencia a las enfermedades (Hamilton & Zuk 1982). En forma similar, la teoría del *handicap* por inmunocompetencia argumenta que los caracteres sexuales secundarios reflejan honestamente resistencia a enfermedades infecciosas debido a que solo los machos resistentes a enfermedades pueden tener alta concentración de testosterona requerida para desarrollar dichos caracteres, ya que esta hormona tiene efectos inmunosupresores (Folstad & Karter 1992, Wedekind & Folstad 1994). En los machos disminuye la concentración de testosterona durante la infección (Hillgarth & Wingfield 1997), posiblemente para reducir los efectos

inmunosupresores de dicha hormona (Folstad & Karter 1992), o bien, para dirigir energía y recursos a la inmunidad (Wedekind & Folstad 1994). Algunos estudios realizados principalmente con roedores, sugieren que las marcas odoríferas de los machos pueden reflejar su estado de salud o infección a las hembras. Éstas son menos atraídas a los olores de machos infectados (Kavaliers & Colwell 1995 a, b, Penn & Potts 1998a, Penn *et al* 1998, Klein *et al* 1999, Willis & Poulin 2000, Moshkin *et al* 2002). Los machos estimulados con olores de hembra, responden con un incremento en su frecuencia de marcaje odorífero y estas marcas son más atractivas a las hembras. La inyección de una cepa de la bacteria *Salmonella* a los mismos machos redujo el marcaje odorífero de éstos y sus marcas fueron menos atractivas para las hembras (Zala *et al* 2004).

Recapitulando, los machos compiten entre éstos por las hembras y poseen características (como algunos olores) que las hembras pueden utilizar para elegir una pareja, por su parte, las hembras eligen machos particulares y tal elección les confiere beneficios. Cabe mencionar que, en primer lugar, las hembras responden a los olores provenientes de machos. En segundo lugar, muestran “preferencia” por los olores de algunos machos sobre otros, por ejemplo, los dominantes, con nivel de testosterona alto. A continuación, se presentan algunas evidencias que sugieren que en mamíferos las hembras responden a los olores de los machos, y utilizan dichos olores en la elección de pareja.

Las hembras pueden responder a los olores de los machos incrementando su frecuencia de marcaje odorífero, inspeccionando más tiempo dichos olores o pasando más tiempo cerca de éstos. Por ejemplo, en los hámsteres, cuando las hembras están sexualmente receptivas, realizan marcaje vaginal con una frecuencia mayor en presencia de machos o sus olores en comparación con olores de hembras o en presencia de éstas (Johnston 1977). En esta misma especie, las hembras pasan más tiempo investigando la secreción de las glándulas de los flancos (*flank glands*) en comparación con la orina o heces de los machos (Tang-Martínez *et al* 1993). También, las hembras adultas del ratón, pasan más tiempo cerca de los olores de macho en comparación con los olores de hembra (Drickamer 1989).

Las marcas odoríferas de los machos dominantes y competitivos son atractivas para las hembras (Jones & Nowell 1974, White *et al* 1986, Hurst 1990, Drickamer 1992, Evsikov *et al* 1994, Rich & Hurst 1998). En los ratones domésticos, los machos dominantes realizan marcaje odorífero mediante varias deposiciones de pequeñas cantidades de orina sobre su territorio (Desjardins *et al* 1973). Este marcaje puede funcionar para atraer hembras ya que los machos marcan más en presencia de éstas (Maruniak *et al* 1974, Bronson 1979). Además, los machos producen varias señales odoríferas dependientes de andrógenos como las proteínas MUP (por sus siglas en inglés “*major urinary proteins*”) y feromonas que son atractivas a las hembras (Bronson 1976, Novotny *et al* 1984, Kimura & Hagiwara 1985, Hurst *et al* 1998, Mucignat-Caretta *et al* 1998). También se ha sugerido que el marcaje odorífero es un despliegue honesto que advierte la calidad del macho ya que es fisiológicamente costoso (Gosling *et al* 2000) y atrae depredadores (Viitala *et al* 1995).

El marcaje odorífero territorial puede hacer a los machos vulnerables a depredación, ya que se ha observado que los machos del ratón inhiben su conducta de marcaje en respuesta al olor de un depredador, por ejemplo, un gato (Arakawa *et al* 2008). Otro mamífero que marca su territorio y contramarca en respuesta a las marcas odoríferas de coespecíficos intrusos es el castor. El contramarca se reduce en respuesta a los olores de un depredador. Estas observaciones sugieren que el riesgo de depredación potencial puede ser una presión de selección sobre la conducta de señalización odorífera (Rosell & Sanda 2006).

Los machos con niveles altos de testosterona pueden ser atractivos a las hembras. Las ratas realizan más marcas con orina en respuesta a los olores de machos intactos en comparación con los castrados. Además, los machos castrados inyectados con testosterona son atractivos a las hembras y marcan más sobre los olores de los machos que tienen las concentraciones de testosterona más altas (Taylor *et al* 1982, Ferkin *et al* 1994).

En esta sección se han mencionado algunos estudios que muestran algunas evidencias de elección femenina de pareja en mamíferos. En el conejo europeo, un lagomorfo, Bell (1983) considera los posibles procesos mediante los cuales las hembras pueden valorar la calidad de las parejas potenciales. Como ocurre en otras hembras de mamífero, en términos energéticos las conejas invierten más recursos que los machos en cada evento reproductivo, por ejemplo, después de un apareamiento exitoso de una coneja, ésta queda gestante por un periodo de 30 días. Sin embargo, si los óvulos no son fertilizados, el cuerpo lúteo continúa secretando progesterona ocasionando que la hembra permanezca en un estado de pseudogestación por un periodo de 16 ó 17 días, durante el cual ella no puede concebir, en términos de inversión parental los costos de un apareamiento infértil son más altos para la hembra que para el macho.

Bell (1983) propone que dado lo anterior, se esperaría que las hembras sean más selectivas al momento de aceptar a un macho, y que dicha elección de pareja se realice con base en características de calidad tales como rango social y condición sexual de los machos, “calidad de genes” que pueda heredar el macho a las crías. El rechazo de un macho y la “solicitud activa” de otro por una hembra receptiva puede considerarse como elección femenina de pareja en el conejo. La liberación de atrayentes para los machos por parte de las hembras receptoras pueden funcionar para intensificar la competencia entre machos, de tal manera que la hembra cuente con más opciones para elegir a una pareja. La liberación de señales odoríferas en la orina o las secreciones de las glándulas del mentón por los machos son un componente del cortejo (Bell 1977 citado en Bell 1983). Dichos olores pueden informar a las hembras sobre la “calidad” de un macho que puede ser una pareja potencial, al mismo tiempo estos olores pueden funcionar para intimidar a machos rivales. Sin embargo, no se ha estudiado si las secreciones de las glándulas del mentón de los machos son utilizadas por las hembras para elegir un macho sobre otro.

Se ha reportado que cuando se presenta a las hembras del conejo dos objetos marcados con el mentón, cada uno marcado por un macho diferente, dichas hembras marcan más el objeto de un macho en particular (Hudson & Vodermyer 1992). También, se ha observado que cuando se presenta a una hembra dos machos simultáneamente, ésta parece preferir a uno de estos

machos, la hembra marca más con el mentón el sitio donde se encuentra el macho (Soares & Diamond 1982).

El experimento aquí planteado pretende explicar una de las posibles funciones del marcaje por frotamiento del mentón en los machos de conejo, que es la atracción de una pareja. Se diseñó para responder a las siguientes preguntas. Considerando que las hembras incrementan su frecuencia de marcaje del mentón en respuesta a marcas del mentón de coespecíficos de ambos sexos y más aún de los machos (Hudson & Vodermayr 1992, Martínez-Gómez *et al* 1997), entonces, ¿marcan las hembras con mayor frecuencia un objeto que ha sido previamente marcado por un macho dominante en comparación con un objeto marcado por un macho subordinado? ¿Visitan las hembras con mayor frecuencia y duración un sitio ocupado por un objeto previamente marcado por un macho dominante en comparación con un objeto marcado por un macho subordinado?

2. Métodos

Los datos fueron colectados entre el 14 de junio de 2006 y 1 de marzo de 2007, todos los animales se mantuvieron en el bioterio del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México.

Los animales se alojaron en el bioterio en jaulas metálicas individuales que medían 90 x 60 x 40 cm, con un ciclo de luz/oscuridad constante de 16:8 h, simulando la estación reproductiva en su nativa Europa (Hudson & Distel 1990). La temperatura ambiental se mantuvo a 20 ± 4 °C, con agua *ad libitum* y 150 g/ animal/ día de alimento comercial Conejina de Purina®. La ventilación del bioterio se realizó mediante ventiladores de extracción.

2.1. Animales

Se utilizaron 17 conejas domésticas adultas de la raza chinchilla, con experiencia sexual. Debido a la disponibilidad de los animales en el bioterio, las hembras se organizaron en tres cohortes. Los machos que se utilizaron como donadores de marcas del mentón fueron los mismos utilizados en el estudio del Capítulo II.

Las tres cohortes de hembras estaban constituidas de la siguiente manera, dos constituidas por seis hembras cada una y una por cinco hembras, seleccionadas dentro de un mismo periodo temporal. Cada cohorte de hembras se asignó a cada cohorte de machos (ver Capítulo II sección 2.1. Animales). Los machos de una cohorte marcaron los bloques (ver adelante) que se les presentó a la cohorte de hembras asignada.

Tabla 1. Características de las hembras por cohorte

Cohorte	Edad (meses, promedio \pm DE)	Peso (Kg, promedio \pm DE)	Apareamientos previos (rangos)	Partos previos (rangos)
1 ($n=6$)	10 \pm 1.09	4.74 \pm 0.50	1 – 3	0 – 3
2 ($n=6$)	22 \pm 1.54	3.98 \pm 0.46	1 – 5	1 – 3
3 ($n=5$)	18.4 \pm 3.97	4.64 \pm 0.21	1 – 7	0 – 4

A pesar de la diferencia de edades de las hembras por cohorte, todas realizaron marcaje del mentón y se desplazaron por la arena de observación (ver sección 3. Resultados en este mismo Capítulo).

2.2. Procedimiento experimental

El tiempo que transcurrió entre el final de las pruebas de marcaje y confrontación entre pares de machos donadores (ver Capítulo II) y el inicio de estas pruebas con las hembras fue de 42 días para la cohorte 1, 48 para la cohorte 2 y 27 para la cohorte 3. El procedimiento experimental se muestra en la Fig. 1.

Tratamiento	H	GP1	GP2	M1	M2
Duración (días)	5	1	1	1	1

Fig. 1. Secuencia temporal de pruebas. H) Habitación de las hembras a la arena de observación (10 min); GP1) pruebas de marcaje inducido, Primer ganador *versus* Primer perdedor (10 min); GP2) pruebas de marcaje inducido, Segundo ganador *versus* Segundo perdedor (10 min); M1) pruebas de marcaje inducido, Más marcador *versus* Menos marcador (10 min); M2) pruebas de marcaje inducido, Segundo más marcador *versus* Segundo menos marcador (10 min). Ver más adelante para una explicación adicional y la Fig. 2.

Habitación de las hembras a la arena de observación. Se utilizó una arena metálica circular de 1 m de diámetro (ver Capítulo II) y sin bloques de ladrillos, dentro de ésta se colocó a cada hembra durante 10 min por cinco días, además, la arena se colocó en el cuarto de registro de conducta donde se realizaron las pruebas.

Pruebas conductuales de marcaje por frotamiento del mentón. Las pruebas se realizaron entre las 11:05 y 11:20 h. Cada hembra se colocó en el centro de la arena que contenía un bloque limpio identificado con el número 1 y dos bloques identificados con los números 2 y 3, cada uno previamente marcado por dos machos diferentes. La prueba se grabó con una cámara de video

digital Sony HANDYCAM DCR – HC32 colocada 2 m sobre la arena. Los videos se transfirieron a una PC utilizando el programa Movie Maker 2.1 (Microsoft). Se analizaron posteriormente los videos y se contabilizó el número de marcas que las hembras hicieron en cada uno de los bloques durante 10 min.

El bloque utilizado para coleccionar las marcas del mentón del macho donador, se colocó justo antes de la prueba (11:00 h) dentro de una arena de observación limpia. Dicha arena se colocó en el bioterio donde se alojaba el donador. El macho era retirado de su jaula e introducido dentro de la arena para que realizara seis marcas del mentón sobre el bloque, ello para conocer las diferencias cualitativas entre los machos, cuidando que dicho bloque sólo tuviera marcas del mentón, sin orina o heces. Siempre se utilizó un bloque limpio para cada donador. El tiempo que tardaron los donadores en colocar seis marcas sobre el bloque fue variable dependiendo de cada individuo, entre 3 y 20 min aproximadamente. El tiempo transcurrido entre la colección de las marcas del mentón de los machos donadores y la realización de la prueba conductual fue de 5-20 min aproximadamente.

Los bloques previamente marcados con el mentón de los machos se presentaron a las hembras. Los bloques presentados a éstas en la prueba GP1 (Fig. 1) correspondían a los machos Ganador y Perdedor en las pruebas de confrontación entre machos (ver más adelante; Fig. 2). Los bloques presentados en la prueba GP2 (Fig. 1) correspondían al macho Segundo ganador y al Segundo perdedor (ver más adelante; Fig. 2). En este mismo sentido se presentaron a las hembras los bloques para la prueba M1 (Fig. 1), que correspondían a los machos Más marcador y Menos marcador en las pruebas de marcaje por frotamiento del mentón de los machos (ver más adelante; Fig. 2). Así mismo, los bloques de la prueba M2 (Fig. 1) correspondían al macho Segundo más marcador y al Segundo menos marcador (ver más adelante; Fig. 2).

Criterio para elegir a los machos donadores ganadores y marcadores. Los machos dentro de una cohorte se organizaron en una jerarquía según el número de confrontaciones ganadas. Se consideró al ganador como aquel macho que montó más a su contrincante en las pruebas de confrontación (ver Capítulo II). El Ganador fue el macho que ocupó el primer lugar en la jerarquía, al que ocupó el último lugar se le consideró como Perdedor. Al macho que ocupó el segundo lugar se le consideró como Segundo ganador y finalmente se consideró como Segundo perdedor al macho que ocupó el penúltimo lugar en la jerarquía (Fig. 2 A).

Así mismo, los machos se organizaron en una jerarquía según el número de marcas, del que realizó más marcas al que realizó menos en las pruebas de marcaje (ver Capítulo II). Se consideró como Más marcador al macho que ocupó el primer lugar en la jerarquía y al Menos marcador a aquel macho que ocupó el último lugar. Se consideró Segundo más marcador al macho que ocupó el segundo lugar en la jerarquía, así como Segundo menos marcador al que ocupó el penúltimo lugar (Fig. 2 B).

	A	B
Jerarquía de machos:		
1	Ganador	Más marcador
2	Segundo ganador	Segundo más marcador
3		
4		
5		
6	Segundo perdedor	Segundo menos marcador
7	Perdedor	Menos marcador

Fig. 2. Jerarquía de machos donadores de marcas del mentón. **A)** Ganadores y Perdedores en las pruebas de confrontación entre pares de machos. **B)** Más marcadores y Menos marcadores en las pruebas de marcaje por frotamiento del mentón de machos donadores (ver el texto).

Además, cada video de las pruebas de marcaje de las hembras se observó en la pantalla de una computadora, sobre ésta, se colocó un acetato que tenía dibujadas tres divisiones consideradas como “secciones”. La sección 1 era la que estaba ocupada por el bloque identificado con el número 1 (limpio control), la sección 2 por el bloque 2 y la 3 por el bloque 3 (Fig. 3). Se registró el tiempo que las hembras pasaron dentro de cada sección. En cada prueba, los bloques, y por lo tanto las secciones, se rotaron para evitar la misma posición. Se consideró que la hembra se encontraba dentro de una sección cuando al menos la parte anterior de su cuerpo (cabeza, extremidades anteriores y tórax) estaba dentro de dicha sección, aunque la parte posterior ocupara la sección adyacente. Sin embargo, hubo casos en los que el cuerpo entero de la hembra estaba completamente dentro de una sección determinada.

2.3. Análisis de datos

Las medidas conductuales de marcaje por frotamiento del mentón de las hembras se obtuvieron como frecuencias, las medidas de visita a cada una de las secciones en la arena de observación por parte de las hembras se obtuvieron como frecuencias y duración en segundos. Con el objetivo de normalizar los datos, se obtuvo el porcentaje de la frecuencia de marcaje del mentón que realizaron las hembras en pruebas de 10 min, ya que hubo diferencias individuales en el marcaje del mentón de las hembras. También se obtuvo el porcentaje de frecuencia y duración de visitas de las hembras a cada una de las secciones de la arena de observación, ello debido a que hubo hembras más activas que otras. Debido a que los valores fueron en su mayoría frecuencias, se reportan como medianas y rangos intercuantiles, por ello se analizaron con pruebas estadísticas no paramétricas. Para realizar las comparaciones de las respuestas de las hembras a los diferentes bloques limpios y previamente marcados por machos diferentes se utilizó la prueba de Friedman

para medidas repetidas. Las pruebas fueron de dos colas, se consideró una $p \leq 0.05$ como nivel de significación. Los análisis se realizaron con el programa GraphPad InStat (GraphPad Software Inc.).

Finalmente, cabe señalar que en la condición Segundo ganador *versus* Segundo perdedor, solo se obtuvieron datos conductuales de 13 hembras, ya que cuatro pruebas conductuales no se realizaron debido a que uno de los machos donadores no marcó el bloque. En la condición Más marcador *versus* Menos marcador, el análisis se realizó con los datos conductuales de 16 hembras, debido a que una de las pruebas conductuales no se grabó por un error en el manejo de la videocámara. Sin embargo, en esta última condición sí se consideraron los datos conductuales de marcaje del mentón, ya que a pesar de que no se grabó el video, la frecuencia de marcaje se registró en el momento de realizar la prueba.

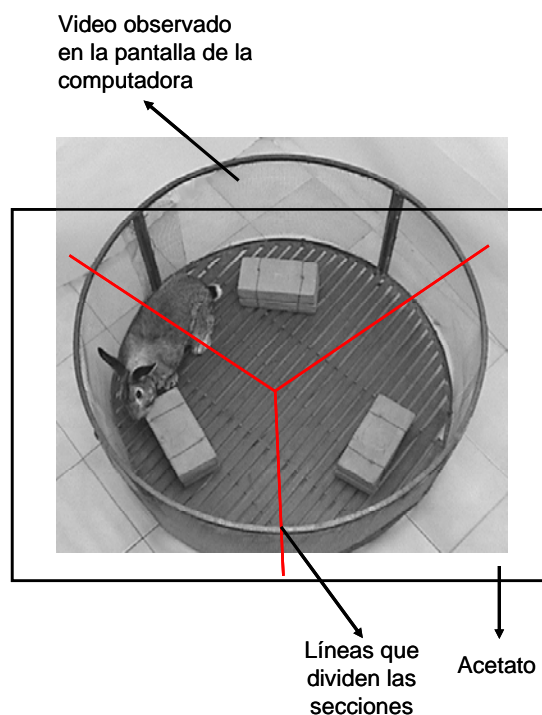


Fig. 3. Colocación del acetato sobre la pantalla de una computadora donde se observan los videos de la conducta de las hembras en la arena de observación. En el acetato están dibujadas las líneas que separan cada una de las tres secciones, una ocupada por un bloque limpio, una por un bloque previamente marcado con el mentón de un macho Ganador o Segundo ganador, o Más marcador o Segundo más marcador, y otra ocupada por un bloque previamente marcado con el mentón de un macho Perdedor o Segundo perdedor, o Menos marcador o Segundo menos marcador o (ver Fig. 2).

3. Resultados

Conducta general de las hembras dentro de la arena de observación durante las pruebas de marcaje. Durante aproximadamente los primeros cinco minutos de haber colocado a la hembra en el centro de la arena de observación, ésta investigaba y olfateaba los tres bloques, también realizaba marcas del mentón tanto en los bloques como en la arena, permaneció un tiempo en

alguna de las secciones. Algunas hembras eran más activas que otras, las más activas se desplazaban por la arena durante los 10 min de prueba, marcando los bloques y levantándose en ocasiones sobre sus extremidades posteriores. Las hembras menos activas inspeccionaban los bloques, realizaban con menor frecuencia marcas del mentón y el mayor porcentaje de tiempo de prueba permanecían reposando sobre el piso de la arena. Hubo hembras que no realizaron marcaje del mentón en alguna de las pruebas y permanecieron inactivas, reposando sobre el piso de la arena. Algunas hembras defecaron heces duras u orinaron una o varias veces en el centro de la arena, en el límite entre dos secciones o dentro de alguna de las secciones. Se observó también a algunas hembras acicalarse. Sin embargo, no se consideró el número de veces que las hembras defecaron u orinaron debido a que estos eventos ocurrieron con baja frecuencia y sólo se observaron en el 53% de las hembras.

Marcaje por frotamiento del mentón de las hembras sobre bloques previamente marcados por el mentón de machos diferentes. Se comparó el porcentaje de frecuencia de marcaje de las hembras hacia un bloque limpio contra bloques previamente marcados por los diferentes machos y no se encontraron diferencias significativas (Friedman $Fr_{3,17} = 2.0$ NS). Comparando el porcentaje de frecuencia de marcaje de las hembras hacia bloques limpios y previamente marcados por machos Ganadores en comparación con Perdedores, no hubo diferencias significativas (Fig. 4 panel A, Friedman $Fr_{3,17} = 0.4$ NS), el mismo resultado se encontró cuando se comparó el porcentaje de frecuencia de marcaje de las hembras hacia bloques limpios y previamente marcados por los machos Segundos ganadores en comparación con los Segundos perdedores (Fig. 4 panel B, Friedman $Fr_{3,13} = 0.11$ NS).

Cuando se comparó el porcentaje de frecuencia de marcaje de las hembras hacia bloques limpios y previamente marcados por machos Más marcadores en comparación con los Menos marcadores, no se encontraron diferencias significativas (Fig. 4 panel C, Friedman $Fr_{3,17} = 4.5$ NS). De la misma manera, no hubo diferencias significativas al comparar el porcentaje de frecuencia de marcaje de las hembras hacia bloques limpios y previamente marcados por los machos Segundos más marcadores *versus* los Segundos menos marcadores (Fig. 4 panel D, Friedman $Fr_{3,17} = 1.1$ NS).

Visita de las hembras a cada una de las secciones ocupadas por un bloque limpio y por bloques previamente marcados con el mentón de machos diferentes. Se comparó el porcentaje de tiempo que las hembras permanecieron en cada una de las tres secciones de la arena de observación, una ocupada por un bloque limpio, una por un bloque previamente marcado con el mentón de un macho Ganador y otra ocupada por un bloque previamente marcado con el mentón de un macho Perdedor. De la misma manera se comparó el porcentaje de tiempo que las hembras permanecieron en la sección con un bloque limpio, con marcas del mentón del Segundo ganador y con marcas del Segundo perdedor. No se encontraron diferencias significativas en ninguno de ambos casos (Fig. 5 paneles superiores A y B, Friedman $Fr_{3,17} = 1.52$ NS y $Fr_{3,13} = 0.61$ NS respectivamente). También se comparó el porcentaje de tiempo de permanencia de las hembras en las secciones ocupadas por bloques limpios y previamente marcados por machos Más

marcadores y Menos marcadores, así como limpios y Segundos marcadores en comparación con los Segundos menos marcadores y no hubo diferencias significativas en ninguno de los casos (Fig. 5 paneles superiores C y D, Friedman $Fr_{3,16} = 1.62 NS$ y $Fr_{3,17} = 2.47 NS$ respectivamente).

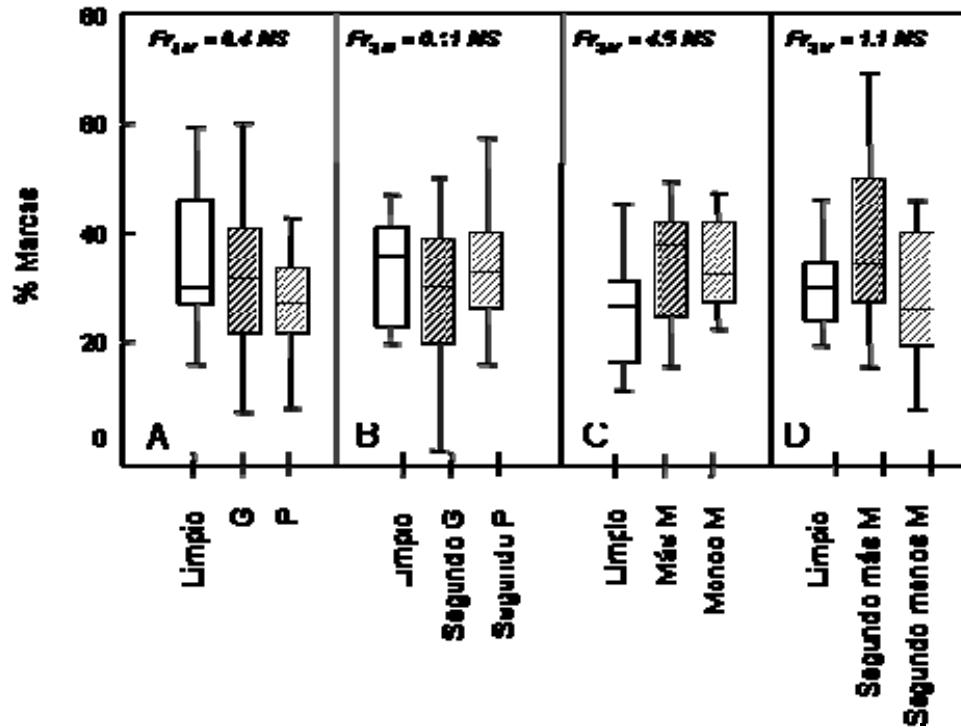


Fig. 4. No hubo diferencias significativas en la frecuencia de marcaje del mentón que realizaron las hembras sobre el bloque limpio y los previamente marcados con el mentón por machos diferentes: **A)** Ganador *versus* Perdedor, **B)** Segundo ganador *versus* Segundo perdedor, **C)** Más marcador *versus* Menos marcador y **D)** Segundo más marcador *versus* Segundo menos marcador. La línea horizontal dentro de cada caja representa la mediana del número de marcas realizadas en cuatro días de prueba de cada hembra, los extremos horizontales de las cajas representan el rango intercuartil y los bigotes el rango absoluto.

Los mismos resultados se encontraron cuando se comparó el porcentaje de la frecuencia de visitas de las hembras en cada una de las secciones ocupadas por los bloques limpios y marcados previamente por machos diferentes: Ganadores *versus* Perdedores, Segundos ganadores *versus* Segundos perdedores, Más marcadores *versus* Menos marcadores, así como los Segundos más marcadores *versus* Segundos menos marcadores y no se encontraron diferencias significativas (Fig. 5 paneles inferiores E, F, G y H, Friedman $Fr_{3,17} = 2.23 NS$, $Fr_{3,13} = 0.64 NS$, $Fr_{3,16} = 4.53 NS$ y $Fr_{3,17} = 0.90 NS$ respectivamente).

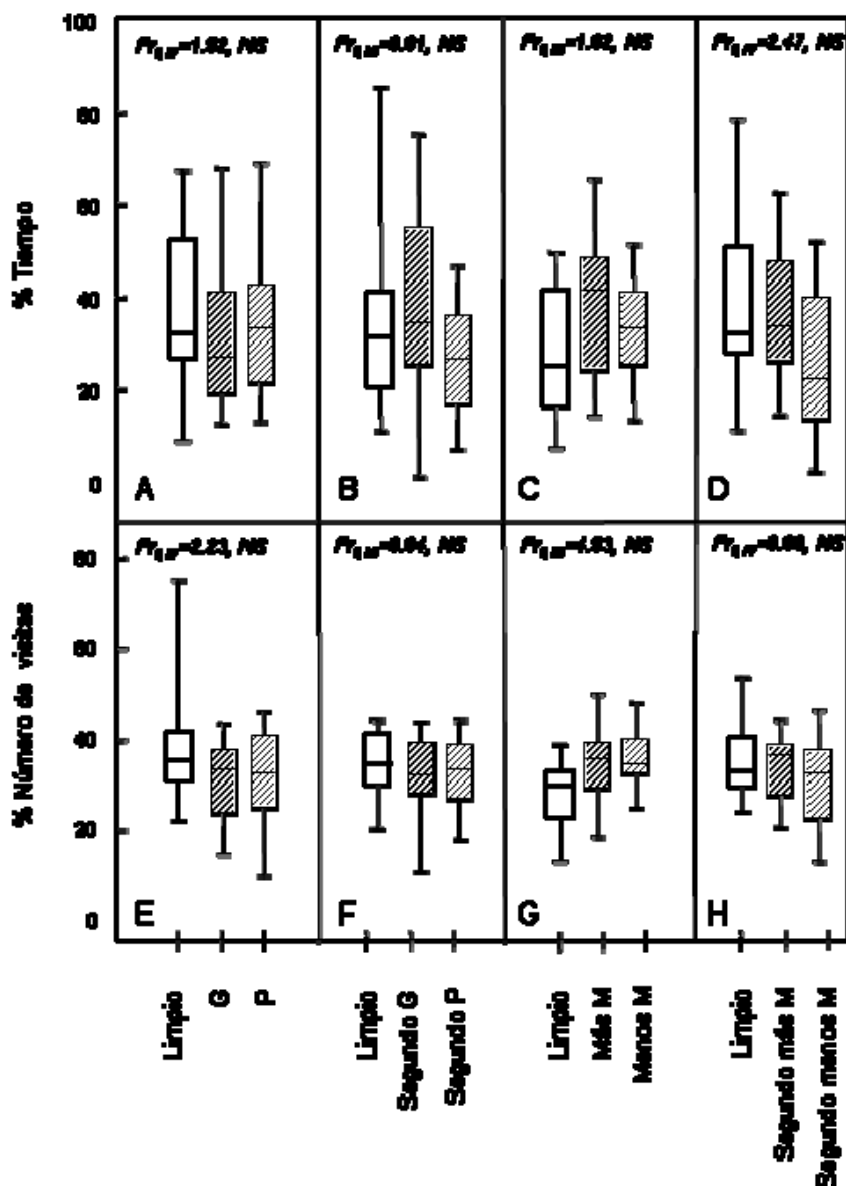


Fig. 5. *Panel superior:* No hubo diferencias significativas en el porcentaje de tiempo que pasaron las hembras en cada una de las secciones ocupadas por bloques limpios y previamente marcados por machos diferentes: **A)** Ganador *versus* Perdedor, **B)** Segundo ganador *versus* Segundo perdedor, **C)** Más marcador *versus* Menos marcador y **D)** Segundo más marcador *versus* Segundo menos marcador. *Panel inferior:* No hubo diferencias significativas en la frecuencia de visitas que realizaron las hembras en cada una de las secciones de la arena de observación ocupadas por bloques limpios y previamente marcados por machos diferentes: **E)** Ganador *versus* Perdedor, **F)** Segundo ganador *versus* Segundo perdedor, **G)** Más marcador *versus* Menos marcador y **H)** Segundo más marcador *versus* Segundo menos marcador. La línea central dentro de cada caja representa la mediana del número de marcas realizadas en cuatro días de prueba de cada hembra, los extremos horizontales de las cajas representan el rango intercuartil y los bigotes el rango absoluto.

4. Discusión

Estudios previos en los que se presenta a las hembras objetos limpios y previamente marcados por el mentón de machos coespecíficos, han mostrado que las hembras realizan marcaje por frotamiento del mentón con mayor frecuencia hacia los objetos marcados (Hudson & Vodermayr

1992, Hudson *et al* 1994, Martínez-Gómez *et al* 1997, Arteaga 2002). En contraste con estos resultados, en este estudio las hembras no marcaron más los objetos previamente marcados por machos en comparación con objetos limpios. Las causas de tales resultados pueden ser diversas, una de ellas es la diferencia en la metodología utilizada en los estudios citados en comparación con la utilizada en el presente estudio. En los estudios previos el objeto estímulo era colocado dentro de la jaula del donador durante 24 h antes de realizar la prueba conductual, de tal manera que posiblemente el objeto contenía otros olores como heces u orina además de las secreciones de las glándulas del mentón. En este estudio el objeto estímulo se colocó dentro de una arena de observación y a continuación se introdujo al macho donador, ello minutos antes de la realización de la prueba conductual, de esta forma se verificó que el objeto sólo tuviera marcas del mentón del donador. Por lo anterior posiblemente no sea conveniente comparar este resultado.

Una segunda consideración es que en los estudios previos posiblemente en 24 h que permanecieron los objetos dentro de las jaulas de los donadores fue tiempo suficiente para que las bacterias actuarán sobre las secreciones de las glándulas submandibulares produciendo las señales odoríferas. Es decir, que la acción microbiana sobre las secreciones de las glándulas del mentón pudo también ser importante para la producción de las señales odoríferas, en este estudio las marcas del mentón obtenidas de los machos donadores eran frescas y posiblemente hubo pocas posibilidades de que los microorganismos actuaran sobre dichas secreciones para liberar las señales odoríferas (Albone & Shirley 1984; ver adelante). Se desconoce el tiempo que tardan las señales odoríferas en volatilizarse. Además, se requiere investigar si las hembras responden en forma diferente a marcas del mentón de los machos frescas *versus* añejas.

En este estudio se esperaba que las hembras marcaran con mayor frecuencia un objeto que ha sido previamente marcado por un macho dominante en comparación con un objeto marcado por un macho subordinado y que visitaran con mayor frecuencia y duración un sitio ocupado por un objeto previamente marcado por un macho dominante en comparación con un objeto marcado por un macho subordinado. Sin embargo, los resultados tampoco apoyaron dichas predicciones.

Las hembras no marcaron más los objetos previamente marcados con el mentón de machos dominantes (Ganadores, Segundos ganadores, Más marcadores y Segundos más marcadores) en comparación con machos subordinados (Perdedores, Segundos perdedores, Menos marcadores y Segundos menos marcadores). También, las hembras no permanecieron más tiempo ni visitaron con mayor frecuencia las secciones de la arena ocupadas por objetos previamente marcados con el mentón de machos dominantes en comparación con las ocupadas por objetos previamente marcados con el mentón de machos subordinados.

Causa de ello es que posiblemente las hembras no respondieron con un aumento en la frecuencia de marcaje hacia los objetos previamente marcados por machos debido a que en este estudio se controló el número de marcas para conocer si había diferencias cualitativas entre los machos, por ello sólo se colectaron seis marcas del mentón de los donadores machos y posiblemente sea necesaria una cantidad mayor de secreción de las glándulas del mentón para

que las hembras respondan. Falta realizar estudios que evalúen si la cantidad de una determinada secreción odorífera de los machos, medida como número de marcas, tiene efecto en la respuesta conductual de las hembras dentro de una misma especie. En condiciones silvestres los animales dominantes pueden marcar con mayor frecuencia que los subordinados. Además, es posible que la cantidad de una secreción influya en la cantidad de señales odoríferas que contiene o que exista una correlación positiva entre cantidad de secreción y tasa de liberación de señales odoríferas.

Algunos estudios con machos de mamíferos han reportado una considerable variación individual tanto en la composición química como en la tasa de liberación de señales odoríferas, cabe mencionar que posiblemente las parejas potenciales respondan a dicha variación. La variación de las señales odoríferas de un individuo puede deberse a diferencias cualitativas o cuantitativas. El estudio de la variación individual en la producción de señales odoríferas está limitada por la inhabilidad tecnológica para identificar cantidades pequeñísimas pero conductualmente activas de compuestos químicos producidos por un individuo (Johansson & Jones 2007).

Otros factores que pudieron haber afectado la respuesta esperada de las hembras (que marcaran más los bloques y visitaran más las secciones de los machos dominantes) es que las secreciones de las glándulas del mentón de los machos pueden ser diferentes en la mañana en comparación con la tarde, en el presente experimento las marcas del mentón de los machos se obtuvieron por la mañana. Un estudio que comparó la frecuencia de marcaje del mentón de los machos del conejo doméstico realizada en la mañana *versus* la tarde, reportó que no existen diferencias significativas (Arteaga *et al* 2008, Capítulo II). Además, un estudio realizado por Hudson & Vodermyer (1992) con conejos de laboratorio en el que se manipuló el ciclo luz/oscuridad del lugar donde se alojaban machos donadores, simulando días largos y cortos, considerando que los días largos corresponden a la temporada reproductiva de los conejos en su natal Europa, reportó que las hembras responden con un incremento en la frecuencia de marcaje a objetos marcados con el mentón de machos mantenidos en “*días largos*” en comparación con aquellos mantenidos en “*días cortos*”. En el presente estudio los machos donadores se mantuvieron en condiciones que semejabán días largos. Sin embargo, es posible considerar que la composición de las secreciones de las glándulas del mentón de los machos pueda variar a lo largo el día, mencionando que los conejos silvestres son crepusculares y es en este periodo en el que muestran mayor actividad de marcaje (Mykutowycz 1965).

Diversos olores que pueden ser importantes en los sistemas de comunicación química de los mamíferos son productos de origen microbiano. Por ejemplo, algunas feromonas de los mamíferos son producidas por medio de fermentación bacteriana, tal como ocurre con la secreción de ácidos grasos en las glándulas anales de los zorros (Albone & Perry 1976 citado en Wyatt 2008). Diversas áreas del cuerpo de un individuo tales como bolsas, sacos, invaginaciones, superficie de la piel, etc. son adecuadas para la producción de olores generados por microorganismos. En general, los microorganismos anaerobios son importantes productores de olores (Morris 1977 citado en Albone & Shirley 1984), sin embargo algunos aerobios son también

productores de olores (Collins 1976, Labows *et al* 1980 citados en Albone & Shirley 1984). Las regiones del cuerpo donde se ha reportado evidencia de la producción de olores que pueden ser semioquímicamente importantes generados por microorganismos son el tracto genital, cavidad oral, superficie de la piel, axilas y sacos anales. La superficie de la piel está colonizada por una variedad de organismos que probablemente contribuyan al olor corporal característico de cada especie (Albone & Shirley 1984).

A pesar de que no se ha determinado completamente la composición química de las secreciones de las glándulas submandibulares del conejo doméstico (ver Capítulo I sección 2.1. Fuentes de olores), es difícil pensar que dichas secreciones no contengan compuestos químicos que puedan ser un sustrato adecuado para la actividad microbiana. Goodrich & Mykytowycz (1972) realizaron homogenizados de glándulas del mentón y reportaron que monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos son los componentes principales. También, mediante electroforesis en gel agar de las secreciones puras de las glándulas del mentón, se identificaron en las secreciones de los machos carbohidratos unidos a proteínas como componentes principales. Los autores mencionan que las secreciones de estas glándulas pueden adquirir propiedades odoríferas después de la descomposición por bacterias, tal como ocurre con el sudor humano (Shehadeh & Kligman 1963, citado en Akutsu *et al* 2006).

Posteriormente, Goodrich (1983) examinó los compuestos volátiles de las secreciones de las glándulas del mentón y encontró que los principales eran compuestos aromáticos y solo pocos alifáticos. Un estudio más reciente que utilizó cromatografía de gases identificó 34 compuestos volátiles diferentes, principalmente hidrocarburos aromáticos y alifáticos, también identificó derivados del benceno que fueron los compuestos más diversos en las secreciones (Hayes *et al* 2002). Si las secreciones de las glándulas del mentón son un sustrato para los microorganismos, se requiere de estudiar si los productos de la posible acción microbiana tienen alguna función en comunicación química.

En la investigación referente a la comunicación química actualmente se desconoce si la señalización de los machos está dirigida a las hembras o si éstas utilizan las señales odoríferas que los machos dirigen a otros machos competidores (Gosling & Roberts 2001). Posiblemente la información contenida en las marcas del mentón de los machos del conejo está dirigido a otros machos y no a las hembras. Sin embargo, en este estudio se esperaba que las hembras del conejo respondieran a las marcas del mentón de los machos, ya que las marcas odoríferas pueden indicar a otros machos competidores la habilidad competitiva, como ocurre con los ratones (Gosling *et al* 1996, Rich & Hurst 1998). También, los resultados de estudios previos en conejas citados al inicio de esta discusión, sugieren que las hembras responden diferencialmente a las marcas del mentón de los machos, por ello es de sorprender que parece ser que las hembras no utilicen las marcas odoríferas en su elección de pareja.

Finalmente, otra razón para explicar por qué las hembras en este estudio no respondieron como se esperaba a las marcas del mentón de los machos particulares es necesario considerar sus “preferencias” individuales debidas a la variación individual de los machos. En otras especies

de mamíferos, como el tejón europeo (*Meles meles*), se ha reportado que los extractos de las glándulas subcaudales de esta especie varían considerablemente entre los individuos, de tal manera que cada uno posee una “*firma química*” única (Buesching *et al* 2002). Patrones similares se han observado en las secreciones producidas por los hurones (*Mustela furo*, Zhang *et al* 2005), pandas gigantes (*Ailuropoda melanoleuca*, Hagey & Macdonald 2003) y diversas especies de venados (Lawson *et al* 2000). Además, existen algunas evidencias que muestran que las hembras son atraídas a los olores de machos genéticamente más diferentes a ellas (Yamazaki *et al* 1976, Penn & Potts 1998b).

En los ratones se ha sugerido que el olor producido por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés *Major Histocompatibility Complex*) influye en la elección de pareja, parece ser que los machos y hembras prefieren como pareja a un individuo con MHC diferente al propio (Yamazaki *et al* 1976, Yamazaki *et al* 1978, Yamazaki *et al* 1988, Egid & Brown 1989, Eklund *et al* 1991, Potts *et al* 1991). En los conejos domésticos un estudio reportó variación entre los individuos en la composición de las secreciones de las glándulas anales y del mentón (Goodrich & Mykytowycz 1972). Cabe mencionar que el objetivo de dichos estudios no era investigar la calidad de las parejas potenciales o la elección femenina de pareja. Las hembras pudieron tener un macho “*preferido*” particular que posiblemente pudo ser genéticamente más diferente a ella.

Debido al hecho de no haber obtenido evidencia de elección femenina de pareja en respuesta a las marcas del mentón de los machos, se decidió utilizar no solo las marcas del mentón del macho, sino al propio macho. Dicho trabajo se presenta en el siguiente capítulo.

5. Referencias

Akutsu T, Sekiguchi K, Ohmori T, Sakurada K (2006) Individual comparisons of the levels of (E)-3-methyl-2-hexenoic acid, an axillary odor-related compound, in Japanese. *Chem Senses* 31:557-563.

Albone ES, Perry GC (1976) Anal sac secretion of the red fox, *Vulpes vulpes*: volatile fatty acids and diamines: implications for a fermentation hypothesis of chemical recognition. *J Chem Ecol* 2:101-111.

Albone ES, Shirley SG (1984) Mammalian semiochemistry. The investigation of chemical signals between mammals. Wiley & Sons, Oslo.

Anderson M (1994) Sexual selection. Princeton University Press, Princeton.

Arakawa H, Blanchard DC, Arakawa K, Dunlap C, Blanchard RJ (2008) Scent marking behavior as an odorant communication in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 32:1236-1248.

Arteaga ML (2002) Papel del sistema vomeronasal en la percepción de las señales químicas contenidas en la secreción de las glándulas submandibulares de coespecíficos en el conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*). Tesis de Maestría, Instituto de Neuroetología, Universidad Veracruzana. Jalapa, Veracruz, México.

- Arteaga L, Bautista A, Martínez-Gómez M, Nicolás L, Hudson R (2008) Scent marking, dominance and serum testosterone levels in male domestic rabbits. *Physiol Behav* 94:510-515.
- Bateman AJ (1948) Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity* 2:349-368.
- Bell DJ (1977) Aspects of the social behaviour of wild and domesticated rabbits *Oryctolagus cuniculus* (L.). Ph. D. Thesis, University of Wales, UK.
- Bell DJ (1983) Mate choice in the European rabbit. En Bateson PPG (Ed) *Mate choice*. Cambridge University Press, Cambridge. Pp 211-223.
- Bronson FH (1976) Urine-marking in mice: causes and effects. En Doty RL (Ed) *Mammalian olfaction, reproductive processes, and behavior*. Academic Press, New York. Pp 119-141.
- Bronson FH (1979) The reproductive ecology of the house mouse. *Q Rev Biol* 54:265-299.
- Buesching CD, Waterhouse JS, Macdonald DW (2002) Gas-chromatographic analyses of the subcaudal gland secretion of the European badger (*Meles meles*) Part I: Chemical differences related to individual parameters. *J Chem Ecol* 28:41-56.
- Collins RP (1976) Terpenes and odoriferous materials from microorganisms. *Lloydia* 39:20-24.
- Darwin C (1871) *The descent of man and selection in relation to sex*. 1st Edition, John Murray, London.
- Desjardins C, Maruniak JA, Bronson FH (1973) Social rank in house mice: differentiation revealed by ultraviolet visualization of urine marking patterns. *Science* 182:939-941.
- Drickamer LC (1989) Odor preferences of wild stock female house mice (*Mus domesticus*) tested at three ages using urine and other cues from conspecific males and females. *J Chem Ecol* 15:1971-1987.
- Drickamer LC (1992) Oestrous female house mice discriminate dominant from subordinate males and sons of dominant from sons of subordinate males by odour cues. *Anim Behav* 43:868-870.
- Egid K, Brown JL (1989) The major histocompatibility complex and female mating preferences in mice. *Anim Behav* 38:548-549.
- Eklund A, Egid K, Brown JL (1991) The major histocompatibility complex and mating preferences of male mice. *Anim Behav* 42:693-694.
- Evsikov VI, Nazarova GG, Potapov MA (1994) Female odor choice, male social rank, and sex ratio in the water vole. *Adv Biosci* 93:303-307.
- Ferkin MH, Sorokin ES, Renfroe MW, Johnston RE (1994) Attractiveness of male odors to females varies directly with plasma testosterone concentration in meadow voles. *Physiol Behav* 55:347-353.
- Folstad I, Karter AJ (1992) Parasites, bright males, and the immunocompetence handicap. *Am Nat* 139:603-622.
- Goodrich BS (1983) Studies of the chemical composition of secretions from the skin glands of the rabbit *Oryctolagus cuniculus*. En Müller-Schwarze D, Silverstein RM (Eds) *Chemical signals in vertebrates 3*. Plenum Press, New York. Pp 275-290.
- Goodrich BS, Mykytowycz R (1972) Individual and sex differences in the chemical composition of pheromone-like substances from the skin glands of the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *J Mammal* 53:540-548.

- Gosling LM, Atkinson NW, Dunn S, Collins SA (1996) The response of subordinate male mice to scent marks varies in relation to their own competitive ability. *Anim Behav* 52:1185-1191.
- Gosling LM, Roberts SC, Thornton EA, Andrew MJ (2000) Life history costs of olfactory status signaling in mice. *Behav Ecol Sociobiol* 48:328-332.
- Gosling LM, Roberts SC (2001) Scent-marking by male mammals: cheat-proof signals to competitors and mates. *Adv Study Behav* 30:169-217.
- Hagey L, Macdonald E (2003) Chemical cues identify gender and individuality in giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*). *J Chem Ecol* 29:1479-1488.
- Hamilton WD, Zuk M (1982) Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science* 218:384-387.
- Hayes RA, Richardson BJ, Claus SC, Wyllie SG (2002) Semiochemicals and social signaling in the wild European rabbit in Australia. II. Variations in chemical composition of chin gland secretion across sampling sites. *J Chem Ecol* 28:2613-2625.
- Hillgarth N, Wingfield JC (1997) Parasite-mediated sexual selection: endocrine aspects. En Clayton DH, Moore J (Eds) *Host-parasite evolution: general principles and avian models*. Oxford University Press, Oxford. Pp 78-104.
- Hudson R, Distel H (1990) Sensitivity of female rabbits to changes in photoperiod as measured by pheromone emission. *J Comp Physiol A* 167:225-230.
- Hudson R, Vodermayr T (1992) Spontaneous and odour-induced chin marking in domestic female rabbits. *Anim Behav* 43:329-336.
- Hudson R, Melo AI, González-Mariscal G (1994) Effect of photoperiod and exogenous melatonin on correlates of estrus in the domestic rabbit. *J Comp Physiol A* 175: 573-579.
- Hurst JL (1990) Urine marking in populations of wild house mice *Mus domesticus* Ratty. III. Communication between the sexes. *Anim Behav* 40:233-243.
- Hurst JL, Robertson DHL, Tolladay U, Beynon RJ (1998) Proteins in urine scent marks of male house mice extend the longevity of olfactory signals. *Anim Behav* 55:1289-1297.
- Johansson BG, Jones TM (2007) The role of chemical communication in mate choice. *Biol Rev* 82:265-289.
- Johnston RE (1977) The causation of two scent-marking behaviour patterns in female hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Anim Behav* 25:317-327.
- Jones RB, Nowell NW (1974) A comparison of the aversive and female attractant properties of urine from dominant and subordinate male mice. *Anim Learn Behav* 2:141-144.
- Kavaliers M, Colwell DD (1995a) Discrimination by female mice between the odours of parasitized and non-parasitized males. *Proc R Soc Lond* 261:31-35.
- Kavaliers M, Colwell DD (1995b) Odours of parasitized males induce aversive responses in female mice. *Anim Behav* 50:1161-1169.
- Kimura T, Hagiwara Y (1985) Regulation of urine marking in male and female mice: effects of sex steroids. *Horm Behav* 19:64-70.
- Klein SL, Gamble HR, Nelson RJ (1999) *Trichinella spiralis* infection in voles alters female odor preference but not partner preference. *Behav Ecol Sociobiol* 45:323-329.

- Labows JN, McGinley KJ, Webster GF, Leyden JJ (1980) Headspace analysis of volatile metabolites of *Pseudomonas aeruginosa* and related species by gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 12:521-526.
- Lawson RE, Putman RJ, Fielding AH (2000) Individual signatures in scent gland secretions of Eurasian deer. *J Zool* 251:399-410.
- Martínez-Gómez M, Guarneros M, Zempoalteca R, Hudson R (1997) A comparison of spontaneous and odour-induced chin marking in male and female domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Ethology* 103:893-901.
- Maruniak JA, Owen K, Bronson FK, Desjardins C (1974) Urinary marking in male house mice: responses to novel environmental and social stimuli. *Physiol Behav* 12:1035-1039.
- McGregor PK (1993) Signalling in territorial systems: A context for individual identification, ranging and eavesdropping. *Phil Trans R Soc Lond* 340:237-244.
- Morris JG (1977) Obligately anaerobic bacteria. *Trends Biochem Sci* 2:81-84.
- Moshkin M, Gerlinskaya L, Morozova O, Bakhvalova V, Evsikov V (2002) Behaviour, chemosignals and endocrine functions in male mice infected with tick-borne encephalitis virus. *Psychoneuroendocrinol* 27:603-608.
- Mucignat-Caretta C, Caretta A, Baldini E (1998) Protein-bound male urinary pheromones: differential responses according to age and gender. *Chem Senses* 23:67-70.
- Mykytowycz R (1965) Further observations on the territorial function and histology of the submandibular cutaneous (chin) gland in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus* (L.). *Anim Behav* 13:400-412.
- Novotny M, Schwende FJ, Wiesler D, Jorgenson JW, Carmack M (1984) Identification of a testosterone-dependent unique volatile constituent of male mouse urine: 7-exo-ethyl-5-methyl-6,8-dioxabicyclo [3,2,1]-3-octene. *Experientia* 40:217-219.
- Owens IPF, Rowe C, Thomas ALR (1999) Sexual selection, speciation and imprinting: separating the sheep from the goats. *Trends Ecol Evol* 14:131-132.
- Penn D, Potts WK (1998a) Chemical signals and parasite-mediated sexual selection. *Trends Ecol Evol* 13:391-396.
- Penn D & Potts WK (1998b) Untrained mice discriminate MHC-determined odors. *Physiol Behav* 64:235-243.
- Penn D, Schneider G, White K, Slev P, Potts W (1998) Influenza infection neutralizes the attractiveness of male odor to female mice (*Mus musculus*). *Ethology* 104:685-694.
- Potts WK, Manning CJ, Wakeland EK (1991) MHC genotype influences mating patterns in semi-natural populations of *Mus*. *Nature* 352:619-621.
- Rich TJ, Hurst JL (1998) Scent marks as reliable signals of the competitive ability of mates. *Anim Behav* 56:727-735.
- Rosell F, Sanda JI (2006) Potential risk of olfactory signaling: the effect of predators on scent marking by beavers. *Behav Ecol* 17:897-904.
- Shehadeh N, Kligman AM (1963) The bacteria responsible for axillary odor. II. *J Investig Dermatol* 41:39-43.

- Tang-Martínez Z, Mueller LL, Taylor GT (1993) Individual odours and mating success in the golden hamster, *Mesocricetus auratus*. *Anim Behav* 45:1141-1151.
- Taylor GT, Haller J, Regan D (1982) Female rats prefer an area vacated by a high testosterone male. *Physiol Behav* 28:953-958.
- Trivers RL (1972) Parental investment and sexual selection. In Campbell B (Ed) *Sexual selection and the descent of man 1871-1971*. Aldine, Chicago. Pp 136-179.
- Viitala J, Korpimäki E, Palokangas P, Koivula M (1995) Attraction of kestrels to vole scent marks visible in ultraviolet light. *Nature* 373:425-427.
- Wedekind C, Folstad I (1994) Adaptive or nonadaptive immunosuppression by sex hormones? *Am Nat* 143:936-938.
- White P, Fischer RB, Meunier GF (1986) Female discrimination of male dominance by urine odor cues in hamsters. *Physiol Behav* 37:273-277.
- Willis C, Poulin R (2000) Preference of female rats for the odours of non-parasitized males: the smell of good genes. *Folia Parasitol* 47:6-10.
- Wyatt TD (2008) *Pheromones and animal behaviour: Communication by smell and taste*. Cambridge University Press, Cambridge. Pp 37-73.
- Yamazaki K, Boyse EA, Mike V, Thaler HT, Mathieson BJ, Abbott J, Boyse J, Zayas ZA, Thomas L (1976) Control of mating preferences in mice by genes in the major histocompatibility complex. *J Exp Med* 144:1324-1335.
- Yamazaki K, Yamaguchi M, Andrews PW, Peake B, Boyse EA (1978) Mating preferences of F2 segregants of crosses between MHC-congenic mouse strains. *Immunogenetics* 6:253-259.
- Yamazaki K, Beauchamp GK, Kupniewski D, Bard J, Thomas L, Boyse EA (1988) Familial imprinting determines H-2 selective mating preferences. *Science* 240:1331-1332.
- Zahavi A (1975) Mate selection- a selection for a handicap. *J Theor Biol* 53:205-214.
- Zala SM, Potts WK, Penn DJ (2004) Scent-marking displays provide honest signals of health and infection. *Behav Ecol* 15:338-344.
- Zhang JX, Soini HA, Bruce KE, Wiesler D, Woodley SK, Baum MJ, Novotny MV (2005) Putative chemosignals of the ferret (*Mustela furo*) associated with individual and gender recognition. *Chem Senses* 30:727-737.

IV PROPUESTA DE UN MÉTODO PARA REALIZAR PRUEBAS DE ELECCIÓN FEMENINA DE PAREJA EN CONEJOS

La intención del trabajo que se presenta a continuación era publicar la metodología que se utilizó para tratar de responder a preguntas sobre elección femenina de pareja en el conejo doméstico, lo que no es posible en este momento debido a los inesperados resultados negativos que se obtuvieron y la dificultad para interpretarlos.

Resumen

Existen algunos estudios que utilizan diversos métodos y modelos animales para responder a preguntas sobre elección femenina de pareja en mamíferos. En los conejos faltan trabajos que exploren si las hembras realizan elección de pareja y cómo realizan tal elección. El presente trabajo pretendió proponer un método para responder a preguntas sobre elección femenina de pareja en esta especie. La hipótesis planteada fue que en pruebas de elección entre machos (intacto *versus* castrado) las hembras “preferirán” al macho intacto. Se utilizaron conejos domésticos adultos de la raza chinchilla, el método consistió en evaluar la elección por parte de una hembra entre dos opciones extremas de estímulos (un macho intacto y uno castrado) utilizando una arena de doble elección, un lado ocupado por el macho intacto y el otro por el castrado. Se realizaron cuatro pruebas por hembra, dos pruebas de elección con machos y dos pruebas sin machos. Se registraron las conductas que realizó la hembra en cada lado de la arena: frecuencia de marcaje por frotamiento del mentón, número de veces que tocó con la nariz el sitio donde se encontraba cada macho, frecuencia de visitas y el tiempo total que permaneció en cada lado. La conducta que desplegaron tanto los machos estímulo como las hembras dentro de la arena de doble elección sugiere que ésta fue bien aceptada por los animales. Las hembras mostraron diferencias individuales en la frecuencia de marcaje del mentón. Las hembras percibieron y respondieron a los machos estímulo ya que aumentaron significativamente su frecuencia de marcaje del mentón, contactos con la nariz y fueron más activas en comparación con las pruebas control sin machos. Las hembras no “preferieron” al macho intacto dado que no hubo diferencias significativas en la frecuencia de marcaje por frotamiento del mentón, contactos con la nariz, frecuencia y duración de visitas realizadas por las hembras en el lado del macho intacto en comparación con el castrado. Se discutieron las posibles causas de por qué las hembras no “preferieron” al macho intacto: no hubo interacción directa del macho con la hembra, las hembras solo son atraídas a los olores de la orina de los machos con la que ya han tenido contacto previo, variabilidad genética de los animales y respuesta de las hembras a coespecíficos intrusos.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Introducción

Sobre la elección femenina de pareja en mamíferos se han planteado diversas preguntas y se han utilizado algunos métodos como los laberintos en “Y” o en “T” y arenas de observación que consisten en cajas adaptadas para responder a una pregunta particular. Se han utilizado como estímulos a los animales en diferentes condiciones, o bien, sus olores. Utilizando estos métodos los resultados de estos estudios, realizados principalmente con roedores como ratas, ratones y hámsteres muestran evidencias de elección femenina de pareja. Por ejemplo, las hembras discriminaron entre machos castrados e intactos y realizaron más marcas con orina en presencia de olores de machos intactos. Además, marcaron más sobre los olores de los machos que tenían las concentraciones más altas de testosterona y los machos castrados inyectados con testosterona fueron atractivos a las hembras (Taylor *et al* 1982, Ferkin *et al* 1994). Se ha reportado también que las hembras pueden discriminar el rango social de los machos ya que pasaron significativamente más tiempo cerca de los olores de machos dominantes en comparación con los olores de machos subordinados (White *et al* 1986, Evsikov *et al* 1994). Además, las hembras mostraron estro cuando se formaron parejas de una hembra con un macho dominante, no así cuando las hembras permanecieron con machos subordinados. También, las camadas producidas por machos dominantes fueron de tamaño más grande en comparación con las camadas de los machos subordinados y el número de crías hembra fue menor en las camadas de los machos subordinados (Evsikov *et al* 1994).

Además del rango social, puede haber otros factores que afecten la elección femenina de pareja, por ejemplo, el estado de salud de los machos, el MHC (por sus siglas en inglés, *Major Histocompatibility Complex*), la exposición a compuestos químicos e incluso en etapas tempranas del desarrollo la disponibilidad de recursos maternos y el aprendizaje olfativo. Los resultados de algunos estudios sugieren que el estado de salud de los machos puede afectar su atractivo a las hembras, ya que éstas parecen preferir los olores de los machos no parasitados en comparación con los parasitados (Kavaliers & Colwell 1995, Zala *et al* 2004).

Los olores que distinguen a un individuo de otro genéticamente determinados por el MHC contenidos, por ejemplo, en la orina de los ratones afectan la conducta reproductiva, ya que los individuos eligen a las parejas genéticamente más diferentes a ellos (Yamazaki *et al* 1994, Penn & Potts 1998). Otro estudio plantea que la atractividad de los individuos puede ser afectada por exposición a compuestos químicos que producen efectos epigenéticos, de tal manera que se puede comprometer el éxito reproductivo de tales individuos. Se examinó la preferencia de pareja en hembras y machos, después de varias generaciones cuyos progenitores fueron tratados con un fungicida antiandrogénico. Después de tres generaciones las hembras prefirieron a los machos cuyos progenitores no fueron expuestos al fungicida, este efecto fue específico de sexo ya que los machos no mostraron tal preferencia (Crews *et al* 2007).

Se ha sugerido que la variación en el acceso a los recursos maternos puede afectar el fenotipo reproductivo de las hembras. Aquellas nacidas de madres gestantes – lactantes prefirieron

menos a sus parejas, fueron más pequeñas, menos fecundas y sus camadas mostraron un sesgo hacia hembras (Clark *et al* 2006). Durante el desarrollo temprano el aprendizaje olfativo puede tener efecto sobre las preferencias por olores sexuales. Las hembras que crecieron sin hermanos realizaron marcaje vaginal igual en respuesta a los olores volátiles tanto de machos como de hembras. Sin embargo, cuando las hembras tuvieron contacto con los estímulos odoríferos marcaron preferentemente hacia los olores de macho. Ello sugiere que las hembras requieren de la exposición a olores de macho durante el desarrollo temprano para desplegar marcaje vaginal en respuesta a los componentes volátiles de los olores sexuales. En cambio, las preferencias de las hembras de investigar olores volátiles de machos y hembras no requiere de esta experiencia quimiosensorial temprana (Maras & Petrulevicius 2008).

También se han realizado estudios con otros mamíferos diferentes de los roedores como la zarigüeya, en la que los machos más grandes compiten exitosamente por los apareamientos, por ello fueron considerados socialmente dominantes, además, sobrevivieron más tiempo después de su primer apareamiento. Las hembras no prefirieron a los machos más grandes directamente, sino que “*juzgaron*” el rango del macho observando directamente las interacciones competitivas entre machos y rechazaron a los que perdieron las contiendas (Fisher & Cockburn 2006).

Los roedores son un modelo ampliamente utilizado en los estudios de laboratorio cuyos resultados aportan valiosas evidencias sobre elección femenina de pareja en mamíferos. Las evidencias sobre este tópico reportadas en estudios con otros mamíferos diferentes de los roedores son pocas. Posiblemente no sea adecuado generalizar los resultados que aportan los estudios con roedores a todos los mamíferos terrestres. El uso de otros modelos de mamíferos permite comprender mejor este fenómeno biológico y también cómo ocurre según la forma de vida de una especie determinada. Además, el uso de diversos implementos como las arenas de doble elección o los laberintos es indispensable, así como ajustar éstos o diseñar otros dependiendo de las preguntas planteadas y modelo animal utilizado. Los resultados obtenidos pueden coincidir o no con los resultados previos, o bien apoyar y algunas veces refutar las hipótesis planteadas.

En los conejos faltan estudios que muestren que las hembras pueden realizar elección de pareja, además, que exploren cómo las conejas realizan tal elección, qué canales sensoriales utilizan, qué características poseen las parejas potenciales y cómo dicha elección puede afectar su éxito reproductivo, por ejemplo el número de crías nacidas vivas o peso de éstas, incluso el éxito reproductivo de dichas crías en etapa adulta. Bell (1983) discute los posibles procesos mediante los cuales las hembras del conejo (*Oryctolagus cuniculus*) pueden valorar la calidad de las parejas potenciales.

Un estudio realizado por Reece-Engel (1988) puso a prueba la hipótesis de que las hembras son capaces de valorar la residencia de un macho con base en la predominancia de su olor en el ambiente. En este estudio se observó la respuesta de las hembras en una situación de doble elección, se utilizó un área de prueba que consistía de dos encierros vecinos. La residencia de los machos se estableció alojando a cada macho en cada encierro durante siete días antes de las pruebas, durante las éstas los machos se intercambiaron de encierro de tal manera que ambos

fueron tanto “residentes” como “no residentes” para cada hembra. La hembra se colocó en una localización central. Durante las pruebas cada macho se mantuvo en una caja individual colocada en un extremo del encierro. Las hembras pasaron más tiempo, marcaron e investigaron más en el encierro del macho “residente” que en el encierro del macho “no residente” a pesar de que los mismos machos eran tanto “residentes” como “no residentes”.

La capacidad de un macho de mantener su territorio, es decir, cuando solo su olor predomina en su ambiente puede ser un atributo que las hembras utilizan (posiblemente identificando el olor del macho en su encierro) para elegir una pareja. Sin embargo, es posible que éste no sea el único atributo atractivo para las hembras, de tal manera que se requiere investigar qué otras características utilizan las hembras para elegir a un macho. Siendo ésta una especie tan olfativa, es de esperar que los olores depositados o emitidos por los machos sean atributos que utilicen las hembras en su elección de pareja, no se ha descrito qué “atributos odoríferos” de los machos utilizan las hembras. Si el marcaje del mentón es energéticamente costoso, posiblemente sea éste una característica de calidad en los machos. Más aún si refleja resistencia a ciertas infecciones o carga parasitaria, posiblemente el olor de las secreciones de las glándulas submandibulares se modifique cuando el macho padece alguna infección o posee una carga parasitaria importante.

Una vez que las hembras han elegido una pareja, cabe preguntarse cuáles son las consecuencias de dicha elección para su éxito reproductivo, por ejemplo, si quedó o no gestante, cuántas crías nacieron, cuánto pesaron, son éstas resistentes a enfermedades, son los hijos marcadores o no, esto último si la tasa de marcaje por frotamiento del mentón fuera un atributo heredable.

Finalmente, cabe señalar que aún es necesario realizar más estudios sobre elección femenina de pareja en conejos, por ello el objetivo de este trabajo es proponer un método para responder a estas y otras preguntas sobre elección femenina de pareja en esta especie.

La hipótesis que planteamos fue que las hembras distinguirán entre machos con diferente condición reproductiva y “preferirán” a uno en particular.

Las predicciones fueron las siguientes. En pruebas de doble elección (macho intacto *versus* castrado) las hembras:

- Realizarán más marcas odoríferas (marcas del mentón) en el lugar del macho intacto.
- Tocarán más veces con la nariz la puerta del macho intacto.
- Visitarán más el lugar del macho intacto.
- Pasarán más tiempo en el lugar del macho intacto.

En pruebas control (lugares limpios y sin machos) las hembras:

- Marcarán con el mentón indistintamente ambos lugares.
- Tocarán con la nariz ambas puertas indistintamente.

- Visitarán ambos lugares indistintamente.
- Pasarán la misma cantidad de tiempo en ambos lugares.
- Estarán menos activas en comparación con las pruebas realizadas en presencia de machos.

2. Descripción general del método para realizar pruebas de elección femenina de pareja en conejos

El método consistió en que un individuo, una hembra en este caso, podía elegir entre dos opciones de estímulos (en un contexto de elección femenina de pareja), en este caso particular, entre un macho intacto y uno castrado. Las características de la arena de observación que se utilizó se describe en la sección 3.2., Fig. 1. Con este método es posible colocar dos estímulos diferentes para que las hembras del conejo puedan elegir entre éstos. Por ejemplo, un hermano *versus* un macho extraño, un macho infectado *versus* uno sano, machos con diferentes niveles de testosterona o cortisol, un macho de la misma especie *versus* una especie diferente de lagomorfo, entre otros. Además, la arena de doble elección brinda la posibilidad de colocar como estímulo un individuo o bien, sólo un objeto previamente marcado por éste.

3. Métodos

Los datos fueron colectados entre 4 de noviembre y 9 de diciembre de 2008, todos los animales se mantuvieron en el bioterio del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México. Los animales se alojaron en el bioterio en jaulas metálicas individuales que medían 90 x 60 x 40 cm y con un ciclo de luz/oscuridad constante de 16:8 h simulando la estación de apareamiento en su nativa Europa (Hudson & Distel 1990). La temperatura ambiental se mantuvo a 20 ± 4 °C, con agua *ad libitum* y 150 g/ animal/ día de alimento comercial Conejina de Purina®. La ventilación del bioterio se realizó mediante ventiladores de extracción.

3.1. Animales

Se utilizaron conejos domésticos adultos de la raza chinchilla. La edad promedio de las hembras ($n=8$) fue de 16.8 meses, DE 15.16, con un peso promedio de 4.23 Kg, DE 0.54 y entre 0 – 19 apareamientos y 0 – 9 partos.

Los machos que se utilizaron como estímulo fueron intactos ($n=4$) y castrados ($n=2$), los primeros eran los reproductores de la colonia del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, la

edad de los machos intactos fue de 33 meses aproximadamente y con un peso promedio de 4.22 Kg, DE 0.35. La edad de los machos castrados era de seis meses al inicio de las pruebas, con un peso de 2.700 y 3.300 Kg cada uno, una vez castrados se dejaron pasar 30 días antes de comenzar las pruebas.

Castración de los machos. Se anestesió a los machos con 0.2 ml/ kg de peso corporal de ketamina por vía intramuscular y 1 ml/ Kg de peso corporal de pentobarbital por vía intraperitoneal. Se realizó la asepsia del escroto y área perigenital eliminando el pelo mediante una máquina de rasurar y limpiando con gasa y una solución de benzalconio al 10%. A continuación, con tijeras quirúrgicas se realizó una incisión de 1.0 cm aproximadamente sobre la piel del escroto de cada testículo, una vez expuesto éste, se ligó el cordón espermático y vasos sanguíneos con catgut calibre 000 para evitar hemorragia y se disecó. Finalmente se suturó la piel con hilo de seda marca ATRAMAT calibre 000, el mismo procedimiento se realizó con el otro testículo. Se administró como antiséptico y cicatrizante Matacresa de Pfizer® en aerosol directamente sobre ambas heridas. En los días posteriores a la cirugía se revisaron las heridas de los machos hasta su completa cicatrización.

3.2. Procedimiento experimental

Se utilizó una arena de observación de doble elección. La arena era metálica circular de 1 m de diámetro, tenía dos jaulas accesorias, una a cada lado (Fig. 1). Cada una medía 64 x 47 x 40 cm. Cada jaula accesoria tenía una puerta con salida hacia la arena, fabricada con un material metálico ligero que tenía libre movimiento, es decir, que un conejo podía entrar y salir a través de la puerta libremente. Además, las puertas podían cerrarse de tal manera que un conejo pudiera entrar pero no salir y viceversa. Las jaulas accesorias tenían además, una puerta en la parte superior, que permitía introducir y sacar al animal. Frente a la puerta de libre movimiento de cada jaula accesoria y hacia el lado derecho de ésta, se colocó un poste de madera (23.5 cm de diámetro en la base, 10 cm de altura) fijo en el piso de la arena mediante un tornillo, cada poste se cubrió con un vaso de plástico para que la hembra realizara marcaje del mentón. Los vasos se cambiaron en cada prueba.

Los postes de madera para que los animales realizaran marcaje del mentón, son de fácil manipulación debido a su tamaño pequeño. Los vasos que cubrían a los postes pueden utilizarse varias veces, ya que pueden lavarse continuamente para eliminar los olores depositados sobre éstos por los conejos, tanto los postes de madera como los vasos de plástico son económicos y de fácil adquisición. Finalmente, los postes cubiertos con los vasos fueron bien aceptados por los animales como objetos de marcaje del mentón. Estas son las ventajas de utilizar dichos postes en comparación con los bloques de ladrillos utilizados en estudios previos.

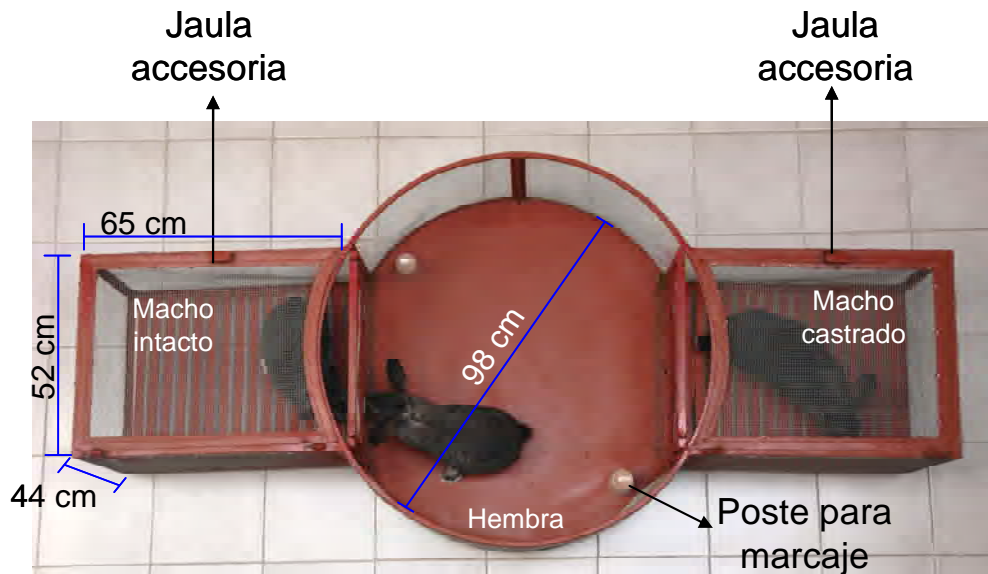


Fig. 1. Arena de doble elección. Colocación de una hembra en el centro y dos machos, cada uno dentro de las jaulas accesorias.

Habitación y entrenamiento de las hembras. Las hembras se habituaron a permanecer en la arena de observación y fueron entrenadas para entrar y salir de las jaulas accesorias de la arena a través de las puertas. En primer lugar, se colocó a la hembra en el centro de la arena por 30 min con ambas puertas abiertas por dos días, de tal manera que la hembra inspeccionara las jaulas accesorias y aprendiera a entrar y salir sin obstáculos. Los tres días siguientes, se colocó a la hembra en forma similar a los primeros dos días, sólo que esta vez con las puertas cerradas pero con libre movimiento y durante 60 min. Una vez colocada la coneja en el centro de la arena se dejaron pasar cinco minutos, después se empujó a la hembra (colocando una mano sobre su cadera) contra una de las puertas hasta introducirla dentro de la jaula accesoria, esta operación se realizó dos o tres veces el mismo día de tal manera que la hembra aprendiera a empujar por sí misma las puertas y a entrar y salir de ambas jaulas. Las hembras aprendieron a entrar y salir de dichas jaulas en dos o tres horas aproximadamente.

Cabe mencionar que aunque las hembras aprendieron a entrar y salir de las jaulas accesorias, durante la prueba no se les permitió entrar a éstas para evitar el apareamiento con los machos. Sin embargo, el hecho de que las hembras aprendan a entrar a dichas jaulas provee la posibilidad de realizar estudios posteriores sobre elección femenina de pareja en conejos, permitiendo a las hembras aparearse con el “macho de su elección” y observando las consecuencias de dicha elección, por ejemplo, si quedó o no gestante y el número, sexo y peso de crías nacidas.

Habitación de los machos estímulo. Los machos estímulo fueron habituados a permanecer dentro de cada jaula accesoria, se colocó un macho intacto y uno castrado en cada una de las jaulas accesorias con las puertas cerradas durante 15 min por tres días.

Pruebas de elección. Una vez habituados y entrenados los animales, se procedió a realizar las pruebas de elección (Fig. 2). Éstas se realizaron por la tarde, entre 16:00 y 18:30 h cuando los animales son más activos (Wallage-Drees 1989 citado en Villafuerte *et al* 1993). Se realizaron cuatro pruebas por hembra, dos pruebas de elección (E1 y E2) utilizando machos estímulo intactos y castrados diferentes y dos pruebas con las jaulas accesorias vacías (sin machos, V1 y V2). En cada prueba de elección E1 y E2 se cambió la posición de los machos en las jaulas accesorias, es decir, en la prueba E1 se colocó al macho intacto en la jaula derecha y al castrado en la izquierda y viceversa en la prueba E2, ello con el objetivo de eliminar el efecto de una posible “preferencia” de lugar por parte de la hembra. Los animales estímulo (un macho sexualmente maduro e intacto *versus* uno castrado) se colocaron dentro de cada una de las jaulas accesorias con las puertas cerradas y se dejaron pasar cinco minutos. En seguida se colocó a la hembra en el centro de la arena y se le permitió inspeccionar a los machos durante otros cinco minutos, después de este tiempo la prueba tuvo una duración de 20 minutos, las pruebas con jaulas vacías duraron el mismo tiempo.

Las pruebas se grabaron con una cámara de video digital Sony HANDYCAM DCR – DVD405 que se colocó 2 m sobre la arena. Los videos se transfirieron a una PC utilizando el programa Movie Maker 2.1 (Microsoft) para su análisis. Sobre el video, la arena se dividió en dos secciones iguales mediante un acetato con una línea dibujada sobre éste, dicho acetato se colocó sobre la pantalla de la computadora, una sección era del macho castrado y la otra del intacto, o bien, una de la jaula vacía 1 y otra de la jaula vacía 2. En las cuatro pruebas se registró la frecuencia de marcaje por frotamiento del mentón que la hembra realizó en cada poste, en la puerta y arena, el número de veces que la hembra tocó con la nariz la puerta de una u otra jaula accesoria (contacto nariz – puerta), la frecuencia de visitas que realizó la hembra a cada una de las secciones y el tiempo total que permaneció en una sección u otra de la arena.

Se consideró como una visita de la hembra a una sección de la arena cuando al menos la parte anterior de la hembra (de la región torácica a la cabeza) estaba dentro de la sección.

Tratamiento	<u>HEn</u>	<u>E1</u>	<u>C1</u>	<u>E2</u>	<u>C2</u>
Duración (días)	5	1	1	1	1

Fig. 2. Secuencia temporal de pruebas. HEn) Habituaación y entrenamiento; E1) primera prueba de elección entre macho intacto *versus* castrado; C1) primera prueba control con jaulas accesorias vacías; E2) segunda prueba de elección entre macho intacto *versus* castrado; C2) segunda prueba control con jaulas accesorias vacías.

3.3. Análisis de datos

Las medidas conductuales de marcaje por frotamiento del mentón de las hembras, los contactos nariz – puerta y los cambios que realizaron las hembras a un lado y otro de la arena se obtuvieron como frecuencias, se obtuvo también el tiempo total de permanencia de las hembras en cada lado de la arena de observación en segundos. Se obtuvo el porcentaje tanto de las frecuencias como de la duración para normalizar los datos, ya que se consideraron las diferencias individuales en la actividad de las hembras. Debido a que en la mayoría de los casos se obtuvieron frecuencias las comparaciones se realizaron con la prueba estadística no paramétrica de Wilcoxon. Dichas comparaciones se realizaron seleccionando los datos en porcentaje de uno de los lados *versus* una medida hipotética del 50% ya que el valor en porcentaje de un lado afecta directamente al otro. Los lados seleccionados fueron el Lado 1 (pruebas control), el lado del macho intacto (pruebas con macho intacto *versus* castrado) y los lados con machos (cuando se compararon los datos de las pruebas control *versus* datos de pruebas con machos). Todas las medidas se asociaron a preferencia de lugar y fueron dependientes. Todas las pruebas fueron de una cola excepto las pruebas con los datos control. Las pruebas de una cola se realizaron así debido a que las hipótesis estaban dirigidas hacia el macho intacto y hacia los lados con machos. Se consideró una $p \leq 0.05$ como nivel de significación. Los análisis se realizaron con el programa GraphPad InStat (GraphPad Software Inc.).

4. Resultados

Conducta de los machos estímulo dentro de las jaulas accesorias.

Machos intactos. Cuando se colocaba a la hembra dentro de la arena de doble elección, el macho se desplazaba por toda la jaula accesoria, se acercaba a la puerta de dicha jaula, la marcaba con el mentón y la empujaba con la cabeza, el macho se levantaba sobre sus extremidades posteriores y se apoyaba con las anteriores sobre la reja superior de la puerta, también se acicalaba. Además, orinaba y defecaba heces duras, en algunos casos, cuando la hembra estaba cerca de su puerta, el macho orinó en rocío a la hembra (ver Bell 1980). En otros casos el macho inspeccionó las regiones oral y nasal de la hembra cuando ésta acercaba la cabeza a la puerta. En los casos en los que la hembra orinó cerca de la puerta de la jaula del macho, éste inspeccionó la orina de la hembra.

Machos castrados. Una vez que la hembra era colocada dentro de la arena de doble elección, el macho se desplazaba por la jaula, se acercaba a la puerta y se acicalaba. Así como el macho intacto, el castrado se levantaba sobre sus extremidades posteriores cerca de la puerta. También se le observó recostarse colocando su abdomen o flancos sobre el piso de la jaula accesoria, nunca orinó, defecó o marcó con el mentón, en algunas ocasiones hacía cabriolas.

Conducta de las hembras dentro del área central de la arena de doble elección.

Cuando la hembra era colocada dentro de la arena, se dirigía a una y otra puertas de las jaulas accesorias donde se encontraban los machos, olfateaba a los machos, se levantaba sobre sus extremidades posteriores apoyándose con las anteriores sobre las jaulas de los machos. Las hembras cambiaban de un lado a otro de la arena con alta frecuencia, algunas permanecían algún tiempo en uno de los lados. Algunas orinaban, defecaban heces duras y se acicalaban. En dos casos y durante los primeros minutos de la prueba, las hembras desplegaron conducta “agresiva” (ataques, mordidas y patadas con las extremidades anteriores) tanto hacia el macho intacto como al castrado. Las hembras realizaron marcaje por frotamiento del mentón en los postes y la arena, también tocaron con la nariz las puertas de las jaulas accesorias, en algunos casos empujando dicha puerta. En ocasiones se recostaban sobre su abdomen o costados en el piso de la arena.

Pruebas control (con jaulas accesorias vacías). Las hembras realizaron entre 3 y 77 marcas del mentón en 20 min (promedio 30.8, DE 22.02) y mostraron diferencias individuales en la frecuencia de marcaje por frotamiento del mentón ($KW=14.5$, $n=8$, $p=0.04$). No hubo diferencias significativas en la frecuencia de marcaje realizada por las hembras en uno u otro lado de la arena (*Wilcoxon*; $T=4$, $n=8$, $p=0.054$; Fig. 3 panel izquierdo). Respecto a la frecuencia de contactos de la nariz de las hembras con cada puerta de las jaulas accesorias (contacto nariz – puerta) de la arena, las hembras realizaron entre 4 y 40 contactos en 20 min (promedio 20.5, DE 10.1). No hubo diferencias significativas en la frecuencia de contactos nariz – puerta realizada por las hembras entre una u otra puerta (*Wilcoxon*; $T=8$, $n=8$, $p=0.3$; Fig. 3 panel intermedio). Finalmente, no hubo diferencias significativas en el tiempo total que pasaron las hembras en los lados de la arena (promedio 796.9 seg, DE 188.1, *Wilcoxon*; $T=4$, $n=8$, $p=0.054$; Fig. 3 panel derecho).

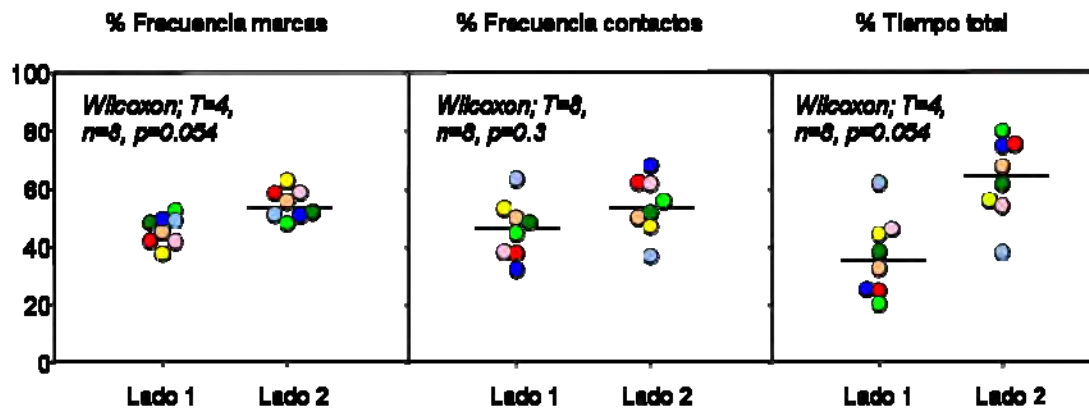


Fig. 3. Comparación de la frecuencia de marcas del mentón y contactos nariz – puerta que realizaron las hembras en los lados 1 y 2, así como el tiempo total que pasaron las hembras en cada lado en dos pruebas control (jaulas accesorias vacías) de 20 min cada una. No hubo diferencias significativas entre los lados 1 y 2 en la frecuencia de marcaje por frotamiento del mentón y contactos nariz – puerta que realizaron las hembras. Sin embargo, las hembras pasaron más tiempo en el lado 2.

Pruebas de elección entre machos estímulo en diferentes condiciones reproductivas (intacto versus castrado). En presencia de un macho intacto y uno castrado en cada una de las jaulas accesorias, las hembras realizaron entre 13 y 211 marcas del mentón en 20 min (promedio 71.3, DE 56.2). El análisis estadístico no mostró diferencias significativas en la frecuencia de marcaje por frotamiento del mentón realizada por las hembras en el lado del macho intacto en comparación con el lado del castrado en la Prueba 1 (*Wilcoxon*; $T=26$, $n=8$, $p=0.1$) y Prueba 2 (*Wilcoxon*; $T=16$, $n=8$, $p=0.4$). Se obtuvo el mismo resultado cuando el análisis se realizó con los datos de ambas pruebas (*Wilcoxon*; $T=16$, $n=8$, $p=0.4$; Fig. 4 panel superior). Respecto a la frecuencia de contactos nariz – puerta las hembras realizaron entre 28 y 74 contactos en 20 min (promedio 48.3, DE 15.2). Se obtuvieron resultados similares en la frecuencia de contactos nariz – puerta en la Prueba 1 (*Wilcoxon*; $T=8$, $n=8$, $p=0.09$), Prueba 2 (*Wilcoxon*; $T=24$, $n=8$, $p=0.2$) y ambas pruebas (*Wilcoxon*; $T=22$, $n=8$, $p=0.3$; Fig. 4 panel inferior). No se encontraron diferencias significativas en el tiempo total que las hembras permanecieron en el lado del macho intacto en comparación con el castrado en la Prueba 1 (*Wilcoxon*; $T=25$, $n=8$, $p=0.1$), Prueba 2 (*Wilcoxon*; $T=18$, $n=8$, $p=0.5$) y ambas pruebas (*Wilcoxon*; $T=24$, $n=8$, $p=0.2$; Fig. 5).

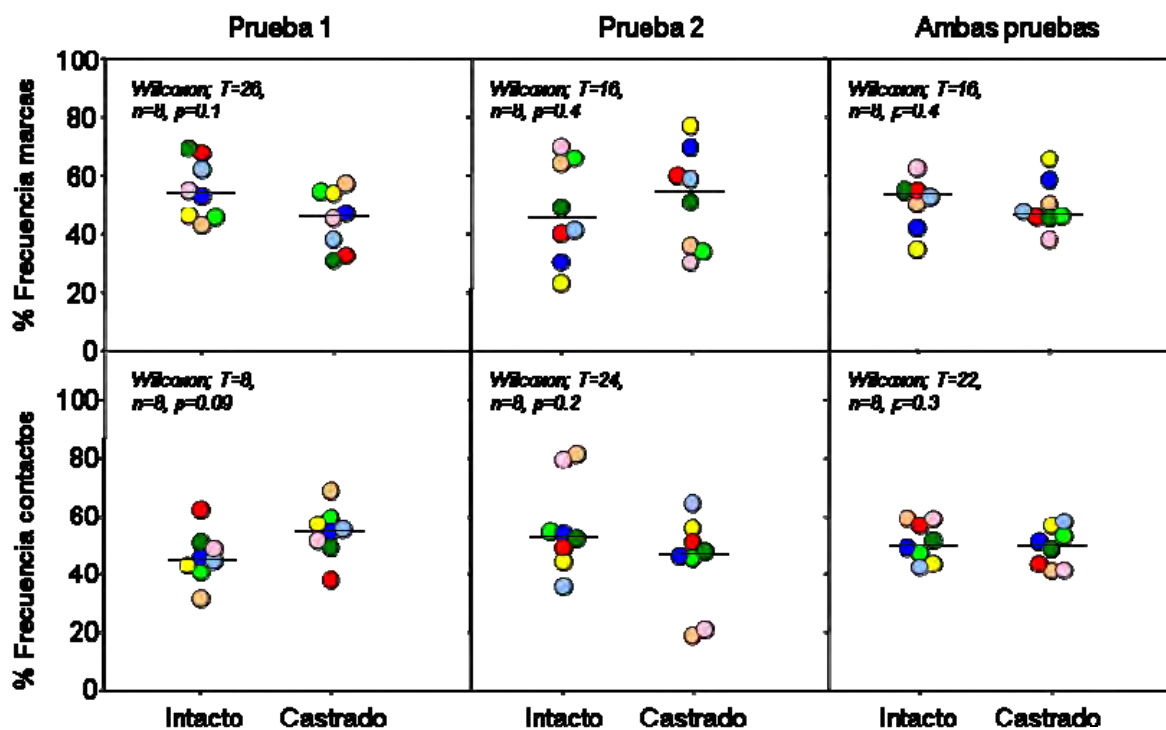


Fig. 4. Comparación de la frecuencia de marcas del mentón (panel superior) y contactos nariz – puerta (panel inferior) que realizaron las hembras en el lado del macho intacto y del castrado en la Prueba 1, Prueba 2 y Ambas pruebas. Cada prueba fue de 20 min. No hubo diferencias significativas entre el lado del macho intacto y el castrado en la frecuencia de marcaje por frotamiento del mentón y contactos nariz – puerta que realizaron las hembras en la Prueba 1, Prueba 2 y en ambas.

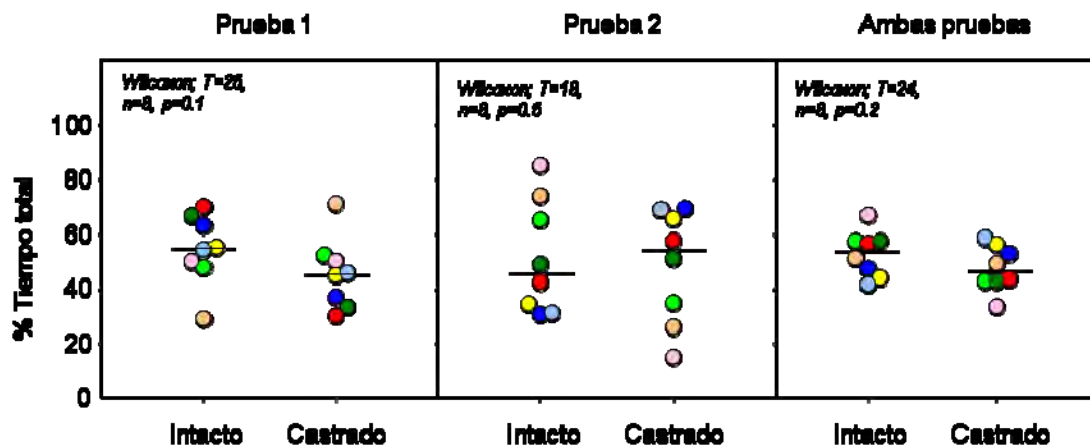


Fig. 5. Comparación del tiempo total que pasaron las hembras en el lado del macho intacto y el castrado en la Prueba 1, Prueba 2 y en Ambas pruebas. Cada prueba fue de 20 min. No hubo diferencias significativas en ninguna de las pruebas.

Comparación entre pruebas control y pruebas en presencia de machos estímulo. La frecuencia de marcaje por frotamiento del mentón que realizaron las hembras en las pruebas con machos estímulo fue significativamente mayor que en las pruebas con las jaulas accesorias vacías (*Wilcoxon*; $T=33$, $n=8$, $p=0.01$; Fig. 6 panel izquierdo). La frecuencia de contactos nariz – puerta que realizaron las hembras fue significativamente mayor en las pruebas con machos que en las pruebas con las jaulas accesorias vacías (*Wilcoxon*; $T=36$, $n=8$, $p=0.003$; Fig. 6 panel intermedio). Finalmente, las hembras fueron más activas en presencia de machos, realizaron entre 32 y 162 cambios a un lado y otro de la arena en 20 min, con un promedio de 82.6, DE 9.9. Se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de cambios que realizaron las hembras a un lado u otro de la arena entre las pruebas con machos y las pruebas con jaulas accesorias vacías (*Wilcoxon*; $T=36$, $n=8$, $p=0.003$; Fig. 6 panel derecho).

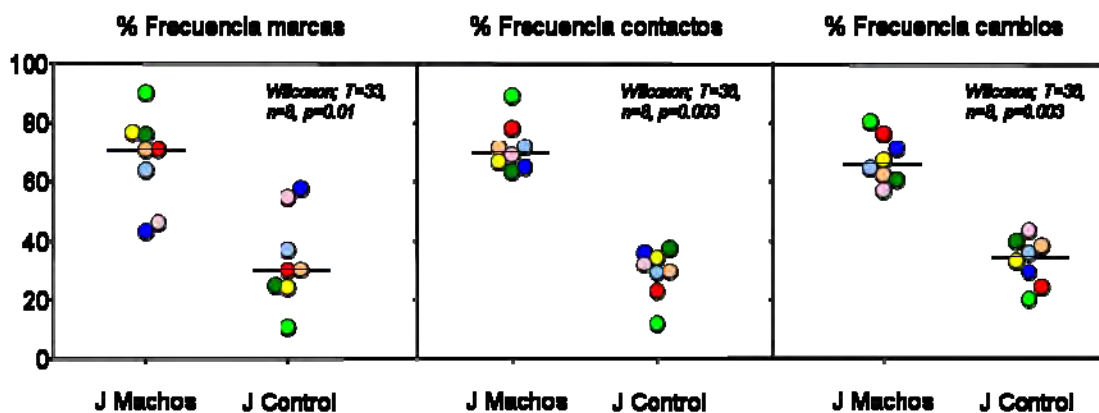


Fig. 6. Comparación de la frecuencia de marcas del mentón, contactos nariz – puerta y cambios a un lado y otro de la arena que realizaron las hembras en dos pruebas con machos estímulo (40 min) y dos pruebas control (jaulas accesorias vacías; 40 min). El análisis mostró diferencias significativas en todos los casos.

5. Discusión

La conducta que desplegaron tanto los machos estímulo (castrados e intactos) como las hembras de prueba dentro de la arena de doble elección sugiere que ésta fue bien aceptada por los animales. Tanto los machos intactos como los castrados estuvieron activos dentro de las jaulas accesorias, se desplazaron, se acercaron a la puerta y se acicalaron, solo los machos intactos realizaron marcaje por frotamiento del mentón, orinaron y defecaron, ello muestra que la castración fue efectiva y que el tiempo transcurrido entre la cirugía y el inicio de las pruebas fue suficiente (revisar Chirino *et al* 1993, González-Mariscal *et al* 1993, Martínez-Gómez *et al* 1997), los castrados hicieron cabriolas o se recostaron sobre el piso de la jaula accesoria. Las hembras de prueba se desplazaron por la arena, se dirigieron a las puertas de las jaulas accesorias, marcaron con el mentón, orinaron, defecaron, se acicalaron y se recostaron sobre el piso de la arena.

Además, los resultados sugieren que las hembras percibieron y respondieron a los machos estímulo, ya que en presencia de machos (intactos y castrados) las hembras aumentaron significativamente su frecuencia de marcaje por frotamiento del mentón y contactos nariz – puerta en comparación con la frecuencia de marcaje y contactos nariz – puerta que realizaron en las pruebas sin machos. Además, en presencia de machos fueron más activas ya que se desplazaron con alta frecuencia de un lado a otro de la arena. Sin embargo, otros resultados obtenidos en el presente trabajo no apoyan la hipótesis que se planteó.

La hipótesis que planteamos fue que en pruebas de elección entre machos (intacto *versus* castrado) las hembras “preferirán” al macho intacto. Sin embargo, los resultados sugieren que las hembras no “preferieron” al macho intacto, ya que éstas no marcaron más con el mentón ni realizaron más contactos nariz – puerta en el lado del macho intacto, finalmente, no pasaron más tiempo con el macho intacto. Una de las posibles causas de por qué las hembras no “preferieron” al macho intacto puede ser que no hubo interacción directa con él. Posiblemente las señales visuales, auditivas y volátiles no sean suficientes para que la hembra obtenga la información completa que determine su “preferencia” por un macho particular y sea necesaria la estimulación táctil de la hembra con el macho que sirva como retroalimentación para la hembra.

Otra causa por la que las hembras no “preferieron” al macho intacto es que las hembras no tuvieron la posibilidad de inspeccionar directamente la orina de los machos intactos, ya que aunque éstos orinaron, estuvieron dentro de la jaula accesoria donde las hembras no podían entrar. Como se ha mencionado en la introducción, en la mayoría de especies de mamíferos los olores sociales les permiten a los individuos reconocer a los coespecíficos del sexo opuesto y valorar a diferentes individuos para elegir la pareja más adecuada. Aunque no se han realizado estudios al respecto en los conejos, en los ratones la detección de dichos olores requiere de la interacción de los sistemas olfativos principal y vomeronasal. Se ha reportado que las preferencias de las hembras por los olores en el aire provenientes de la orina de los machos (detectados a través del sistema olfativo principal) son aprendidas por asociación con los olores detectados con el sistema vomeronasal

durante el contacto con la fuente odorífera. Las hembras solo son atraídas a los volátiles urinarios de los machos con cuya orina han tenido contacto previo. La información que induce la atracción al olor del macho está contenida en los componentes no volátiles detectados por el sistema vomeronasal, que además permite a las hembras valorar la identidad genética (Ramm *et al* 2008, Hurst 2009, Keller *et al* 2009, Martínez-García *et al* 2009).

Otro estudio con ratones mostró que la experiencia influye la respuesta conductual de las hembras a las feromonas sexuales. Algunas sustancias no volátiles de los machos ejercen en las hembras una atracción innata, aunque los volátiles del material de cama de los machos no atraen a las hembras inexpertas. Por otro lado, los volátiles de los machos llegan a ser atractivos a las hembras por la exposición repetida al material de cama de los machos (Moncho-Bogani *et al* 2002). En el presente estudio las hembras no tuvieron experiencia previa con los olores del macho intacto.

La variación individual es otro factor que pudo influir la respuesta de las hembras explicando por qué no mostraron preferencia por el macho intacto. En los modelos animales utilizados en el laboratorio la variación individual es menor en comparación con las poblaciones silvestres, ya que generalmente una cepa de individuos proviene de los mismos reproductores. En los ratones silvestres, la variación individual en un conjunto de proteínas especializadas en comunicación odorífera (proteínas urinarias principales MUP por sus siglas en inglés “*major urinary proteins*”) provee a cada individuo de una identidad genética particular que subyace el reconocimiento individual y de parentesco, también dichas proteínas permiten valorar la heterocigocidad de los individuos. Se ha examinado si la variación de estas proteínas se mantiene en las cepas clásicas de ratones de laboratorio provenientes de tres linajes. Se observó falta de variación en las MUP, Cheetham y sus colaboradores (2009) sugieren que la falta de variación en los patrones de estas proteínas dentro de una misma cepa y entre cepas tiene implicaciones importantes para el uso de ratones de laboratorio en estudios que investigan la identidad social o la elección de pareja. Posiblemente en los conejos de laboratorio exista una falta de variación de moléculas odoríferas excretadas con las secreciones.

La hipótesis de la “heterocigocidad como buenos genes” (*good-genes-as-heterozygosity*) propuesta por Brown (1997), predice que las hembras deberían preferir aparearse con machos más heterocigotos, que se complementen genéticamente con ellas para obtener mayor heterocigocidad, y por lo tanto menor endogamia, en su progenie. Existen algunas evidencias que apoyan dicha hipótesis, las hembras del ratón (*Mus musculus musculus*) prefieren los olores de machos más heterocigotos en comparación con machos endogámicos y dichas preferencias fueron más pronunciadas en las hembras endogámicas, es decir que la propia heterocigocidad de las hembras influye en sus preferencias de pareja. Sin embargo, falta realizar más estudios en los que se manipule la heterocigocidad de los machos para evaluar cómo ello afecta su atractivo sexual a las hembras (Ilmonen *et al* 2009).

Por otro lado, en las hembras del conejo doméstico se ha propuesto que el marcaje por frotamiento del mentón, es una forma de señalización de estro (Soares & Diamond 1982, Hudson

et al 1990, González-Mariscal *et al* 1990), por ello se esperaba que las hembras marcaran más con el mentón en el lugar del macho intacto en comparación con el castrado, presumiblemente para anunciarle su estado reproductivo. Sin embargo, los resultados no mostraron diferencias significativas y por tal motivo se sugirió que las hembras no prefirieron al macho intacto. Posiblemente dicho marcaje odorífero tiene otras funciones como la defensa de territorio, ello puede explicar por qué las hembras aumentaron su frecuencia de marcaje en presencia de machos (intactos o castrados). Existen diversas hipótesis que explican las funciones del marcaje odorífero: delimitación territorial, propiedad de recursos, atracción de parejas, pelea no combativa y advertencia. Una de las funciones del marcaje odorífero en las hembras puede ser la defensa de recursos o territorio. Un estudio realizado con hembras de mamífero, particularmente lémur de cola anillada, sugiere que la defensa de recursos puede ser una posible función del marcaje odorífero en las hembras de esta especie, ya que éstas no limitaron su marcaje solo a la estación reproductiva. Además, colocaron significativamente más marcas en un área de confrontación con otras tropas, también incrementaron su tasa de marcaje durante confrontaciones agonísticas entre tropas (Mertl-Millhollen 2006).

Finalmente, las hembras pudieron percibir a los machos (intacto y castrado) como intrusos en la arena en la que ellas estaban ya habituadas. Un trabajo investigó la reacción de las hembras del conejo doméstico hacia los coespecíficos extraños de ambos sexos. Dicho estudio consideró las categorías conductuales de agresión e investigación social descritas por Mykytowycz & Dudzinsky (1972) y Mykytowycz & Hesterman (1975), las categorías eran: **1) Agresión:** amenaza (orientación abrupta de la cabeza hacia el coespecífico con los ojos semicerrados y boca entreabierta), ataque (correr abruptamente hacia el coespecífico y despliegue de las otras conductas agresivas), persecución, mordida y pelea (lucha recíproca con mordidas y patadas con las extremidades anteriores). **2) Inspección social:** atención (orientación de la cabeza y orejas hacia el coespecífico), aproximación (moverse hacia el coespecífico), contacto nariz – nariz, inspección (olfateo del cuerpo del coespecífico) y olfateo anogenital. Los resultados mostraron que la respuesta de las hembras fue diferente dependiendo de su rango. Sólo las hembras dominantes fueron agresivas hacia los machos intrusos en su encierro. Incluso fueron más agresivas hacia los machos que hacia las hembras intrusas. Las hembras dominantes inspeccionaron más a los intrusos de ambos sexos que las hembras de rangos menores, además inspeccionaron más al macho que a la hembra intrusa. En el presente trabajo no se conocía el rango potencial de las hembras, sin embargo dos hembras, tal vez dominantes, fueron agresivas hacia ambos machos (intacto y castrado). En el presente estudio no se midieron las categorías conductuales de agresión, sin embargo, algunas de éstas (amenazas, ataques, mordidas y patadas con las extremidades anteriores) coincidieron con las consideradas en el estudio de Farabollini y sus colaboradores (1991).

Una conclusión del presente trabajo es que se necesita diseñar cuidadosamente diversos estudios que exploren con profundidad cada una de las causas discutidas arriba de por qué los

resultados obtenidos no apoyaron la hipótesis planteada, de tal manera que sea posible describir mejor cómo ocurre la elección femenina de pareja en los conejos domésticos.

6. Referencias

- Bell DJ (1980) Social olfaction in lagomorphs. *Symp Zool Soc Lond* 45: 141-164.
- Bell DJ (1983) Mate choice in the European rabbit. En Bateson PPG (Ed) *Mate choice*. Cambridge University Press, Cambridge. Pp 211-223.
- Brown JL (1997) A theory of mate choice based on heterozygosity. *Behav Ecol* 8:60-65.
- Cheetham SA, Smith AL, Armstrong SD, Beynon RJ, Hurst JL (2009) Limited variation in the major urinary proteins of laboratory mice. *Physiol Behav* 96:253-261.
- Chirino R, González-Mariscal G, Carrillo P, Pacheco P, Hudson R (1993) Effect of removing the chin gland on chin marking behavior in male rabbits of the New Zealand race. *Z Säugetierkunde (actualmente Mamm Biol)* 58:116-121.
- Clark MM, Stiver K, Teall T, Galef BG Jr (2006) Nursing one litter of Mongolian gerbils while pregnant with another: effects on daughters' mate attachment and fecundity. *Anim Behav* 71:235-241.
- Crews D, Gore AC, Hsu TS, Dangleben NL, Spinetta M, Schallert T, Anway MD, Skinner MK (2007) Transgenerational epigenetic imprints on mate preference. *PNAS* 104:5942-5946.
- Evsikov VI, Nazarova GG, Potapov MA (1994) Female odor choice, male social rank, and sex ratio in the water vole. *Adv Biosci* 93:303-307.
- Farabollini F, Albonetti ME, Dessi-Fulgheri F (1991) Response to intruders in female rabbit colonies is related to sex of intruder and rank of residents. *Behav Proc* 24:111-122.
- Ferkin MH, Sorokin ES, Renfroe MW, Johnston RE (1994) Attractiveness of male odors to females varies directly with plasma testosterone concentration in meadow voles. *Physiol Behav* 55:347-353.
- Fisher DO, Cockburn A (2006) The large-male advantage in brown antechinuses: female choice, male dominance, and delayed male death. *Behav Ecol* 17:164-171.
- González-Mariscal G, Melo AI, Zavala A, Beyer C (1990) Variations in chin-marking behavior of New Zealand female rabbits throughout the whole reproductive cycle. *Physiol Behav* 48:361-365.
- González-Mariscal G, Melo AI, Zavala A, Chirino R, Beyer C (1993) Sex steroid regulation of chin marking behavior in male New Zealand rabbits. *Physiol Behav* 54:1035-1040.
- Hudson R y Distel H (1990) Sensitivity of female rabbits to changes in photoperiod as measured by pheromone emission. *J Comp Physiol A* 167: 225-230.
- Hudson R, González-Mariscal G, Beyer C (1990) Chin-marking behavior, sexual receptivity and pheromone emission in steroid-treated, ovariectomized rabbits. *Horm Behav* 24:1-13.
- Hurst JL (2009) Female recognition and assessment of males through scent. *Behav Brain Res* 200:295-303.
- Ilmonen P, Stundner G, Thoß M, Penn DJ (2009) Females prefer the scent of outbred males: good-genes-as-heterozygosity? *BioMed Central Evol Biol* 9:104-113.

- Kavaliers M, Colwell DD (1995) Discrimination by female mice between the odours of parasitized and non-parasitized males. *Proc R Soc L* 261:31-35.
- Keller M, Baum MJ, Brock O, Brennan PA, Bakker J (2009) The main and the accessory olfactory systems interact in the control of mate recognition and sexual behavior. *Behav Brain Res* 200:268-276.
- Maras PM, Petruelis A (2008) Olfactory experience and the development of odor preference and vaginal marking in female Syrian hamsters. *Physiol Behav* 94:545-551.
- Martínez-García F, Martínez-Ricós J, Agustín-Pavón C, Martínez-Hernández J, Novejarque A, Lanuza E (2009) Refining the dual olfactory hypothesis: Pheromone reward and odour experience. *Behav Brain Res* 200:277-286.
- Martínez-Gómez M, Guarneros M, Zempoalteca R, Hudson R (1997) A comparison of spontaneous and odour-induced chin marking in male and female domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Ethology* 103:893-901.
- Mertl-Millhollen AS (2006) Scent marking as resource by female *Lemur catta*. *Am J Primatol* 68:605-621.
- Moncho-Bogani J, Lanuza E, Hernández A, Novejarque A, Martínez-García F (2002) Attractive properties of sexual pheromones in mice: innate or learned? *Physiol Behav* 77:167-176.
- Mykytowycz R, Dudzinski ML (1972) Aggressive and protective behaviour of adult rabbits *Oryctolagus cuniculus* (L.) toward juveniles. *Behaviour* 43:97-120.
- Mykytowycz R, Hesterman ER (1975) An experimental study of aggression in captive European rabbits, *Oryctolagus cuniculus* (L.). *Behaviour* 52:104-123.
- Penn D, Potts WK (1998) Chemical signals and parasite-mediated sexual selection. *Trends Ecol Evol* 13:391-396.
- Ramm SA, Cheetham SA, Hurst JL (2008) Encoding choosiness: female attraction requires prior physical contact with individual male scents in mice. *Proc Biol Sci* 275:1727-1735.
- Reece-Engel C (1988) Female choice of resident male rabbits *Oryctolagus cuniculus*. *Anim Behav* 36:1241-1242.
- Soares MJ, Diamond M (1982) Pregnancy and chin marking in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Anim Behav* 30:941-943.
- Taylor GT, Haller J, Regan D (1982) Female rats prefer an area vacated by a high testosterone male. *Physiol Behav* 28:953-958.
- Villafuerte R, Kufner MB, Delibes M, Moreno S (1993) Environmental factors influencing the seasonal daily activity of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in a Mediterranean area. *Mammalia* 57:341-347.
- Wallage-Drees JM (1989) A field study on seasonal changes in the circadian activity of rabbits. *Z Säugetierk (actualmente Mamm Biol)* 54:22-30.
- White P, Fischer RB, Meunier GF (1986) Female discrimination of male dominance by urine odor cues in hamsters. *Physiol Behav* 37:273-277.
- Yamazaki K, Beauchamp GK, Shen FW, Bard J, Boyse EA (1994) Discrimination of odortypes determined by the major histocompatibility complex among outbred mice. *Proc Natl Acad Sci* 91:3735-3738.

Zala SM, Potts WK, Penn DJ (2004) Scent-marking displays provide honest signals of health and infection. *Behav Ecol* 15:338-344.

V COMENTARIO FINAL

El hecho de no obtener resultados concluyentes que apoyen o refuten el papel del marcaje del mentón de los machos del conejo doméstico en la elección femenina de pareja en los estudios reportados en la presente tesis ilustra bien tres de las principales dificultades en el estudio de la comunicación química en los mamíferos.

La primera es el problema de la definición del estímulo y su control. En contraste con las señales visuales o acústicas bien estudiadas en las aves, por ejemplo, es extremadamente difícil identificar, definir o cuantificar con precisión las señales químicas. A menudo, como es el caso de los compuestos contenidos en las secreciones de las glándulas submandibulares del conejo, no son percibidas por el olfato humano y los métodos para identificar los compuestos activos utilizando técnicas químicas analíticas aún son extremadamente costosas y requieren de considerable inversión de tiempo. En consecuencia, dicha situación dificulta la manipulación experimental de la calidad o cantidad de los componentes biológicamente relevantes, es decir, de la señal presentada a los animales receptores.

La segunda dificultad es conocer a qué individuos o categorías de individuos está destinada la señal. Así, en el presente estudio no se obtuvieron respuestas claras de las hembras a la secreción de las glándulas submandibulares de los machos de acuerdo a la hipótesis propuesta de elección femenina de pareja, ello pudo deberse no solo a dificultades metodológicas, sino debido a que el marcaje del mentón tiene otras funciones además de las aquí investigadas; por ejemplo, en la comunicación macho – macho asociada con el establecimiento y mantenimiento de territorios y/o con jerarquías de dominancia dentro del grupo de machos; y en la comunicación hembra – hembra asociada con jerarquías de dominancia dentro del grupo de hembras y competencia por recursos limitados tales como sitios adecuados para construir madrigueras de crianza.

La tercera dificultad es que en los mamíferos, muchos de los cuales viven en grupos sociales, usualmente la emisión de señales químicas y la respuesta a éstas ocurren en contextos complejos y bajo la influencia del aprendizaje social. Ello es generalmente cierto aún para las llamadas señales feromonales que se sabe provocan respuestas conductuales y fisiológicas estereotipadas. En el presente estudio, así como en la mayoría de la investigación realizada en el laboratorio, los animales se mantuvieron en jaulas individuales en aislamiento social y por lo tanto con poca oportunidad para asociar señales particulares o tipos de señales con individuos o categorías de individuos particulares.

Sin embargo, dada la importancia de la comunicación química en la regulación de la vida social de los mamíferos y la forma usualmente invisible (para el observador humano) en que ocurre este tipo de comunicación, sin saberlo se puede afectar el resultado e interpretación de un amplio rango de tópicos de investigación, se necesita un continuo esfuerzo para entender mejor la naturaleza y función de la señalización química de los mamíferos. La discusión que acompaña a cada estudio en los capítulos precedentes proporciona sugerencias de cómo este esfuerzo puede



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

continuar constructivamente en el conejo europeo, aún una especie modelo de estudio en este campo.

ANEXO 1. COMUNICACIÓN QUÍMICA EN MAMÍFEROS DOMÉSTICOS

El trabajo de revisión que se presenta en este anexo es uno de los resultados obtenidos de las actividades complementarias realizadas durante los estudios de doctorado.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Comunicación química en mamíferos domésticos

Chemical communication in domestic mammals

María de Lourdes Arteaga Castañeda* Margarita Martínez-Gómez***
Rosalinda Guevara-Guzmán*** Robyn Hudson**

Abstract

This study briefly reviews what is currently known about chemical communication in domestic mammals and the relevance of such information for animal management and clinical practice. There is now a range of notable examples demonstrating the importance of chemical signals in regulating domestic animals' lives. Species known to use chemical signals with pheromone-like properties include pigs, goats, sheep, cattle, cats, dogs, rabbits, mice and hamsters. These signals are contained in secretions from skin glands, from the reproductive tract, and in urine and feces. They may be simply emitted into the environment from the site of production or storage, or actively deposited on particular substrates or on conspecifics, often by way of distinctive and stereotyped marking behaviors. They are then detected and processed via the main and/or accessory olfactory systems of conspecifics, after which, depending on the physiological state of the receiver, they elicit specific behavioral and/or physiological responses. In addition to giving examples illustrating these points, it is briefly mentioned the potential application of chemical signals to the management of livestock, pets and laboratory animals, as well as in clinical practice.

Key words: CHEMICAL COMMUNICATION, DOMESTIC MAMMALS, CHEMICAL SIGNALS, PHEROMONES, HORMONES, SKIN GLANDS, SCENT MARKING, OLFATORY SYSTEM, FLEHMEN.

Resumen

El presente trabajo revisa brevemente los temas concernientes a la comunicación química en los mamíferos domésticos y su posible aplicación en el manejo y práctica clínica. Existen diversos ejemplos y argumentos que no dejan duda sobre la importancia de las señales químicas en la regulación de la vida de muchas especies domésticas. Algunas de éstas documentan la existencia de señales químicas de carácter feromonal, entre otras: cerdos, cabras, borregos, vacas, toros, gatos, perros, conejos, ratones y hámsteres. Dichas señales están contenidas en las secreciones de glándulas cutáneas, del tracto reproductivo, la orina y las heces. Estas señales pueden simplemente emitirse en el ambiente desde su sitio de producción o almacenamiento, o ser depositadas activamente sobre sustratos particulares o coespecíficos, a menudo por medio de conductas de marcaje específicas y estereotipadas. Cuando las señales olfatorias se emiten o han sido depositadas en el ambiente por medio de conductas de marcaje, son percibidas mediante el sistema olfativo principal o el accesorio de otro individuo que dependiendo de su estado fisiológico, producen en él diversos efectos fisiológicos o conductuales. Además de ilustrar estos puntos, mencionamos brevemente la aplicación potencial de los conocimientos sobre señales químicas en el manejo de los mamíferos domésticos, en la producción pecuaria, animales de compañía, animales de laboratorio, así como en la práctica clínica.

Palabras clave: COMUNICACIÓN QUÍMICA, MAMÍFEROS DOMÉSTICOS, SEÑALES QUÍMICAS, FEROMONAS, HORMONAS, GLÁNDULAS CUTÁNEAS, MARCAJE OLFATORIO, SISTEMA OLFATIVO, FLEMEN.

Recibido el 29 de febrero de 2006 y aceptado el 22 de agosto de 2006.

*Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Km 1.5, carretera Tlaxcala-Puebla, 90070, Tlaxcala, Tlaxcala, México.

**Departamento de Fisiología y Biología Celular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

***Facultad de Medicina, Nuevo Edificio de Investigación, 1er piso, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

Correspondencia: María de Lourdes Arteaga Castañeda, Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Km 1.5, carretera Tlaxcala-Puebla, 90070, Tlaxcala, Tlaxcala, México, Apartado Postal 264, Telefax: 01 (246) 462 1557; correo electrónico: lourdesac@cci.uatx.mx

Introduction

In many mammals, olfactory signals play an important part in the regulation of social life. These signals are commonly emitted in urine, feces and saliva, as well as in secretions from a range of specialized skin glands,^{1,2} and are often deposited in the environment using distinctive, stereotyped behaviors.³ They are then perceived by conspecifics via the main and/or accessory (vomeronasal) systems (Figure 1), after which, depending on the physiological state of the receiver, they may elicit specific physiological and behavioral responses. These signals, their effects, the bodily secretions containing them, the manner of their emission or deposition in the environment, and the manner in which they are perceived by conspecifics constitute the study of chemical communication. A wide range of mammals has been employed in such studies, including a number of domestic species. The aim of the present report is to briefly review what is known about chemical communication in domestic animals and the possible application of this to their management including in clinical practice.

One of the pioneer and best-studied mammals regarding chemical communication, both in its wild and domestic form, is the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*).^{4,5} Therefore, this study takes this species as a starting point and uses it throughout to illustrate basic aspects of chemical communication in mammals.

The European rabbit is territorial and gregarious, it generally lives in small groups of 1-3 males and 1-5 females, and the regulation of its social life depends to a large extent on chemical communication^{4,6-11} as reflected by its various odiferous skin glands and

Introducción

En la mayoría de los mamíferos, las señales olfatorias influyen profundamente en las interacciones sociales. Estas señales son emitidas mediante la orina, heces, saliva y secretiones de diversas glándulas cutáneas^{1,2} y son depositadas frecuentemente en el ambiente por medio de despliegues conductuales que son muchas veces estereotipados.³ Las señales olfatorias que son depositadas o emitidas por un individuo son percibidas por otros de la misma especie por medio del sistema olfativo principal y el sistema accesorio o vomeronasal (Figura 1) y pueden provocar en los individuos que las perciben diversos efectos, tanto fisiológicos como conductuales. Tales señales olfatorias, sus efectos, las secretiones corporales que las contienen, su emisión o manera de depositarlas en el ambiente, así como su forma de percepción, son temas que competen a la comunicación química. Una amplia variedad de especies de mamíferos se han empleado en tales estudios, incluso animales domésticos. El objetivo del presente trabajo es revisar brevemente lo que se sabe acerca de este tema en los animales domésticos y su posible aplicación en su manejo y en la práctica clínica.

Una de las especies pioneras y más estudiadas en relación con la comunicación química en mamíferos es el conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*), tanto en su forma silvestre como doméstica.^{4,5} Por ello, en el presente trabajo se ha tomado en cuenta esta especie para ilustrar algunos puntos principales.

El conejo es una especie territorial y gregaria, generalmente vive en pequeños grupos de 1-3 machos y 1-5 hembras, gran parte de su vida social depende de la comunicación química.^{4,6-11} Los conejos son, por lo

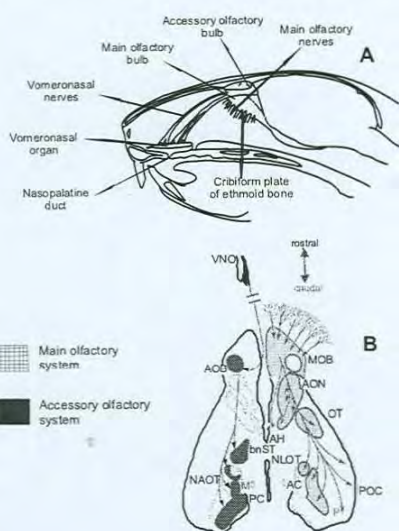


Figura 1: A) Esquema de corte sagital de la cabeza de un roedor que muestra el órgano vomeronasal y el canal nasopalatino. El nervio vomeronasal está constituido por los axones de las neuronas del epitelio del órgano vomeronasal, se dirige a la porción medial del bulbo olfativo y finalmente llega al bulbo olfativo accesorio (modificado de Meredith).⁷⁴ B) Esquema de un cerebro de rata que muestra la separación de las proyecciones de los sistemas olfativos principal y accesorio. OVN: órgano vomeronasal; BOA: bulbo olfativo accesorio; NET: núcleo de la estria terminalis; NTOA: núcleo del tracto olfativo accesorio; M: núcleo medial de la amígdala; CP: núcleo cortical posterior de la amígdala; BOP: bulbo olfativo principal; NOA: núcleo olfativo anterior; TO: tubérculo olfativo; COP: corteza olfativa primaria; P: región periamigdalóide; CA: núcleo cortical anterior de la amígdala; NLOT: núcleo del tracto olfativo lateral; HA: hipocampo anterior (modificado de Wysocki).⁷¹

Figure 1: A) Schematic representation of a sagittal section through the head of a rodent showing the vomeronasal organ and the nasopalatine duct. The vomeronasal nerve is composed of the axons of the sensory neurons located in the epithelium of the vomeronasal organ and travels via the medial olfactory bulb to terminate in the accessory olfactory bulb (modified from Meredith).⁷⁴ B) Schematic representation of a rat brain showing the anatomically separate pathways of the main (hatched shading) and accessory (dark shading) olfactory systems. VNO: vomeronasal organ, AOB: accessory olfactory bulb, bnST: bed nucleus of the stria terminalis, NAOT: nucleus of the accessory olfactory tract, M: medial nucleus of the amygdala, PC: posterior cortical nucleus of the amygdala, MOB: main olfactory bulb, AON: anterior olfactory nucleus, OT: olfactory tubercle, POC: primary olfactory cortex, P: periamygdaloid region, AC: anterior cortical nucleus of the amygdala, NLOT: nucleus of the lateral olfactory tract, AH: anterior hippocampus (modified from Wysocki).⁷¹

other sources of chemical signals (Figure 2). The rabbit; therefore, provides a good starting point for considering the importance of chemical communication in domestic mammals. Each group of rabbits has a territory within which forms a linear dominance hierarchy by means of aggressive interactions.¹² Rabbits mark their territory with urine and hard feces (as opposed to the soft fecal pellets which they ingest directly from the anus) coated with secretion from their anal glands. The hard feces are often deposited at so-called latrines, which are thought to serve as social communication centers.¹⁰ Surfaces not marked by urine and feces such as burrow entrances, plants, roots and the fecal pellets of other rabbits are often marked with secretion from the chin glands using a distinctive behavior known as chinning (Figure 3).⁹

tanto, buen punto de partida para explicar la importancia de la comunicación química en los mamíferos domésticos, ya que éstos poseen diversas fuentes de olor (Figura 2). Cada grupo de conejos posee un territorio y una jerarquía de dominancia social lineal que se establece por medio de interacciones agresivas entre sus miembros.¹² Los conejos realizan marcaje olfatorio en su territorio con orina y heces de consistencia dura (a diferencia de las heces suaves que también producen los conejos, pero que ingieren directamente del ano) cubiertas con las secreciones de las glándulas anales. Las heces duras son depositadas sobre superficies planas llamadas letrinas, que sirven como centros de comunicación entre los individuos.¹⁰ Las superficies que no son marcadas con orina y heces, como las entradas de las madrigueras, plantas, raíces y heces de otros conejos, son marcadas con la secreción de las glándulas submandibulares mediante la conducta de marcaje por frotamiento del mentón (Figura 3).⁹

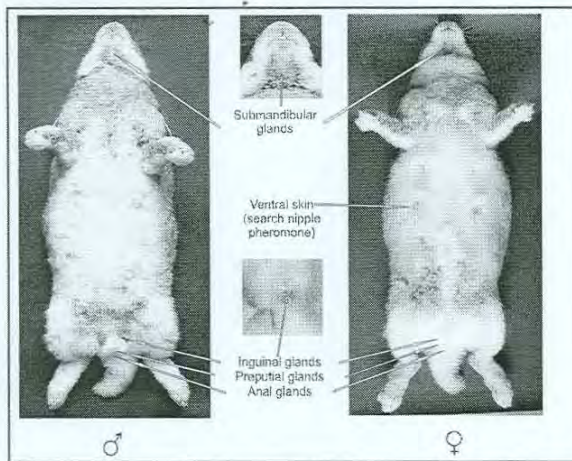


Figura 2: Algunas fuentes de señales químicas en el conejo europeo.

Figure 2: Some sources of chemical signals in the European rabbit.

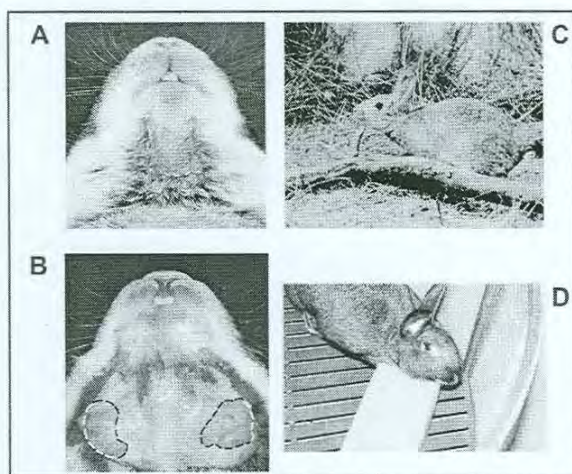


Figura 3: Vista ventral de la cabeza de un conejo europeo macho adulto que muestra: A) glándulas submandibulares con la secreción en forma característica de "V", B) glándulas submandibulares expuestas, C) despliegue de la conducta de marcaje por frotamiento del mentón en un conejo silvestre y D) despliegue de la misma conducta por un conejo doméstico en condiciones de laboratorio.

Figure 3: Ventral view of the head of an adult male rabbit showing: A) secretion from the submandibular glands in the characteristic form of a "V", B) the submandibular glands exposed (and displaced somewhat laterally) to show their considerable size, C) chin-marking behavior in a wild rabbit, and D) the same behavior in a domestic rabbit in the laboratory.

The pheromone concept and some examples in domestic mammals

Specific chemical signals called pheromones were originally defined by Karlson and Lüscher¹³ as substances emitted into the environment by an individual and perceived by another of the same species in which they produce a specific physiological or behavioral response.¹⁴ The pheromone concept originated from studies in insects, but in mammals the applicability of the term, in a strict sense, is still debated due to the complexity of the information often received simultaneously by the responding animal via other sensory modalities and to the importance of learning in shaping mammalian behavior,¹⁵⁻¹⁸ and complicates the understanding of the responses to the chemical signals. For example, in the case of the pig (*Sus scrofa*), while pheromonal signals contained in the saliva of the male are important for courtship and mating, application of pressure to the back of the female is also needed to obtain an appropriate response, and the response is strongest in the actual presence of a male.¹⁹ In addition to the pheromonal cues contained in saliva, males also produce a sexual attractant in prepuccial fluids.³

Despite continued discussion concerning the appropriate application of the term pheromone to mammals, the examples given in this review leave no doubt as to the importance of chemical signals in regulating the lives of many domestic species. As indicated above, the best documented example for the existence of pheromone-like signals in domestic mammals is the pig.³ The saliva of sexually mature boars contains two sexual attractants that are produced in the testes and transported in the blood to the submaxillary salivary glands where they combine with the protein pheromaxein (Figure 4).²⁰ During precopulatory courtship the boar produces copious quantities of salivary foam, which drips from the mouth and contains two sexual attractants, the androgen steroids 5 α -androst-16-en-3-ona and 5 α -androst-16-en-3 α -ol. The concentration of androst-16-en-3 α -ol in the saliva is 10 to 20 times higher than androst-16-en-3-ona, and has been suggested also to function in stimulating puberty in juvenile females.²¹

These pheromones, which are attractive for estrous females, may signal that a male is sexually mature as they elicit behaviors indicating sexual receptivity in sows.³ They are generally thought to induce female sexual behavior via sensory neurons in the epithelium of the main olfactory system (Figure 1B).²² However, results of a study by Krzymowski *et al.*²⁵ suggest that a humoral pathway also exists, whereby androst-16-en-3 α -ol is absorbed by the respiratory epithelium of the nasal

El concepto de feromona y algunos ejemplos en mamíferos domésticos

Existen señales olfatorias específicas llamadas feromonas, descritas por Karlson y Lüscher¹³ como sustancias secretadas en el ambiente por un individuo y percibidas por otro de la misma especie, en el que se produce una respuesta fisiológica o conductual específica.¹⁴ El concepto de feromona se ha derivado de diversos estudios realizados en insectos, aunque en los mamíferos la aplicación de dicho concepto, en sentido estricto, es actualmente debatido, debido a la complejidad de información recibida simultáneamente por medio de otras modalidades sensoriales y la importancia del aprendizaje, que influye en gran parte de su conducta,¹⁵⁻¹⁸ y complica el entendimiento de las respuestas a las señales químicas. Por ejemplo, para el caso de los cerdos (*Sus scrofa*), son necesarias las señales químicas contenidas en la saliva del macho, para el cortejo y la cópula, pero la aplicación de presión sobre la espalda de la hembra también es necesaria para obtener una respuesta de ella a los estímulos químicos, dicha respuesta es aún más fuerte cuando está presente el macho.¹⁹ Además de las señales feromonales contenidas en la saliva, el macho produce un atrayente sexual contenido en las secreciones prepucciales.³

A pesar de la discusión sobre la aplicación apropiada del concepto feromona a los mamíferos, los ejemplos y argumentos de este trabajo no dejan duda sobre la importancia de las señales químicas en la regulación de la vida de muchas especies domésticas. El mejor ejemplo documentado sobre señales químicas similares a feromonas en animales domésticos es el cerdo.³ La saliva de los cerdos machos sexualmente maduros contiene dos atrayentes sexuales, que son producidos en los testículos y transportados por el torrente sanguíneo a las glándulas salivales submaxilares, donde se unen a una proteína específica llamada feromaxeína (Figura 4).²⁰ Durante la interacción precopulatoria con la hembra, el macho produce cantidades copiosas de saliva espumosa que gotea de la boca y que contiene atrayentes sexuales, son los esteroides androgénicos 5 α -androst-16-en-3-ona y 5 α -androst-16-en-3 α -ol. La concentración de androst-16-en-3 α -ol en la saliva es de 10 a 20 veces más alta que la androst-16-en-3-ona. Se ha sugerido que el androst-16-en-3 α -ol puede participar también en la estimulación de la pubertad en las hembras juveniles.²¹

Estas feromonas, que son atractivas para las hembras en estro, parecen indicarles que el macho es sexualmente maduro, por lo que incrementa la conducta de receptividad sexual de las hembras.³ La forma en que el androst-16-en-3 α -ol induce la conducta

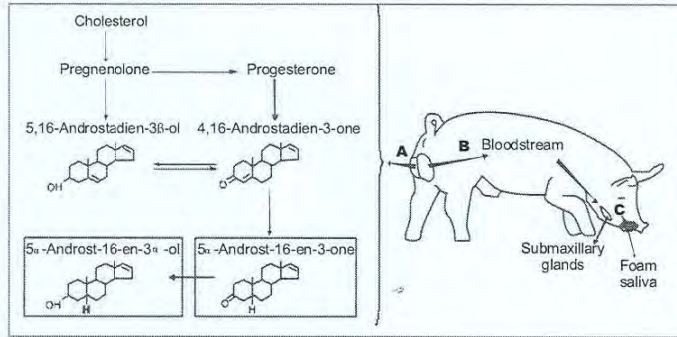


Figura 4: Esquema de producción de las feromonas en la saliva de cerdo macho. A) Ruta biosintética de esteroides androgénicos en los testículos (modificado de Albone y Shirley).¹⁴ B) 5α -Androst-16-en-3-ol y 5α -Androst-16-en-3-ona (encerrados en cuadros) a través de la circulación sanguínea llegan a las glándulas salivales submaxilares y se unen a la proteína feromaxeína. C) El macho produce saliva espumosa que sale de su boca y contiene dichos atraerentes sexuales.

Figure 4: Schematic representation of the production of the pheromones contained in the saliva of the male pig. A) Biosynthetic pathway of androgens in the testes (modified from Albone and Shirley).¹⁴ B) 5α -Androst-16-en-3-ol and 5α -Androst-16-en-3-ona (enclosed in boxes) are transported via the bloodstream to the submaxillary salivary glands where they combine with the protein pheromaxein. C) The male produces salivary foam, which drips from his mouth and contains the sexual attractants.

cavity, which is richly supplied with capillaries, and transported in the blood via the carotid artery to the hypophysis, ventromedial hypothalamus, mammillary bodies and prehypophysial vascular complex, where it accumulates selectively. There is also evidence that androst-enol may accumulate in the olfactory bulbs, amygdala and septum.²⁴ Furthermore, intramuscular injection of androst-enol modifies ovarian function during sexual maturation, stimulating development of the secretory function of the ovarian follicles.²¹

Another well known pheromone-like signal is the amino acid felinine (2-amino-7-hidroxi-5,5-dimetil-4-ácido tioheptanoico) contained in the urine of the domestic cat (*Felis silvestris catus*) and other members of the family Felidae, the degraded constituents of which are responsible for the characteristic odor of this species.²⁵ Although the biological significance of felinine needs further study, it appears to be involved in territorial marking²⁵⁻²⁸ and is thought to be the precursor of a pheromone attracting females.²⁷ Consistent with this, Tarttelin *et al.*²⁹ report the presence of large amounts of felinine in the urine of males after they reach puberty at about six months of age.

Yet another example of a pheromone-like signal in mammals is provided by sheep (*Ovis aries*) and goats (*Capra hircus*). In both species simply exposing anestrus females to the odor of a sexually active male triggers the secretion of lutenizing hormone (LH), estrus, and synchronous ovulation, a phenomenon know as the "male effect".³⁰⁻³² One of the substances responsible for the characteristic odor of sexually mature male goats is 4-etil ácido octanoico (4EOA), although in itself it does not have a pheromonal action (males effect), that is, 4EOA does not stimulate the secretion of LH necessary to initiate the preovulatory neuroendocrine events accompanying estrus. However, results of studies by Iwata *et al.*,³³ suggest that other, active substances derive from it, since a synthetic solution of 4EOA stored at room temperature for several months

sexual en las hembras es por estimulación de las neuronas sensoriales del epitelio del sistema olfativo principal (Figura 1B).²² Sin embargo, los resultados de un estudio realizado por Krzymowski *et al.*²³ sugieren que también existe una vía humoral para que el androst-enol se transporte de la cavidad nasal a la hipófisis y a otras estructuras cerebrales. El androst-enol se introduce por la parte respiratoria de la mucosa nasal, donde es absorbido dentro del torrente sanguíneo vía el rico suplemento de capilares en la mucosa y es transportado al seno cavernoso, y por la sangre arterial de las carótidas llega a la hipófisis, hipotálamo ventromedial, cuerpos mamilares y complejo vascular perihipofisiario, lugares donde se acumula selectivamente. Existen evidencias de que el androst-enol puede acumularse en el bulbo olfativo, amígdala y septum.²⁴ Además, las inyecciones intramusculares de androst-enol modifican la función ovárica durante la maduración sexual de las hembras, estimulando el desarrollo y función secretora de los folículos ováricos.²¹

Otro ejemplo de una señal química "feromonal" bien conocida es el aminoácido felinina (2-amino-7-hidroxi-5,5-dimetil-4-ácido tioheptanoico) en la orina de los gatos domésticos (*Felis silvestris catus*) y otros miembros de la familia Felidae, y parece ser que los compuestos resultantes de su degradación son responsables del olor característico de la orina en esta especie.²⁵ Aunque su significado biológico necesita ser mejor documentado, parece estar implicado en el marcaje territorial;²⁵⁻²⁸ se piensa que es el precursor de una feromona que atrae a las hembras.²⁷ Consistente con esto, Tarttelin *et al.*²⁹ notifican que la felinina se encuentra en grandes cantidades en la orina de los machos a partir de los seis meses de edad, cuando entran a la pubertad.

Un ejemplo más sobre señales químicas similares a feromonas en mamíferos se encuentra en cabras (*Capra hircus*) y borregos (*Ovis aries*). La exposi-

became pheromonally active and elicited changes in electrophysiological activity in the hypothalamus of females.

The role of pheromones in the reproduction of cattle (*Bos indicus* and *Bos taurus*) is not as clear, possibly due to the confounding effect of factors such as breed, nutritional condition, photoperiod and ambient temperature. Whereas the results of some studies suggest that the presence of a bull or his odors has no effect on the reproductive physiology of cows, other studies report the opposite; for example, in one study 67% of heifers exposed to the urine of a sexually active bull showed advanced initiation of puberty, supporting the hypothesis that the urine of bulls contains pheromones accelerating puberty.^{32,34} Thus, in cattle also, the presence of a male or his odors may have effects on the reproductive physiology of females similar to those in sheep, goats and pigs.³²

A final example of a chemical signal with pheromone-like properties is provided by the rabbit, in which location of the nipples by the young depends totally on a chemical signal emitted by the mother.³⁵⁻³⁹ This signal, the so-called nipple-search pheromone, stimulates the pups to perform a rapid and stereotyped nipple-search behavior, which is vital given that the mother only nurses for about three minutes once every 24 hours.^{36,37,39} One of the active substances identified in rabbit milk as having pheromonal properties, that is, to which the young respond with the typical nipple-search behavior, is 2-metilbut-2-enal (2MB2).^{40,41}

Effect of olfactory signals: changes in behavior and physiology

As indicated above, olfactory signals such as pheromones can affect the physiology and behavior of the receiver in various ways. According to Brown¹⁶ these effects can be classified in two groups: 1) odors serving individual identification and which are usually stable over long periods, for example, odors indicating sex, age or social group; and 2) odors affecting the momentary emotional state of the receiver and liberated under special circumstances such as by females in estrus, animals under stress, or following a change in social rank. The chemical composition of odor signals contained in urine, feces or in the secretions of skin glands may be affected by the sender's metabolic state, hormone levels, the action of microorganisms, or the sender's genetic identity.^{3,42}

In rodents such as the house mouse (*Mus musculus*, the best-studied laboratory mammal with respect to the physiological effects of social odors), the influence of various pheromones on female reproductive physiology have been well documented and variously

ción, sin contacto directo, de las hembras en anestro al olor de machos sexualmente activos desencadena la secreción de hormona luteinizante (LH), el estro y la sincronización de la ovulación, dicho fenómeno se denomina "efecto macho".³⁰⁻³² Uno de los compuestos principales responsables del olor característico de los machos maduros de las cabras es el 4-etil ácido octanoico (4EOA), que por sí mismo no posee actividad feromonal (efecto macho), es decir, que 4EOA no estimula la secreción de LH necesaria para iniciar los eventos neuroendocrinos preovulatorios que acompañan al estro. Sin embargo, los resultados de los estudios de Iwata *et al.*,³³ sugieren que a partir de tal compuesto pueden derivarse otros que poseen dicha actividad, ya que una solución sintética de 4EOA que había estado almacenada a temperatura ambiente por varios meses, adquirió actividad feromonal y produjo cambios en la actividad electrofisiológica en el hipotálamo de las hembras.

El papel de las feromonas en la reproducción de los bovinos (*Bos indicus* y *Bos taurus*) no está claramente definido, debido quizá a que existen factores que afectan su reproducción; por ejemplo, raza, estado nutricional, fotoperiodo, temperatura ambiental, entre otros. Mientras que existen trabajos cuyos resultados sugieren que la presencia de un toro o sus olores no tiene efecto sobre la fisiología reproductiva de las vacas, otros trabajos documentan efectos contrarios; por ejemplo, que 67% de vaquillas expuestas a la orina de un toro sexualmente activo aceleró el inicio de la pubertad de éstas, apoyando la hipótesis de que la orina del macho contiene feromonas responsables del aceleramiento de la pubertad.^{32,34} Así, también en los bovinos la presencia de un macho o sus olores puede ejercer efectos sobre la fisiología reproductiva de las hembras, similares a los efectos que ocurren en borregos, cabras y cerdos.³²

Un ejemplo final de señales químicas con efecto "feromonal" en mamíferos es el del conejo doméstico, en el que la localización de los pezones por las crías depende totalmente de una señal química emitida por la madre.³⁵⁻³⁹ Esta señal, la llamada feromona de búsqueda del pezón, induce a las crías a realizar una rápida y estereotipada conducta de búsqueda del pezón, que es vital dado que la madre amamanta durante casi 3 min una vez cada 24 h.^{36,37,39} Una de las sustancias activas con propiedades feromonales identificadas en la leche de la coneja y al que las crías responden mediante la conducta de búsqueda del pezón, es el 2-metilbut-2-enal (2MB2).^{40,41}

Efecto de las señales olfatorias: cambios en la conducta y fisiología

Como ya se indicó, las señales olfatorias tales como las

named the Lee-Boot, Whitten, Vandenberg and Bruce effects.⁴³⁻⁴⁶ The Lee-Boot effect consists in the suppression of estrus in females housed together, it can be eliminated by destruction of the vomeronasal organ (Figure 1A), and the chemical cues responsible are contained in female mouse urine. In contrast, the Whitten effect is characterized by the induction of estrus in females when exposed to the urine of a male, and the Vandenberg effect by the acceleration of puberty in sexually immature females when exposed to the odors of an adult male. Finally, the Bruce effect occurs when fertilized ova do not implant in the uterus of recently mated mice if they are exposed to chemical cues contained in the urine of an unknown male, that is, of a male different to the one with which they mated.

As the various examples given above show, olfactory signals are produced by and/or emitted from a variety of sources.

Sources of olfactory signals

Skin glands are of major importance in the production and emission of chemical signals. These are exocrine glands which release their secretions via a system of ducts into the external environment, and are of two main types, sudoriparous and sebaceous (Figure 5). They are defined and subdivided according to their manner of secretion as: 1) Sudoriparous eccrine (also called merocrine), whose mechanism of secretion is by exocytosis, during which the cells form secretory

feromonas pueden afectar la fisiología y conducta en el animal receptor en varias formas. Según Brown¹⁶ dichos efectos se pueden clasificar en dos grupos: 1) olores de identificación individual, usualmente estables durante largos espacios de tiempo, por ejemplo, los olores específicos de sexo, edad o grupo social; y 2) olores que afectan el estado emocional del receptor y liberados en circunstancias especiales, como el olor de una hembra en estro, de un animal con estrés, o cuando un animal cambia su posición social. Los compuestos químicos de las señales olfatorias contenidas en la orina, heces o secreciones de las glándulas cutáneas, pueden ser afectados por el estado metabólico del emisor, niveles hormonales, la acción de los microorganismos sobre las secreciones y la identidad genética del individuo emisor.^{3,42}

En roedores, como el ratón casero (*Mus musculus*, que es el mamífero de laboratorio mejor estudiado con respecto a los efectos fisiológicos de la comunicación olfatoria), se han descrito los efectos de diversas feromonas sobre la fisiología reproductiva de hembras, y se conocen como efectos Lee-Boot, Whitten, Vandenberg y Bruce.⁴³⁻⁴⁶ El primero consiste en la supresión del estro cuando varias hembras se alojan juntas, y se puede eliminar con la destrucción del órgano vomeronasal (Figura 1A); la señal química responsable de inducirlo está contenida en la orina de las hembras. En contraste, el efecto Whitten consiste en la inducción del estro en las hembras de los ratones, provocado cuando ellas se exponen a la orina de un macho. El efecto Vandenberg consiste en acelerar la puber-

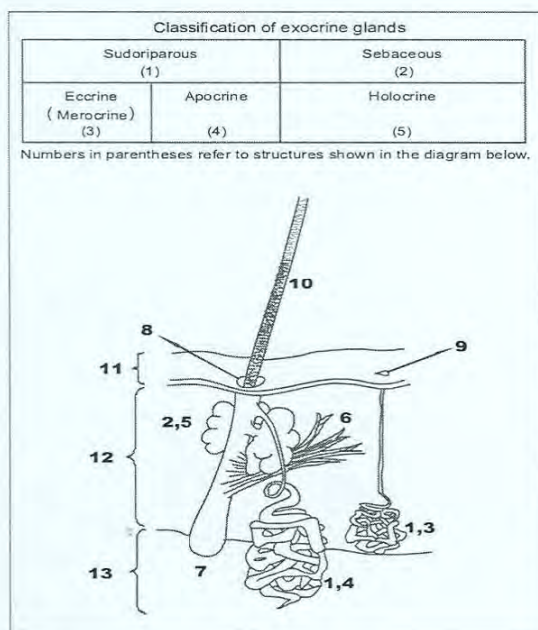


Figura 5: Esquema de los tipos de glándulas exócrinas: 1) glándulas sudoríparas; 2) glándulas sebáceas; 3) glándulas sudoríparas ecricinas; 4) glándulas sudoríparas apocrinas; 5) glándulas sebáceas holocrinas; 6) músculo piloerector; 7) folículo piloso; 8) sitio de salida de secreciones holocrina (sebo) y apocrina; 9) sitio de salida de secreción ecricina (sudor); 10) pelo que muestra su patrón de escamas; 11) epidermis; 12) dermis y 13) tejido graso subcutáneo (modificado de Albone y Shirley).¹⁴

Figure 5: Schematic representation of the various types of exocrine (skin) glands and associated structures: 1) sudoriparous; 2) sebaceous; 3) sudoriparous eccrine; 4) sudoriparous apocrine; 5) sebaceous holocrine; 6) piloerection muscle; 7) hair follicle; 8) site of exit of apocrine and holocrine (sebum) secretions; 9) site of exit of eccrine secretion (sweat); 10) hair showing scales; 11) epidermis; 12) dermis and 13) subcutaneous fat (modified from Albone y Shirley).¹⁴

vesicles in their cytoplasm which migrate to and fuse with the cell membrane and liberate their contents outside the cell; for example, the salivary glands. 2) Sudoriparous apocrine, in which part of the cell's cytoplasm forms the secretion; for example, the mammary glands. 3) Sebaceous holocrine, in which whole degraded cells form the secretion known as sebum; for example, the sebaceous glands (Figure 5).⁴⁷

Sudoriparous eccrine glands have a duct whose internal coiled portion is embedded in the dermis while the other leads directly to the surface of the skin. These glands are rare in mammals but are found, for example, in the snout of pigs and the muzzle of rabbits.¹⁴ Sudoriparous apocrine glands also have a duct, the internal coiled portion of which is embedded in the dermis but in which the other transports the secretion to a sebaceous hair follicle. These glands are common in mammals and are found, for example, on the entire skin of carnivores, bovids and equids. Sebaceous holocrine glands secrete almost directly into associated hair follicles, and are present in the skin of all mammals except cetaceans, with the largest glands generally found in the region of the muzzle, in the auditory meatus, and the anogenital area.¹⁴

Together, these skin glands produce a complex mixture of olfactory signals.¹⁴ The rabbit, for example, possesses several such glands (Figure 2), among the best studied of which are the submandibular (chin) glands (Figure 3A, B). These sudoriparous apocrine glands develop from hair follicles and are located on either side of the lower jaw. Each is composed of three groups of lobes, two groups situated laterally deep within the internal muscle layer, and one situated more superficially in the external hypodermis and united with the corresponding contralateral group at the midline. The lobes of each group form a single glandular mass, each lobe with its own duct to the surface of skin and with the ducts from the lobes of the three groups arranged in a "V" on the chin.⁴⁸ Rabbits also possess conspicuous inguinal glands (Figure 2) composed of a superficial sebaceous and a deeper sudoriparous part. The combined secretion from the two parts accumulates as a dark, strong-smelling encrustation in pouches of skin on either side of the inguinal area.⁴⁹⁻⁵²

As mentioned above, in mammals, hairs are often associated with sebaceous glands, which probably helps in chemical communication, since the hairs can accumulate and more efficiently disperse the signals originating from the associated glands. In fact some hairs, known as osmetrichia, appear specially adapted for chemical communication. In contrast to the smooth scales of other hairs they have deep, open scales better able to retain glandular secretions, and thus able to disperse the chemical cues contained in

tad cuando las hembras sexualmente inmaduras se exponen a los olores de un macho adulto. Finalmente el efecto Bruce ocurre cuando los óvulos fertilizados no se implantan en el útero de las ratonas, si después de copular la hembra se expone a las señales químicas contenidas en la orina de un macho extraño, es decir, un macho diferente al que la apareó.

Como se ha indicado en tales ejemplos, las señales olfatorias son producidas o emitidas por diversas fuentes del organismo.

Fuentes de señales olfatorias

Las glándulas cutáneas constituyen una de las fuentes implicadas en la producción y emisión de señales químicas. Las glándulas cutáneas exocrinas vierten sus productos de secreción por medio de un sistema de conductos, son de dos tipos principales: sudoríparas y sebáceas (Figura 5). Estas, a su vez, se clasifican de acuerdo con sus mecanismos de secreción en: 1) sudoríparas ecrinas (también llamadas merocrinas), cuyo mecanismo de secreción es la exocitosis, proceso en el que una célula forma en su citoplasma vesículas de secreción que migran hacia la membrana celular y se fusionan con ella para liberar su contenido al exterior de la célula; por ejemplo, las glándulas salivales. 2) Sudoríparas apocrinas, cuyo mecanismo de secreción consiste en que una porción del citoplasma de las células forma parte de la secreción; por ejemplo, las glándulas mamarias. 3) Sebáceas holocrinas, en el que las células completas se degradan para ser parte del producto de secreción conocido como sebo; por ejemplo, las glándulas sebáceas (Figura 5).⁴⁷

Las glándulas sudoríparas ecrinas consisten en un tubo secretor enroscado embebido en la dermis y un conducto que se dirige directamente a la superficie de la piel. Estas glándulas son escasas en la mayoría de los mamíferos, pero se encuentran, por ejemplo, en la nariz de los cerdos y el hocico de los conejos.¹⁴ Una glándula sudorípara apocrina también consiste en un conducto cuya porción enroscada interna está embebida en la dermis, y otra porción es un conducto que lleva la secreción al folículo piloso. Estas glándulas son comunes en los mamíferos y se encuentran, por ejemplo, por toda la piel de los carnívoros, bovinos y equinos. Las glándulas sebáceas holocrinas secretan casi directamente en los folículos pilosos a los que están asociadas y están presentes en la piel de todos los mamíferos excepto cetáceos, las más grandes se encuentran, por lo general, en la piel del hocico en el meato auditivo externo y en el área anogenital.¹⁴

Las glándulas cutáneas juntas pueden producir una mezcla compleja de señales olfatorias.¹⁴ Los conejos, por ejemplo, poseen varias de tales glándulas (Figura 2), las mejor estudiadas son las glándulas sub-

these more efficiently.¹⁴ Such osmetrichia are associated, for example, with the tarsal and interdigital glands of the deer *Mazama gouazoubira*.⁵³

In addition to secretions from skin glands, secretions from the reproductive tract, and urine may also contain odorous signals. Examples include the urine of mice and male cats mentioned above, and vaginal secretions in bitches, cats, hamsters, mares and cows indicating the sender's reproductive state.^{1,25,31,54}

Emission and distribution of olfactory signals in the environment

The sexual attractant contained in prepuccial fluids in the pig is a good example of a chemical signal that is simply released into the external environment without the sender displaying any particular behavior. The odor cues contained in these fluids, like the pheromones in the male's saliva mentioned above, induce sexual behavior in the female.³¹ However, in the case of the emission of the pheromones contained in saliva, the boar performs vigorous masticating movements resulting in the production of copious quantities of saliva while interacting with sow. Other species also display a variety of specific behaviors to actively deposit or disseminate secretions or their associated odors in the environment. The performance of behaviors resulting in the marking of objects or conspecifics with urine, feces, saliva or secretions from skin glands, is taken to imply chemical communication.^{1,3,14} Cats, for example, are considered to exhibit marking behavior when they deposit urine on objects by spraying.²⁵ Furthermore, results of a study by Pryor *et al.*⁵⁵ suggest that males living with other cats in the same household display urine marking more frequently than females or males living alone, and are more likely to mark areas that have been previously marked by other conspecifics.

Dogs (*Canis familiaris*) also show olfactory marking behaviors; who has not observed a dog marking, for example tree trunks, with urine? The behavior associated with urination in adult dogs is sexually dimorphic with respect to posture; whereas males raise a hind leg, females squat. These differences have led to the idea that in females urination has a purely eliminatory function, while in males it is also used in olfactory marking as it is influenced by the presence of other dogs and may be used to signal dominance, aggression and as a threat. Furthermore, in a study of two groups of free-living domestic dogs⁵⁶ the frequency of urine marking was found to be greater in males than in females, and that marking signaling territorial ownership occurred between alpha males. The frequency of urine marking by males, particularly near territorial borders during the intrusion of a dog

mandibulares (o del mentón; Figura 3A, B). Éstas son sudoríparas con secreción apocrina que se desarrollan a partir de folículos pilosos y se localizan en cada lado de la mandíbula. Cada una está compuesta de tres grupos de lóbulos, dos grupos laterales profundos situados en la parte interna de la capa muscular y un grupo situado más superficialmente en la hipodermis externa y unido por la línea media con el grupo contralateral correspondiente. Los lóbulos de cada grupo forman una sola masa glandular, cada lóbulo con su propio conducto secretor que llega hasta la superficie de la piel y con los conductos de los lóbulos de los tres grupos arreglados en forma de "V" sobre la barbilla.⁴⁸ Los conejos poseen también glándulas inguinales conspicuas (Figura 2) constituidas por una porción sebácea superficial y otra porción sudorípara más profunda. La combinación de las secreciones de ambas porciones se acumula como incrustaciones de color pardo y olor fuerte dentro de pliegues de piel a cada lado del área inguinal.^{49,52}

Como se ha mencionado, en los mamíferos los pelos a menudo están asociados con glándulas sebáceas que probablemente ayudan en la comunicación química ya que pueden acumular y dispersar eficientemente las señales químicas derivadas de sus glándulas asociadas. De hecho algunos pelos, conocidos como osmetriquia, parecen especialmente adaptados para la comunicación química. En contraste con las escamas lisas de otros pelos, éstos poseen escamas abiertas profundas, mejor adaptadas para retener secreciones glandulares y así dispersar las señales químicas contenidas en éstas más eficientemente.¹⁴ Tales osmetriquias están asociados, por ejemplo, con las glándulas tarsales e interdigitales del venado *Mazama gouazoubira*.⁵³

Además de las secreciones de las glándulas cutáneas, también las secreciones del tracto reproductivo y la orina contienen señales olfatorias. Los ejemplos incluyen la orina de ratones y gatos machos antes mencionados, también las secreciones vaginales de perras, gatas, hámsteres, yeguas y vacas que indican el estado reproductivo.^{1,25,31,54}

Emisión y diseminación de señales olfatorias en el ambiente

El atrayente sexual contenido en las secreciones prepuciales del cerdo es un buen ejemplo de señales químicas que pueden ser sólo emitidas, sin que el individuo despliegue conductas de marcaje específicas para diseminar dicha señal en el ambiente. El olor de las secreciones prepuciales del macho, igual que las feromonas en la saliva, induce la conducta sexual en la hembra.³¹ En este contexto, así como el cerdo despliega movimientos de masticación con las man-

from another group, also suggested that urine marking may have a function in territorial defense.

Although less is known about possible urine marking in bitches, the results of a recent study have shown the frequency of urination to be positively correlated with age. Furthermore, females four or more years of age usually directed urine at objects, and urination occurred more frequently and was more often directed at objects when females were outside their home range.⁵⁷ Thus it has been suggested that in females also, urination not only serves elimination but may also have an olfactory marking function, and even in sterilized and anestrus females.⁵⁷ Furthermore, females mark more frequently in the region of their nest, possibly to protect the young from interference by conspecifics.⁵⁶

Another domestic species displaying olfactory marking is the goat. When males reach sexual maturity the hair on their head and neck becomes darker and they start to rub their head and neck on objects in the surroundings, presumably to disperse the chemical signals responsible for the "male effect" described above. This behavior is specific to males and is testosterone dependent.⁵⁸

The golden hamster (*Misocricetus auratus*) also displays olfactory marking behavior. Females, for example, show two kinds of marking; vaginal and with the flank glands. The first occurs more frequently the day before estrus and in the presence of a male or his odors. In contrast, flank marking is stimulated by the odors of other females and increases in frequency following agonistic encounters.⁵⁹

As mentioned in the introduction, the European rabbit, including its domesticated form, displays a number of stereotyped marking behaviors, one of the most conspicuous of which is so-called "chinning" (Figure 3C, D). This consists in an animal rubbing its chin on objects or other conspecifics, impregnating them with secretion from its chin glands. Males are thought to display this behavior to establish, delimit and maintain their territory, to maintain the social hierarchy,^{4,8,9,60-62} indicate entrances to the warren, and to identify members of the social group.^{9,48} Studies by Hayes *et al.*⁶⁰ have shown that dominant males chin mark principally in the center of the territory occupied by the group, and also at the borders with territories of other social groups. The frequency of marking varies with the olfactory environment and social rank. Dominant males mark more frequently than subordinates, and more frequently in an environment recently marked by other animals than in an area without such marks.^{7,60}

In female rabbits chinning appears to signal estrus as this is associated with higher frequencies of marking. The hormones responsible for changes in the

díbulas para producir cantidades copiosas de saliva durante una interacción con una hembra, otros animales despliegan diversas conductas para depositar o diseminar sus secreciones en el ambiente. El marcaje olfatorio es el despliegue de conductas de marcaje de objetos o coespecíficos con orina, heces, saliva o secreciones de glándulas cutáneas especializadas, conductas que implican comunicación.^{1,5,14} Los gatos, por ejemplo, exhiben conductas de marcaje olfatorio con orina, cuando la depositan sobre objetos en forma de rocío.²⁵ Los resultados del estudio de Pryor *et al.*⁵⁵ sugieren que, particularmente, los machos que cohabitan con otros gatos en un mismo hogar exhiben conductas de marcaje con orina más frecuentemente que las hembras y que los gatos que viven solos, y marcan más las áreas previamente marcadas por otros coespecíficos.

También los perros (*Canis familiaris*) despliegan conductas de marcaje olfatorio; ¿quién no ha observado a un perro marcar con orina, por ejemplo, los troncos de los árboles? La conducta de marcaje con orina en los perros adultos es sexualmente dimórfica con respecto a la postura; los machos levantan una extremidad posterior y las hembras acuclillan el tren posterior. Tales diferencias conductuales hacen pensar que en las hembras la conducta de micción sólo tiene una función de eliminación, a diferencia de los machos, en los que la función es el marcaje olfatorio, influido por la presencia de otros perros y quizá para indicar su dominancia, su agresividad, y para amenazar. En un estudio con dos grupos de perros domésticos libres⁵⁶ se observó que la frecuencia de marcaje con orina era más alto en machos que en hembras, y que el "marcaje posesivo del territorio" ocurría entre los machos alfa. La frecuencia de marcaje con orina por los machos, especialmente cerca de los límites territoriales durante la intrusión de un perro de otro grupo, sugiere que el marcaje puede funcionar como defensa territorial.

Aunque se conoce menos acerca del posible marcaje con orina en las perras, los resultados de un estudio reciente mostraron que la frecuencia de expulsión de orina se correlacionó positivamente con la edad. Además, las hembras de cuatro o más años de edad usualmente dirigieron orina dirigida a objetos cuando las perras caminaban fuera de su ámbito hogareño.⁵⁷ Así, se ha sugerido que tanto en perras esterilizadas como en las intactas sin estro, la expulsión de orina no sólo tiene una función de eliminación, sino que también puede tener un papel en el marcaje olfatorio.⁵⁷ Además, las hembras mostraron una proporción alta de marcaje en el sitio donde se encontraba su nido, posiblemente para proteger a sus crías de intrusos de la misma especie.⁵⁶

Otra de las especies domésticas que despliegan

frequency of chinning depending on the reproductive state of the female are estradiol and progesterone. While levels of estradiol in the blood correlate positively with the frequency of chinning and with sexual receptivity, estradiol combined with progesterone increases aggressive behavior and reduces sexual receptivity and the frequency of chinning, characteristic behaviors of pregnancy.^{38,63-65}

The rabbit also emits chemical signals that are not deposited in the environment by marking. A notable example is the nipple-search pheromone present on the ventral skin of the mother and the effect of which has been described above.³⁵⁻³⁹ Another example are odors emitted by the inguinal glands, structures associated with inguinal skin pouches as described above (Figure 2) and the secretions of which give the rabbit its characteristic odor and are probably involved in recognition of members of the social group.^{50,51,66,67}

Perception of olfactory signals and pheromones: the main and accessory olfactory systems

Chemical signals are perceived by other conspecifics via specialized anatomical structures. Many vertebrates, including mammals, have two distinct olfactory systems, the main and the accessory (or vomeronasal) systems, which form parallel but distinct anatomical pathways (Figure 1). Based on this, Scalia and Winans⁶⁸⁻⁷⁰ proposed that these two systems might be specialized and functionally distinct, and suggested that in the rabbit pheromonal effects previously attributed to the main olfactory system might in fact depend on the vomeronasal system. This was followed by an influential paper in 1979 by Wysocki⁷¹ on the role of the vomeronasal system in the regulation of mammalian reproductive behavior, and in the same year Keverne⁷² reported that chemical signals associated with reproductive processes activate this system, producing reproductively relevant neuroendocrine and behavioral changes. In contrast, the main olfactory system is thought to be involved mainly in the learning of odors, such as those associated with particular individuals or contexts.^{73,74} Newborn rabbits, for example, learn odors associated with suckling using the main olfactory system.⁷⁵ Next, the anatomy of each of these systems in turn is described.

Molecules perceived by the main olfactory system make contact with the olfactory mucosa located in the nasal cavity, which is separated from the rest of the cranial cavity by the ethmoidal bone, and is divided into a left and right side by the nasal septum. Mammals have complex folds, the so-called turbinates, in the posterior part of the nasal cavity, which start at the ethmoidal bone and are covered for most of their

conductas de marcaje olfatorio son las cabras. Cuando un macho llega a ser sexualmente maduro, la capa de pelo de la cabeza y cuello cambian su color a un tono más oscuro y el macho comienza a frotar su cabeza y cuello sobre los objetos que están a su alrededor, presumiblemente para dispersar la señal química con efecto "feromonal" responsable de provocar el "efecto macho" en las hembras, descrito en párrafos anteriores. Esta conducta de marcaje es específica de los machos y depende de la testosterona.⁵⁸

El hámster (*Misocricetus auratus*) despliega también conductas de marcaje olfatorio. Las hembras, por ejemplo, realizan dos tipos de marcaje: vaginal y el que involucra a las glándulas de los flancos, en inglés *flank-marking*. El primero ocurre con mayor frecuencia un día antes del estro y en presencia de un macho o sus olores. En contraste, el marcaje con los flancos es estimulado por los olores de otras hembras y su frecuencia se incrementa cuando ocurren encuentros agonísticos.⁵⁹

Como se mencionó en la introducción, el conejo europeo, incluyendo la forma doméstica, es una especie que despliega conductas estereotipadas de marcaje, una de las más sobresalientes es el marcaje por frotamiento del mentón (Figura 3C, D). Esta conducta consiste en que el animal frota su barbilla sobre objetos u otros animales de su especie, impregnándolos con la secreción glandular. Los machos despliegan dicha conducta para establecer, delimitar y mantener su territorio, con el fin de marcar y mantener la jerarquía social,^{4,8,9,60-62} indicar las entradas de las madrigueras y para identificar a los miembros de su grupo social.^{9,48} Los estudios de Hayes *et al.*⁶⁰ mostraron que los machos dominantes marcan con el mentón principalmente en el centro del territorio ocupado por el grupo, y también en los límites entre territorios de grupos sociales diferentes. La frecuencia de marcaje varía según el ambiente olfatorio y el rango social del animal. Los machos dominantes marcan más frecuentemente que los subordinados; además, marcan más en un ambiente recién marcado que en otro sin marcas.^{7,60}

En las conejas, la conducta de marcaje del mentón parece ser un indicador de estro, ya que en está asociado con altas frecuencias de marcaje. Las hormonas responsables de que aumente o disminuya la frecuencia de marcaje, dependiendo del estado reproductivo de las hembras, son el estradiol y la progesterona. Mientras que los niveles sanguíneos de estradiol se correlacionan positivamente con la frecuencia de marcaje y la receptividad sexual. La acción combinada de estradiol y progesterona aumenta la conducta agresiva y disminuye la frecuencia de marcaje del mentón y la receptividad sexual, conductas características de la gestación.^{38,63-65}

extent by the olfactory mucosa. Mammals with a relatively poor sense of smell such as primates, have rather simple turbinates, with only the upper region covered with olfactory epithelium.⁷⁶ The olfactory epithelium contains the olfactory neurons, which are stimulated by molecules in the air entering the nasal cavity. The dendrites of these bipolar sensory neurons extend to the epithelial surface and possess long cilia where the neurotransduction processes initiating signal detection occur.⁷⁶ The axons of these neurons pass through the cribriform plate to synapse with secondary transduction neurons in the main olfactory bulbs of the brain. Together, these primary axons form the first cranial nerve.⁷⁷

The olfactory bulbs are rostral extensions of the cerebral hemispheres and form the first synaptic station of the olfactory system. They are divided into main and accessory bulbs, with the latter located on the dorsal surface of the main bulbs (Figure 1).⁷⁶ Although anatomical understanding of the olfactory bulbs is based mainly on studies of laboratory mammals such as rats, mice, hamsters and rabbits, this information should also apply to mammals more generally. From the main olfactory bulbs, information is transmitted via the lateral olfactory tract to the array of structures shown in Figure 1B, as well as to higher thalamic and neocortical areas.^{68,69}

In contrast to the main olfactory system, molecules stimulating the vomeronasal system activate sensory neurons located in the sensory epithelium of the vomeronasal organ, a tube-shaped bilateral structure situated above the palate and located on either side of the nasal septum within a cartilaginous sheath (Figures 1A and 6). The posterior end of the sheath is closed whereas the anterior end opens either into a duct to the nasal cavity, as in rodents, lagomorphs and various primates, or into the nasopalatine duct connecting the oral and nasal cavities as in marsupials, monotremes, carnivores, ungulates and insectivores. The vomeronasal organ is present in amphibians, reptiles and the majority of terrestrial mammals, but is absent or vestigial in fishes, birds and Old World primates. It varies considerably in size among mammals, and in rodents and lagomorphs, for example, it is well developed.⁷¹

The vomeronasal epithelium is similar to the main olfactory epithelium except that the dendrites of the sensory cells possess microvilli instead of cilia.⁷⁶ The axons of the sensory neurons, which together form the vomeronasal nerve, cross the cribriform plate to terminate in the glomerular layer of the accessory olfactory bulbs (Figure 1A).⁴⁴ From the accessory olfactory bulbs information is transmitted to the array of structures shown in Figure 1B, as well as to the medial preoptic area and medial hypothalamus, regions of the

Esta especie emite también otras señales químicas que no deposita en el ambiente por medio de conductas de marcaje. Un notable ejemplo de ello es la feromona de búsqueda del pezón, que es emitida por la piel ventral de la madre y cuyo efecto sobre las crías ya se explicó.³⁵⁻³⁹ Otro ejemplo son los olores emitidos por las glándulas inguinales, estructuras asociadas con pliegues de piel inguinal, como se ha descrito anteriormente (Figura 2), cuya secreción es responsable del olor característico del conejo⁵² y probablemente está involucrada en el reconocimiento de los miembros del grupo social.^{50,51,66,67}

Percepción de señales olfatorias y feromonas: sistemas olfativos principal y accesorio

Las señales químicas producidas por un individuo son percibidas por otro a través de estructuras anatómicas especializadas. En los vertebrados, incluidos los mamíferos, se han descrito dos sistemas olfativos denominados sistema olfativo principal y sistema olfativo accesorio o vomeronasal que tienen estructuras anatómicamente paralelas y funcionalmente distintas (Figura 1). Basados en ello, Scalia y Winans⁶⁸⁻⁷⁰ propusieron por primera vez que estos dos sistemas olfativos podrían estar especializados y funcionalmente distintos, sugirieron que en el conejo los efectos feromonales que se habían adscrito antes en el sistema olfativo principal, podían depender del sistema vomeronasal. A este trabajo siguió otro en 1979 por Wysocki,⁷¹ quien publicó un trabajo sobre el sistema vomeronasal y su papel en la conducta reproductiva de los mamíferos; en el mismo año, Keverne⁷² notificó que las señales químicas asociadas con procesos reproductivos estimulan este sistema, produciendo cambios neuroendocrinos y conductuales relevantes para la reproducción. En contraste, el sistema olfativo principal parece estar involucrado principalmente en el aprendizaje de olores, como la asociación de olores en contextos o individuos particulares.^{73,74} Por ejemplo, los conejos recién nacidos aprenden olores nuevos asociados con el amamantamiento utilizando el sistema olfativo principal.⁷⁵ A continuación se describe la anatomía de cada uno de estos sistemas.

Las moléculas que son percibidas por el sistema olfativo principal hacen contacto con la mucosa olfativa que se encuentra en la cavidad nasal, que está separada del resto de la cavidad craneana por el hueso etmoides y dividida en dos espacios, derecho e izquierdo, por el septum nasal. Los mamíferos presentan pliegues turbinales complejos en la parte posterior de la cavidad nasal, originados del hueso etmoides y recubiertos en gran parte de su superficie por mucosa olfativa. Los mamíferos con el sentido del

central nervous system involved in the regulation of reproductive processes.^{71,72}

The males of various mammalian species including cattle, sheep, goats, horses and cats, examine the perineal region of females by introducing urine and vaginal secretions into their mouths, the non-volatile pheromones contained in which can then activate the sensory neurons of the vomeronasal organ.^{3,78} This is often accompanied by a distinctive behavior known as flehmen, which consists in the receiver raising the head, curling back the upper lip, and so facilitating transport of the urine or vaginal secretions to the vomeronasal organ (Figure 6). It has been suggested that flehmen is performed by males (and sometimes females) of species with well developed vomeronasal organs, and with vomeronasal ducts opening into the nasopalatine canal.³ Males may also show flehmen in response to the urine of other males or even to their own urine, suggesting that chemosensory information may also be obtained by this means in non-sexual contexts. Females occasionally show flehmen during sexual encounters with males, and cows sometimes show it in response to the urine of other cows in estrus or proestrus or in response to birth fluids.³

Importance of chemical communication in the management of domestic mammals

The points mentioned above draw attention to the importance of understanding chemical communication for the management of domestic animals, including in contexts relevant to veterinary practice. For example, stress resulting from hospitalization or temporary boarding of pets may be reduced by placing a cloth or bed in their cage on which they are accustomed to rest at home, and thus impregnated with familiar odors. This simple method may also be used to reduce stress in puppies or kittens at weaning, when they are separated, usually abruptly, from their mother and given to a new owner.

It should also be noted that while it is important to maintain an adequate level of hygiene in hospitals, boarding facilities and laboratory animal houses, this should not be so excessive as to prevent animals from perceiving their own familiar "home" odors. It is, therefore, suggested that when cleaning cages a small amount of material soiled with urine or feces be left so that animals feel themselves to be in familiar and safe surroundings as indicated by the presence of their own odors.¹¹

Based on knowledge of the importance of chemical communication in the regulation of reproductive processes in domestic mammals such as sheep, goats, cattle, and pigs, the stimulatory effect of the odors of sexually active males on the reproductive physiology of

olfato comparativamente menos desarrollado, como primates, poseen pliegues turbinales simples y sólo su porción superior posee epitelio olfativo.⁷⁶ El epitelio olfativo contiene neuronas sensoriales olfativas que son estimuladas por las moléculas contenidas en el aire cuando entran a la cavidad nasal. Las dendritas de tales células bipolares, que alcanzan la superficie epitelial, poseen cilios donde ocurre el proceso de neurotransducción iniciando la detección de señales.⁷⁶ Los axones atraviesan la placa cribiforme del hueso etmoides para hacer sinapsis en los bulbos olfativos principales del cerebro. Estos axones forman el nervio olfativo, primer par craneal.⁷⁷

Los bulbos olfativos son extensiones rostrales de los hemisferios cerebrales y constituyen la primera estación sináptica del sistema olfativo. Se dividen en principales y accesorios, estos últimos se localizan en la superficie dorsocaudal de los bulbos olfativos principales (Figura 1).⁷⁶ Aunque la descripción histológica de estos bulbos se basa en estudios realizados en mamíferos de laboratorio como ratas, ratones, hámsteres y conejos, tal descripción puede aplicarse a la mayoría de los mamíferos. Desde los bulbos olfativos principales, la información es transmitida vía el tracto olfativo lateral a un arreglo de estructuras que se muestran en la Figura 1B, así como a áreas talámicas y neocorticales superiores.^{68,69}

En contraste con el sistema olfativo principal, las moléculas que estimulan el sistema vomeronasal activan las neuronas sensoriales del órgano vomeronasal, estructura bilateral en forma de tubo que se encuentra arriba del paladar a cada lado del septum nasal y encerrada dentro de una cápsula cartilaginosa (Figuras 1A y 6). En su parte posterior, la cápsula está cerrada, y en su porción anterior se abre por un conducto a la cavidad nasal, como en roedores, lagomorfos y algunos primates, o al canal nasopalatino que conecta a las cavidades oral y nasal, como en marsupiales, monotremas, carnívoros, ungulados e insectívoros. El órgano vomeronasal está presente en anfibios, reptiles y en la mayoría de los mamíferos terrestres, pero ausente, o sólo con un vestigio, en peces, aves y primates del viejo mundo. El tamaño del órgano vomeronasal varía mucho entre los mamíferos; en roedores y lagomorfos, por ejemplo, está bien desarrollado.⁷¹

Las características del epitelio vomeronasal son semejantes a las del epitelio olfativo principal, pero las dendritas de las células sensoriales vomeronasales poseen microvellosidades en lugar de cilios.⁷⁶ Los axones de las neuronas sensoriales forman el nervio vomeronasal, que penetra la placa cribiforme del hueso etmoides y termina en la capa glomerular del bulbo olfativo accesorio (Figura 1A).⁴⁴ Desde los bulbos olfativos accesorios la información es transmitida al arreglo de estructuras mostradas en la Figura

females may be used to accelerate puberty and sexual maturity, to induce or synchronize ovulation and to reduce the period of anestrus between births.³² Females that reach puberty at an earlier age as a result of exposure to the odor of a mature male have higher ovulation rates, more estrous cycles, and consequently a greater reproductive potential than females not exposed to male odors.³¹ In young pigs, for example, the odor of a mature male can advance puberty by as much as 30 days, and in females at around 190 days (the mean age of puberty), it can result in marked synchronization of estrus.⁷⁹ Females of various domestic mammals show a period of postpartum anestrus due to inhibition of the synthesis of LH and the liberation of follicular stimulating hormone due to the sucking stimulus of the young. Some investigators, however, have been able to overcome this and induce estrus in lactating females by exposing them to the odor of a male.^{31, 32}

In the pig chemical signals are also of practical importance in artificial insemination as they influence reproductive processes such as sperm transport and ovulation.³² In fact, a commercially available aerosol containing synthetic boar odor (boar mate) is often used to detect when sows are in estrus and as a stimulant during insemination.

Chemical communication is also important in the

1B, así como al área preóptica media e hipotálamo medial, que son regiones del sistema nervioso central implicadas en la regulación de la reproducción (Figura 1B).^{71,72}

Los machos de algunas especies de mamíferos, como bovinos, borregos, cabras, caballos y gatos, al inspeccionar la región perianal de las hembras, introducen en la boca orina y secreciones vaginales, cuyas feromonas no volátiles son recibidas por las neuronas del órgano vomeronasal.^{3,78} Esto último está asociado con una conducta distintiva conocida como flemen, que consiste en dirigir la cabeza hacia atrás, curvar el labio superior y con la lengua llevar la orina y secreciones vaginales hacia el órgano vomeronasal (Figura 6). Se ha sugerido que la conducta de flemen es realizada por machos (algunas veces por las hembras) de especies cuyo órgano vomeronasal está bien desarrollado y presenta el conducto vomeronasal abierto al canal nasopalatino.³ Los machos pueden también desplegar la conducta de flemen en respuesta a la orina de otros machos, o incluso a la orina propia, ello sugiere que la información quimiosensorial obtenida por este medio puede tener alguna función en situaciones no sexuales. Las hembras rara vez despliegan flemen durante encuentros sexuales con machos, y ocasionalmente las vacas manifiestan flemen en respuesta a la orina de otras vacas en estro o proestro, o en respuesta a los fluidos de animales recién nacidos.³

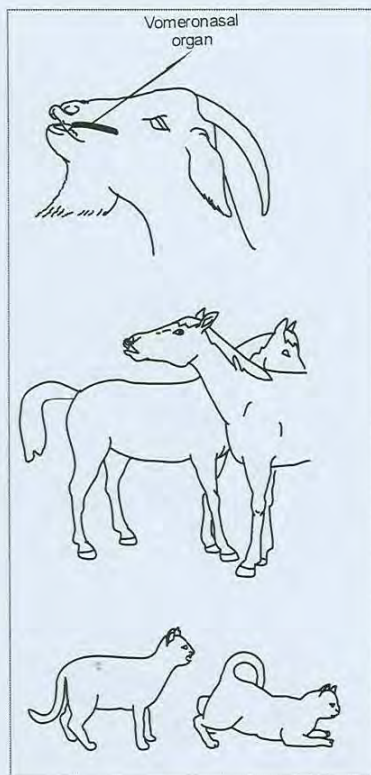


Figura 6: Conducta de flemen en la cabra, el caballo y el gato (modificado de Hart).³

Figure 6: Flehmen in the goat, horse and cat (modified from Hart).³

management of mother-young relations, and in various domestic mammals parturient mothers clearly respond to the odors of their young.⁸⁰ In sheep, for example, the amniotic fluid covering the newborn lamb is attractive to the mother immediately post partum, and within approximately four hours of giving birth the mother learns to recognize her own lamb by its smell and will reject any other lamb.^{80,81} It is possible to provoke rejection by the mother of her own lamb by washing off the amniotic fluid, and the reverse, to induce the mother to accept a foreign lamb within four hours of giving birth if it is impregnated with amniotic fluid. The origin of the amniotic fluid (whether from the biological mother or another female) does not affect acceptance of the lamb or learning its particular odor, suggesting that amniotic fluid contains generally attractive chemical cues in addition to those permitting individual recognition of the lamb.⁸¹

Information on chemical communication in rabbits might also have practical applications in the management of this species. For example, the frequency of chinning could be used in the selection of stud males, choosing those showing high frequencies given that under natural conditions the most dominant and sexually active males have high levels of testosterone and the highest frequencies of marking.^{4,6-9,11,60} Similarly, since females show high frequencies of chinning when in estrus, this could be useful as an indicator of their reproductive preparedness. Chinning behavior could also be used to diagnose pregnancy given that the frequency of marking declines abruptly after mating and remains low throughout gestation.^{88,63-65} In addition, chinning might be used in juveniles to identify puberty, since this behavior appears when production of gonadal steroids begins at around 50 days of age, at least in the New Zealand white breed.^{84,85}

Conclusion

The examples given above illustrate the importance of olfactory communication in mammals and draw attention to the need for further research into the function, physiological mechanisms, and anatomical structures serving this form of communication in domestic animals. Such information should provide a basis for better management of domestic and captive mammals, and particularly in relation to reproduction, the design of facilities promoting well-being, and in clinical practice.

Acknowledgements

Preparation of this article was supported by a doctoral scholarship from Conacyt, and funding from

Importancia de la comunicación química en el manejo de mamíferos domésticos

Los puntos arriba mencionados resaltan la importancia de la comunicación química en el manejo de los animales domésticos, incluyendo contextos de particular relevancia en la práctica veterinaria. Por ejemplo, el estrés provocado en los animales debido a factores como la hospitalización o en condiciones de hacinamiento o alojamiento en pensiones de mascotas, puede reducirse si se coloca dentro de la jaula una tela o cama donde un perro o un gato descansan habitualmente en su hogar, de manera que se impregne con olores familiares. Esta sugerencia puede usarse para reducir el estrés de los cachorros de perros o gatos en el momento del destete, es decir, cuando son separados de su madre para entregarlos con un nuevo propietario, lo que generalmente ocurre en forma abrupta.

Cabe mencionar que aunque es importante mantener una higiene adecuada en hospitales y pensiones para animales de compañía y en laboratorios donde se utilizan animales, ésta no debe ser tan excesiva hasta el punto que los animales no perciban en lo absoluto sus propios olores. Por eso se sugiere que al momento de asear las jaulas donde se alojan animales, en un laboratorio, puede dejarse un poco de material de cama con orina o heces, de manera que el animal se encuentre en un "lugar familiar", que reconoce por su olor propio.¹¹

Con base en los conocimientos sobre comunicación por medio de señales químicas y su participación en conductas y procesos reproductivos de los mamíferos domésticos, como borregos, cabras, vacas, toros y cerdos, es posible usar el efecto estimulador de los olores de un macho sexualmente activo sobre la fisiología reproductiva de las hembras, para acelerar el inicio de la pubertad y la madurez sexual, inducir o sincronizar la ovulación, o reducir el periodo de anestro entre partos.³² Las hembras que alcanzan la pubertad en edades más tempranas a través de la exposición al olor de un macho maduro, tienen tasas de ovulación más altas, más ciclos estrales y, por lo tanto, un potencial reproductivo mayor que las hembras que no fueron expuestas al olor de un macho.³¹ Por ejemplo, en cerdas jóvenes, el olor de un macho maduro puede adelantar la pubertad cerca de 30 días, y en las hembras de alrededor de 190 días de edad (edad promedio a la pubertad) puede dar como resultado una marcada sincronía del estro.⁷⁹ Las hembras de algunos mamíferos domésticos presentan un periodo de anestro posparto debido a la inhibición de la síntesis de hormona luteinizante y liberación de hormona folículo estimulante vía el estímulo de succión por parte de las crías. Algunos investigadores, sin embargo, han

PROMEP UATLAX- PTC-38. We thank QFB Laura Garcia Rivera and CD Carolina Rojas Castañeda for excellent bibliographical assistance and Dr. Amando Bautista Ortega for help with the figures.

Referencias

1. Agosta WC. Chemical communication: the language of pheromones. New York: Scientific American Library, 1992.
2. Drickamer LC. Sexual attractants. In: Knobil E, Neill JD, editors. Encyclopedia of reproduction. San Diego: Academic Press, 1999; 4:444-448.
3. Hart BL. The behavior of domestic animals. New York: WH Freeman & Company, 1985.
4. Mykytowycz R. Territorial function of chin gland secretion in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus* (L.). Nature Lond 1962; 193:799.
5. Mykytowycz R, Goodrich BS, Hesterman ER. Methodology employed in the studies of odour signals in wild rabbits, *Oryctolagus cuniculus*. Acta Zool Fennica 1984; 171:71-75.
6. Bell DJ. Social olfaction in lagomorphs. Symp Zool Soc Lond 1980; 45:147-164.
7. Black-Cleworth P, Verberne G. Scent-marking, dominance and flehmen behavior in domestic rabbits in an artificial laboratory territory. Chem Senses Flavour 1975; 1:465-494.
8. Mykytowycz R. Territoriality in rabbit populations. Aust Nat Hist 1964; 14:326-329.
9. Mykytowycz R. Further observations on the territorial function and histology of the submandibular cutaneous (chin) gland in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus* (L.). Anim Behav 1965; 13:400-412.
10. Mykytowycz R, Gambale S. The distribution of dunghills and the behaviour of free-living rabbits, *Oryctolagus cuniculus* (L.), on them. Forma et Functio 1969; 1:333-349.
11. Mykytowycz R, Hesterman ER, Gambale S, Dudzinski ML. A comparison of the effectiveness of the odors of rabbits, *Oryctolagus cuniculus*, in enhancing territorial confidence. J Chem Ecol 1976; 2:13-24.
12. von Holst D, Hutzelmeyer H, Kaetzke P, Khaschei M, Rödel HG, Schrutka H. Social rank, fecundity and lifetime reproductive success in wild European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Behav Ecol Sociobiol 2002; 51:245-254.
13. Karlson P, Lüscher M. "Pheromones"; a new term for a class of biologically active substances. Nature 1959; 183:55-56.
14. Albone ES, Shirley SG. Mammalian semiochemistry. The investigation of chemical signals between mammals. Chichester: Wiley & Sons, 1984.
15. Beauchamp GK, Doty RL, Moulton DG, Mugford RA. The pheromone concept in mammalian chemical communication: a critique. In: Doty RL, editor. Mammalian olfaction, reproductive processes and behavior. New York: Academic Press, 1976; 143-160.
16. Brown RE. Mammalian social odors: a critical review.

sido capaces de superar esto y han inducido el estro en hembras lactantes cuando las exponen al olor de un macho.^{31,32}

Los olores del cerdo son de particular importancia en la práctica de la inseminación artificial, pues influyen en procesos reproductivos como el transporte de espermatozoides y la ovulación.³² De hecho, un aerosol comercialmente disponible con olor sintético de macho (*boar mate*) a menudo se utiliza en la práctica de la inseminación artificial, para detectar a las hembras en estro, o como estimulante durante la inseminación.

La comunicación química es también importante en el manejo de las interacciones madre-cría y en algunas especies de mamíferos domésticos las madres parturientas responden a los olores de sus crías.⁸⁰ En el borrego, por ejemplo, el fluido amniótico que cubre a una cría recién nacida es atractivo para la hembra inmediatamente después del parto y durante aproximadamente cuatro horas de ocurrido el nacimiento la madre aprende a reconocer a su propia cría por su olor y rechazará a cualquier otra.^{80,81} Es posible provocar el rechazo de la hembra hacia su propia cría si se limpia el líquido amniótico de ésta, y, por el contrario, se puede inducir a una hembra a que acepte a una cría extraña dentro de un periodo de cuatro horas después del parto si ésta se impregna con fluido amniótico. El origen del líquido amniótico (de la propia madre o de otra hembra) no tiene efecto sobre la aceptación de la cría por la hembra y en el aprendizaje de su olor distintivo, ello sugiere que el líquido amniótico contiene señales químicas responsables de la atracción general más que para el reconocimiento individual de la cría.⁸¹

La información sobre comunicación química en los conejos también puede tener aplicaciones prácticas en el manejo de esta especie. Por ejemplo, la frecuencia de marcaje del mentón en los machos puede emplearse para la selección de sementales, eligiendo a aquellos que desplieguen las frecuencias más altas, pues se sabe que, en vida silvestre, los machos dominantes y sexualmente más activos poseen niveles de testosterona altos y despliegan las frecuencias de marcaje del mentón también más altas.^{4,6-9,11,60} Similarmente, se sabe que las hembras despliegan frecuencias de marcaje del mentón más altas cuando están en estro, por lo que dicha conducta es útil como indicador de este estado reproductivo. La misma conducta puede indicar gestación, pues la frecuencia de marcaje disminuye bruscamente después del apareamiento y permanece con bajos niveles durante la gestación.^{38,63-65} Además, el marcaje del mentón puede utilizarse en los juveniles como indicador de pubertad, ya que la conducta aparece en esta etapa cuando inicia la producción de hormonas esteroides gonadales, alrededor

- In: Rosenblatt JS, Hinde RA, Beer C, Busnel MC, editors. *Advances in the study of behavior*. New York: Academic Press, 1979; 10:103-162.
17. Johnston RE. Chemical communication and pheromones: the types of chemical signals and the role of the vomeronasal system. In: Finger TE, Silver WL, Restrepo D, editors. *The neurobiology of taste and smell*. 2nd ed. New York: Wiley-Liss, 2000; 101-127.
 18. Doty RL. Mammalian pheromones: Fact or fantasy? In: Doty RL, editor. *Handbook of olfaction and gustation*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2003; 345-383.
 19. Booth WD, Signorel JP. Olfaction and reproduction in ungulates. In: Milligan SR, editor. *Oxford reviews of reproductive biology*. Oxford: Oxford University Press, 1992; 14:263-301.
 20. Booth WD. Sexual dimorphism involving steroidal pheromones and their binding protein in the submaxillary salivary gland of the Göttingen miniature pig. *J Endocrinol* 1984; 100:195-202.
 21. Stefanczyk-Krzyszowska S, Krzymowski T, Wasowska B, Jana B, Slominski J. Intramuscular injections of male pheromone 5 α -androstenediol change the secretory ovarian function in gilts during sexual maturation. *Reprod Biol* 2003; 3:241-257.
 22. Dorries KM, Adkins-Regan E, Halpern BP. Olfactory sensitivity and behavioral responses to the pheromone androstenediol are not mediated by the vomeronasal organ in domestic pigs. *Brain Behav Evol* 1997; 49: 53-62.
 23. Krzymowski T, Grzegorzewski W, Stefanczyk-Krzyszowska S, Skipor J, Wasowska B. Humoral pathway for transfer of the boar pheromone, androstenediol, from the nasal mucosa to the brain and hypophysis of gilts. *Theor Appl Genet* 1999; 52:1225-1240.
 24. Stefanczyk-Krzyszowska S, Krzymowski T, Grzegorzewski W, Wasowska B, Skipor J. Humoral pathway for local transfer of the priming pheromone androstenediol from the nasal cavity to the brain and hypophysis in anesthetized gilts. *Exp Physiol* 2000; 85:801-809.
 25. Bradshaw J, Cameron-Beaumont C. The signaling repertoire of the domestic cat and its undomesticated relatives. In: Turner DC, Bateson P, editors. *The domestic cat: the biology of its behaviour*. Cambridge: Cambridge University Press, 2000; 67-93.
 26. Feldman H. Methods of scent marking in the domestic cat. *Can J Zool* 1994; 72:1093-1099.
 27. Hendriks WH, Moughan PJ, Tarttelin MF, Woolhouse AD. Felinine: a urinary amino acid of Felidae. *Comp Biochem Physiol* 1995; 112:581-588.
 28. Natoli E. Behavioural responses of urban feral cats to different types of urine marks. *Behav* 1985; 94:234-243.
 29. Tarttelin MF, Hendriks WH, Moughan PJ. Relationship between plasma testosterone and urinary felinine in the growing kitten. *Physiol Behav* 1998; 65:83-87.
 30. Gelez H, Fabre-Nys C. The "male effect" in sheep and goats: a review of the respective roles of the two olfactory systems. *Horm Behav* 2004; 46:257-271.
 31. Izard MK. Pheromones and reproduction in domestic animals. In: Vandenbergh JA, editor. *Pheromones and reproduction in mammals*. New York: Academic Press, 1983; 253-285.
 32. Rekwot PI, Ogwu D, Oyedipe EO, Sekoni VO. The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction. *Anim Reprod Sci* 2001; 65:157-170.
 33. Iwata E, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y. Substances derived from 4-ethyl octanoic acid account for primer pheromone activity for the "male effect" in goats. *J Vet Med Sci* 2003; 65:1019-1021.
 34. Izard MK, Vandenbergh JA. The effects of bull urine on puberty and calving date in crossbred beef heifers. *J Anim Sci* 1982; 55:1160-1168.
 35. Distel H, Hudson R. The contribution of the olfactory and tactile modalities to the nipple-search behaviour of newborn rabbits. *J Comp Physiol A* 1985; 157:599-605.
 36. Hudson R, Distel H. Nipple location by newborn rabbits: behavioural evidence for pheromonal guidance. *Behaviour* 1983; 85:260-275.
 37. Hudson R, Distel H. Nipple-search pheromone in rabbits: dependence on season and reproductive state. *J Comp Physiol A* 1984; 155:13-17.
 38. Hudson R, Gonzalez-Mariscal G, Beyer C. Chin-marking behavior, sexual receptivity and pheromone emission in steroid-treated, ovariectomized rabbits. *Horm Behav* 1990; 24:1-13.
 39. Hudson R, Distel H. On the nature and action of the rabbit nipple-search pheromone: a review. In: Apfelbach D, Muller-Schwarze D, Reuter K, Weiler E, editors. *Chemical signals in vertebrates VII*. Oxford: Elsevier, 1995; 223-232.

de los 50 días de edad, al menos en los conejos de la raza Nueva Zelanda.^{82,83}

Conclusión

Estos ejemplos ilustran la importancia de la comunicación por olores en mamíferos y resaltar la atención sobre la necesidad de continuar con estudios sobre la función, mecanismos fisiológicos y estructuras anatómicas que subyacen a esta forma de comunicación en animales domésticos. Tal información debería proveer la base para un mejor manejo de los mamíferos domésticos y en cautiverio, particularmente en relación a la reproducción, en el diseño de instalaciones adecuadas para su bienestar y en la práctica clínica.

Agradecimientos

La realización de este artículo contó con el apoyo otorgado como beca de doctorado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y también con el apoyo de PROMEP UATLAX- PTC-38. Agradecemos a la QFB Laura García Rivera y a la CD Carolina Rojas Castañeda por su excelente asistencia bibliográfica, así como al Dr. Amando Bautista Ortega por su apoyo con las figuras.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

40. Keil W, von Stralendorff F, Hudson R. A behavioral bioassay for analysis of rabbit nipple-search pheromone. *Physiol Behav* 1990; 47:525-529.
41. Schaal B, Coureaud G, Langlois D, Giniès C, Semon E, Perrier G. Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature* 2003; 424:68-72.
42. Penn D, Potts W K. Chemical signals and parasite-mediated sexual selection. *TREE* 1998; 13:391-396.
43. Bronson FH, Macmillan B. Hormonal responses to primer pheromones. In: Vandenberg JA, editor. *Pheromones and reproduction in mammals*. New York: Academic Press, 1983; 175-197.
44. Halpern M. The organization and function of the vomeronasal system. *Ann Rev Neurosci* 1987;10:325-362.
45. Marchlewska-Koj A. Pregnancy blocking by pheromones. In: Vandenberg JG, editor. *Pheromones and reproduction in mammals*. New York: Academic Press, 1983; 151-174.
46. Vandenberg JA. Pheromonal regulation of puberty. In: Vandenberg JA, editor. *Pheromones and reproduction in mammals*. New York: Academic Press, 1983; 253-285.
47. Stoddart DM. The scented ape. The biology and culture of human odour. Cambridge: Cambridge University Press, 1990; 49-78.
48. Lyne AG, Molyneux GS, Mykytowycz R, Parakkal PF. The development, structure and function of the submandibular cutaneous (chin) gland in the rabbit. *Aust J Zool* 1964; 12:340-348.
49. Goodrich BS, Mykytowycz R. Individual and sex differences in the chemical composition of pheromone-like substances from the skin glands of the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *J Mammal* 1972; 53:540-548.
50. Hesterman ER, Mykytowycz R. Misidentification by wild rabbits, *Oryctolagus cuniculus*, of group members carrying the odor of foreign inguinal gland secretion. I. Experiments with all-male groups. *J Chem Ecol* 1982a; 8:419-427.
51. Hesterman ER, Mykytowycz R. Misidentification by wild rabbits, *Oryctolagus cuniculus*, of group members carrying the odor of foreign inguinal gland secretion. II. Experiments with all-female groups. *J Chem Ecol* 1982b; 8:723-729.
52. Mykytowycz R. Observations of odoriferous and other glands in the Australian wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, and the hare, *Lepus europaeus*: the inguinal glands. *CSIRO Wildl Res* 1966; 11:49-64.
53. Ajmat MT, Chamut S, Black-Decima P. "Osmetricchia" in the grey brocket deer (*Mazama gouazoubira*). *Bio-cell* 1999; 23:171-176.
54. Ma W, Klemm WR. Variations of equine urinary volatile compounds during the oestrous cycle. *Vet Res Comm* 1997; 21:437-446.
55. Pryor PA, Hart BL, Bain MJ, Cliff KD. Causes of urine marking in cats and effects of environmental management on frequency of marking. *Am Vet Med Assoc* 2001; 219:1709-1713.
56. Pal SK. Urine marking by free-ranging dogs (*Canis familiaris*) in relation to sex, season, place and posture. *App Anim Bahv Sci* 2003; 80:45-59.
57. Wirant SC, McGuire B. Urinary behavior of female domestic dogs (*Canis familiaris*): influence of reproductive status, location, and age. *App Anim Behav Sci* 2004; 85:335-348.
58. Wakabayashi Y, Iwata E, Kikustui T, Takeuchi Y, Mori Y. Regional differences of pheromone production in the sebaceous glands of castrated goats treated with testosterone. *J Vet Med Sci* 2000; 62:1067-1072.
59. Johnston RE. The causation of two scent-marking behaviour patterns in female hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Anim Behav* 1977; 25:317-327.
60. Hayes RA, Richardson BJ, Wyllie SG. Semiochemicals and social signaling in the wild European rabbit in Australia. I. Scent profiles of chin gland secretion from the field. *J Chem Ecol* 2002a; 28:347-368.
61. Hayes RA, Richardson BJ, Claus SC, Wyllie SG. Semiochemicals and social signaling in the wild European rabbit in Australia. II. Variations in chemical composition of chin gland secretion across sampling sites. *J Chem Ecol* 2002b; 28:2613-2625.
62. Hayes RA, Richardson BJ, Wyllie SG. To fix or not to fix: the role of 2-phenoxethanol in rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, chin gland secretion. *J Chem Ecol* 2003; 29:1051-1064.
63. Gonzalez-Mariscal G, Melo AI, Zavala A, Beyer C. Variations in chin-marking behavior of New Zealand female rabbits throughout the whole reproductive cycle. *Physiol Behav* 1990; 48:361-365.
64. Hudson R, Vodermyer T. Spontaneous and odour-induced chin marking in domestic female rabbits. *Anim Behav* 1992; 43:329-336.
65. Soares MJ, Diamond M. Pregnancy and chin marking in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Anim Behav* 1982; 30:941-943.
66. Hesterman ER, Malafant K, Mykytowycz R. Misidentification by wild rabbits, *Oryctolagus cuniculus*, of group members carrying the odor of foreign inguinal gland secretion. III. Experiments with mixed sex groups and analysis of further data from all-male and all-female groups. *J Chem Ecol* 1984; 10:403-419.
67. Ordinola P, Martinez-Gomez M, Manzo J, Hudson R. Response of male domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) to inguinal gland secretion from intact and ovariectomized females. *J Chem Ecol* 1997; 23:2079-2091.
68. Scalia F, Winans SS. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J Comp Neurol* 1975; 161:31-56.
69. Scalia F, Winans SS. New perspectives on the morphology of the olfactory system: the olfactory and the vomeronasal pathways in mammals. In: Doty RL, editor. *Mammalian olfaction, reproductive processes and behavior*. New York: Academic Press, 1976; 7-28.
70. Winans SS, Scalia F. Amygdaloid nucleus: new afferent input from the vomeronasal organ. *Science* 1970; 170:330-332.
71. Wysocki CJ. Neurobehavioral evidence for the involvement of the vomeronasal system in mammalian reproduction. *Neurosci Biobehav Rev* 1979; 3:301-341.

72. Keverne EB. The dual olfactory projections and their significance for behaviour. In: Ritter FJ, editor. Chemical ecology: odour communication in animals. Amsterdam: Elsevier, 1979; 75-83.
73. Johnston RE, Rasmussen K. Individual recognition of female hamsters by males: role of chemical cues of the olfactory and vomeronasal systems. *Physiol Behav* 1984; 33:95-104.
74. Meredith M. Sensory physiology of pheromone communication. In: Vandenbergh JG, editor. Pheromones and reproduction in mammals. New York: Academic Press, 1983; 199-252.
75. Hudson R, Distel H. Pheromonal release of suckling in rabbits does not depend on the vomeronasal organ. *Physiol Behav* 1986; 37:123-128.
76. Farbman AI. Cell biology of olfaction. Cambridge: Cambridge University Press, 1992.
77. Shipley MT, McLean JH, Ennis M. Olfactory system. In: Paxinos G, editor. The rat nervous system. San Diego: Academic Press, 1994; 899-926.
78. Evans C. Vomeronasal chemoreception in vertebrates: a study of the second nose. London: Imperial College Press, 2003.
79. Brooks PH, Cole DJ. The effect of the presence of a boar on the attainment of puberty in gilts. *J Reprod Fertil* 1970; 23:435-440.
80. Lévy F, Keller M, Poindron P. Olfactory regulation of maternal behavior in mammals. *Horm Behav* 2004; 46:284-302.
81. Lévy F, Poindron P. The influence of amniotic fluid on maternal behavior in parturient sheep. *Biol Behav* 1984; 9:65-88.
82. Hudson R, Distel H. Sensitivity of female rabbits to changes in photoperiod as measured by pheromone emission. *J Comp Physiol A* 1990; 167: 225-230.
83. Hudson R, Melo AI, Gonzalez-Mariscal G. Effect of photoperiod and exogenous melatonin on correlates of estrus in the domestic rabbit. *J Comp Physiol A* 1994; 175:573-579.
84. Gonzalez-Mariscal G, Melo AI, Zavala A, Beyer C. Chin-marking behavior in male and female New Zealand rabbits: onset, development, and activation by steroids. *Physiol Behav* 1992; 52:889-893.
85. Wales NAM, Ebling FJ. The control of the apocrine glands of the rabbit by steroid hormones. *J Endocrinol* 1971; 51:763-770.

ANEXO 2. OLFACTORY GUIDANCE OF NIPPLE ATTACHMENT AND SUCKLING IN KITTENS OF THE DOMESTIC CAT: INBORN AND LEARNED RESPONSES

En este anexo se presenta un trabajo en co-autoría publicado en la revista indexada *Developmental Psychobiology* sobre comunicación química en la interacción madre – cría en el gato doméstico.

Gina Raihani¹
Daniel González¹
Lourdes Arteaga²
Robyn Hudson¹

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de
México
AP 70228, CP 04510
Distrito Federal, México
E-mail: graihani@gmail.com
E-mail: rhudson@biomedicas.unam.mx

²Centro Tlaxcala de Biología
de la Conducta
Universidad Autónoma de Tlaxcala
Universidad Nacional Autónoma
de México
Tlaxcala, México

Olfactory Guidance of Nipple Attachment and Suckling in Kittens of the Domestic Cat: Inborn and Learned Responses

ABSTRACT: In 60 kittens (11 litters) from free-ranging domestic cats we investigated the role of chemical cues in facilitating nipple attachment and suckling during the first month of postnatal life when kittens are totally dependent on the mother's milk. Kittens were tested both together and individually on sedated females in different reproductive states. We found (1) that newborn kittens with no suckling experience responded to the ventrum of lactating but not to the ventrum of nonlactating females with search behavior and attached to nipples within minutes; (2) that even in older kittens, nipple attachment depended on females' reproductive state, with virtually no attachments on nonreproducing females, some on pregnant females, the greatest number on early-lactating females, followed by a decline on late-lactating females; and (3) that kittens could locate their particular, most used nipple on their mother but not on a female of similar lactational age, even after eye opening. We suggest that kittens respond from birth with efficient nipple-search behavior to inborn olfactory cues on the mother's ventrum, that emission of these is under hormonal control, but that kittens also quickly learn olfactory cues specific to their own mother and to their own particular nipples. © 2009 Wiley Periodicals, Inc. *Dev Psychobiol* 51: 662–671, 2009.

Keywords: chemical communication; nipple-search pheromone; odor learning; reproductive state; teat order; domestic cat; *Felis silvestris catus*

INTRODUCTION

One of the first challenges facing any newborn mammal is to find a nipple or teat, attach to it and suck, and even in altricial species, often with no direct behavioral assistance from the mother. We still know, however, surprisingly little about the sensory mechanisms used by mammalian young to achieve this, although studies of various taxa suggest olfactory cues to be important and in some species such as the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*),

essential (dog: Fox, 1970; laboratory rat: Blass, Teicher, Cramer, Bruno, & Hall, 1977; Singh, Tucker, & Hofer, 1976; laboratory mouse: McClelland & Cowley, 1982; domestic rabbit: reviews in Hudson & Distel, 1987, 1995; Hudson, Rojas, Arteaga, Martínez-Gómez, & Distel, 2008). Rabbit pups, for example, respond without postnatal experience to pheromonal cues on the mother's ventrum with stereotyped nipple-search behavior and suckling (Hudson, 1985; Hudson & Distel, 1983), and if made anosmic do not search for or attach to nipples, resulting in starvation (Distel & Hudson, 1985; Hudson & Distel, 1987). Emission of these cues is dependent on females' reproductive state and can be readily stimulated in ovariectomized females by administering estradiol, progesterone and prolactin (González-Mariscal, Chirino, & Hudson, 1994; Hudson, González-Mariscal, & Beyer, 1990).

In a recent study of suckling behavior in the domestic cat (Hudson, Raihani, González, Bautista, & Distel, 2009), we reported that kittens nuzzle the mother's

Received 7 April 2009; Accepted 24 July 2009

Correspondence to: G. Raihani and R. Hudson

Contract grant sponsor: CONACyT

Contract grant number: 48692-Q

Contract grant sponsor: DGAPA

Contract grant number: IN229907

Published online 15 September 2009 in Wiley InterScience
(www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/dev.20401

© 2009 Wiley Periodicals, Inc.

ventrum and attach to nipples unaided by her within minutes of birth, that at first they attach to any nipple but within hours mainly use nipples in the more posterior rows, and that by postnatal day 3 they have developed a well-defined "teat order" in which each kitten mainly uses one or sometimes two particular nipples regardless of the side the mother lies on to nurse. The agreement of these findings with earlier reports (Ewer, 1959, 1961; Rosenblatt, 1962, 1971, 1972, 1983; recent review in Mermet, Coureaud, McGrane, & Schaal, 2008), suggests the robust nature of this behavior and the ready opportunity it provides to experimentally study sensory and cognitive mechanisms underlying the organization of suckling behavior in these altricial young. Given that kittens only start to open their eyes during the second postnatal week, it seems likely that olfactory cues on the mother's ventrum are important in stimulating nipple-search behavior and in eliciting nipple attachment (Ewer, 1959, 1961; Hudson et al., 2009; Rosenblatt, 1971, 1972, 1983).

Experimental findings, however, are contradictory, ranging from complete disruption of suckling following ablation of kittens' olfactory bulbs (Kovach & Kling, 1967), major disruption following lavage of the nasal mucosa with ZnSO₄ (cited in Schuleikina-Turpaeva, 1986), to only weak disruption following the application of a novel odorant to the kittens' nares, obstructing the nares with nasal plugs (Larson & Stein, 1984), or washing the nipples and mammary region (Blass, Schuleikina-Turpaeva, & Lushekin, 1988). Nevertheless, as noted in a recent review (Mermet et al., 2008), all these studies suffer from the difficulty of interpreting the behavior of animals subjected either to invasive and not always verified

procedures, and/or testing them under highly artificial conditions.

It was therefore our aim to re-investigate the role of olfactory cues in stimulating searching on the mother and nipple attachment in kittens by first studying their behavior in a more natural experimental context and in intact young. Based on previous observations (Ewer, 1959, 1961; Hudson et al., 2009), we hypothesized that kittens would use both inborn and postnatally learned olfactory cues to locate nipples and suckle, and we conducted three kinds of experiments to test the following predictions: (1) that kittens will respond with nipple-search and suckling behavior from birth (i.e., without postnatal experience) to the ventrum of lactating but not to the ventrum of nonlactating females; (2) based on studies in the rabbit mentioned above, that the strength of the kittens' response will depend on females' reproductive state; and (3) that kittens tested on the ventrum of lactating females other than their mother will not attach preferentially to nipples corresponding in location to their particular nipples on their mother.

GENERAL METHODS

Animals

We collected data from five multiparous cross-bred females and their litters (60 kittens from 11 litters; Tab. 1) kept in a private home. The females were free to mate with local free-ranging males, which from observations of matings were several individuals. They were fed daily dried and canned commercial cat food and fresh meat and fish. Milk, water, dried food and litter

Table 1. Females and Litters

Litter ID	Birth Date	Mother	Parity	No. of Kittens	No. of Kittens Using Particular Nipples on Rows: 1-2-3-4 ^a
Po3	September 28, 2007	Polka	3rd	6	0-2-2-2
Ca3	October 5, 2007	Calcefin	3rd	6	0-1-5-2-5-2
Fe3	November 12, 2007	Fea	3rd	5	0-2-1-2
Ca4	January 25, 2008	Calcefin	4th	4	0-1-2-1
Po4	January 28, 2008	Polka	4th	7	0-5-2-5-2-2
Fe4	February 10, 2008	Fea	4th	7	1-2-2-2
Lo1	April 12, 2008	Lolita	1st	—	—
Po5	May 12, 2008	Polka	5th	8	2-2-2-2
Fe5	May 31, 2008	Fea	5th	—	—
Ri2	June 9, 2008	Rita	2nd	2	0-0-1-1
Lo2	July 30, 2008	Lolita	2nd	—	—
Po6	August 31, 2008	Polka	6th	6	0-2-2-2
Fe6	October 13, 2008	Fea	6th	5	0-2-1-2
Ca6	November 4, 2008	Calcefin	6th	4	0-0-2-2
Total				60	

— Mother only used as stimulus female; kittens not tested.

^aFractions indicate kittens using two particular nipples.

trays were always available, and the females were free to leave the house at will (Hudson et al., 2009).

Each female served as a test stimulus in multiple experiments (see below), and the response of kittens to the ventrum of stimulus females was tested when the kittens were between 0 (day of birth) and 24 days old, that is, before and after eye opening and before the start of weaning at about 1 month of age.

Procedures

Females gave birth in the house, and in six cases in the presence of experimenters, allowing close observation of parturition and immediate postpartum behavior of mothers and kittens. After parturition, litters were transferred to a foam rubber bed (area for the litter 70 cm × 40 cm) lined with flannel and located in a quiet part of the house such as a cupboard or spare room allowing a clear view of the litter during nursing. Kittens that could not be readily distinguished by coat color were marked on the head, nape or back with white correcting fluid in the case of dark kittens, and with gentian violet spray in the case of white or ginger kittens. As reported previously (Hudson et al., 2009), this did not appear to affect the behavior of either mothers or young, and the weight gain of marked kittens did not differ from that of their unmarked littermates.

We counted the day of birth as Day 0, and from the first midnight to the next as Day 1, and so on. Kittens were weighed individually to the nearest 0.1 g on an electronic balance on the day of birth and daily thereafter. We determined use of particular nipples by individual kittens ("teat order") in two ways: (1) by directly observing litters during nursing at least once per day and recording by instant scan sampling which nipple each kitten was attached to, and (2) every second day by videotaping a full nursing event (from arrival of the mother to nurse, to kittens releasing nipples after milk let-down) and recording the nipple to which each kitten spent most time attached. Mothers had four symmetrical pairs of nipples, which we identified by row from anterior to posterior, and whether the nipples were left or right.

Except for tests of inborn responding in kittens at birth (Tab. 2, top panel), three females were used in each experimental session testing kittens' nipple-search behavior and nipple attachment; their mother, and depending on the availability of other stimulus animals, a nonreproducing control female (in most sessions), and/or a female of similar lactational age to the mother (within 1 month of giving birth) and referred to as a lactating female, a pregnant female, and/or a female in the second month of lactation and referred to as a weaning female (Tab. 2). For the same litter we used the same combination of three females across test sessions but changed the sequence in which the females were presented to the litters to control for possible order effects. Test sessions were separated by at least a day (mean 4.2, *SD* 2.1) and continued until the start of the fourth postnatal week just before the start of weaning (Tab. 2).

For testing, the females were sedated with 0.70 ml of Inoketam[®] 1000 (Virbac, Carros, France) injected subcutaneously at the nape of the neck, with subsequent smaller injections administered as necessary, and were laid on their right side in the typical nursing posture with both nipple lines exposed. The kittens were placed with their muzzles in contact with the

Table 2. Litters and Kittens Used for Testing

Litter ID	Birth Date	No. of Kittens	No. of Test Sessions	Test Age (Days)		Control Female		Lactating Female		Own Mother
				Birth	Birth	Lo	Ca	Lo	Ca	
Fe4	February 10, 2008	7	1							Po4
Po5	May 12, 2008	5	1							Lo1
Total		12	2							
Litter ID	Birth Date	No. of Kittens	No. of Test Sessions	Test Age (Days)		Control Female		Lactating Female		Own Mother
				Birth	Birth	Lo	Ca	Lo	Ca	
Po3	September 28, 2007	6	4	10, 12, 19, 24		Ri		Ca3		Po3
Ca3	October 5, 2007	6	2	3, 5		Ri		Po3		Ca3
Ca4	January 25, 2008	4	3	4, 7, 11		Lo		Po4		Ca4
Po4	January 28, 2008	7	4	3, 5, 9, 12		Lo		Ca4		Po4
Fe4	February 10, 2008	7	3	3, 5, 10		Ri		Po4		Fe4
Ri2	June 9, 2008	2	3	7, 11, 16		Lo		Fe5		Ri2
Ca6	November 4, 2008	4	2	3, 6		Po		Fe6		Ca6
Total		36	21							
Litter ID	Birth Date	No. of Kittens	No. of Test Sessions	Test Age (Days)		Pregnant Female		Weaning Female		Own Mother
				Birth	Birth	Ca4	Lo1	Po3	Po4	
Fe3	November 16, 2007	5	2	6, 9						Fe3
Fe4	February 10, 2008	7	1	15						Fe4
Po6	August 31, 2008	6	4	5, 9, 13, 15		Ca6		Lo2		Po6
Fe6	October 13, 2008	5	3	9, 13, 18		Ca6		Po6		Fe6
Total		23	10							

female's ventrum, released, and their behavior recorded for 5 min on video (Sony HANDYCAM DCR-SR42), and for 10 min for the newborn kittens used in tests of inborn responding (see below). Two kinds of tests were performed: (1) litters were placed in contact with the ventrum of each of the stimulus females and (in addition to the video record) the location of the nipples to which each kitten attached was directly noted by the experimenter; and (2) in each session kittens were also tested singly on their mother and on another lactating female. For this, each kitten was placed with its muzzle in contact with the female's ventrum midway between the second and third nipple rows and released. To reduce the time females remained sedated, for each litter we only tested the three kittens that while suckling under normal conditions on the mother showed the most consistent use of a single nipple (cf. Hudson et al., 2009). To ensure kittens' motivation to search and attach to nipples, litters were separated from their mother before testing for approximately 3–6 hr, depending on the kittens' age. Video recordings were transferred to a PC for subsequent analysis using the program Windows Media Player 9.

Throughout the study, animals were kept and treated according to the guidelines for the care and use of animals in research of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and according to the current laws of Mexico. At the end of experimental sessions the sedated stimulus females were confined in a familiar room of the house. After regaining full consciousness, mothers showed apparently normal nursing behavior and all cats continued to maintain close voluntary contact with the experimenters. All animals survived the test procedures, and kittens showed normal weight gain. At about 8 weeks of age they were given away as pets with the help of local veterinarians.

Behavioral Analysis

From the video recordings we scored the following behaviors:

Nipple attachment: when a kitten grasped and remained attached to a nipple for at least 3 s, together with the position of the nipple on the stimulus female.

Attachment latency: the time taken by a kitten from the start of a trial to attach to a nipple for at least 3 s.

Posture: when kittens were tested singly allowing more detailed observation of their behavior we scored their body posture when attached to a nipple on a five-point scale from low to maximum arousal: 1 = kitten weakly attached without visibly sucking, 2 = kitten attached and visibly sucking, 3 = as for 2 but with the front legs splayed in a "V" on either side of the nipple, 4 = as for 3 but with arched neck, concave back, and/or with hind legs splayed out sideways, 5 = as for 4 but accompanied by rhythmic treading movements with the forepaws against the female's ventrum, sometimes while vocalizing, and the kitten bracing and propelling itself forward on outstretched hind legs. The highest level of arousal reached by a kitten for at least 3 s during a single nipple attachment was taken as its score for that event.

Data Analysis and Graphical Representation

For statistical analyses and graphical representations we used the program Prism 5 (GraphPad Software Inc. San Diego, USA). We

calculated each kitten's mean score for each of the behavioral variables and conditions in which it was tested, and compared kittens' performance across stimulus females using nonparametric tests since data were not normally distributed (Kolmogorov–Smirnov test). We used Friedman repeated measures ANOVAs followed by Dunn's post hoc multiple comparisons to compare responses across females of different reproductive state, and otherwise Wilcoxon signed ranks tests for matched samples, or in the case of percent of attachments to particular nipples, the Wilcoxon signed ranks test comparing a theoretical median with the actual median. All statistical tests were two-tailed with $p < 0.05$ taken as the level of significance.

RESULTS

General Behavior of Mothers and Kittens

Mothers gave birth and raised their young to weaning without apparent difficulty, and allowed close observation and manipulation of their kittens without protest. Even young kittens did not appear fatigued by testing and showed normal suckling behavior and milk intake when returned to their mother after test sessions. In general, the behavior of mothers and kittens corresponded to the description given in a previous report in which four of the mothers in the present study had also been used (Hudson et al., 2009). Most importantly for the present study, by postnatal day 3 each kitten principally used one or sometimes two particular nipples (cf. Ewer, 1959, 1961; Hudson et al., 2009; Rosenblatt, 1971, 1972, 1983).

Inborn Responding to Nipple-Search Cues

Here we asked whether lactating cats emit specific cues eliciting nipple-search and suckling behavior in the newborn young, and whether kittens respond with nipple attachment to these cues without prior suckling experience.

Methods. In two litters (seven and eight kittens, respectively) suitable stimulus females were available at the time of birth, that is, a lactating female other than the mother that had given birth during the previous month, and a nonlactating control female (Tab. 2, top panel). In the first litter the kittens were removed from their mother as they were born and before contacting her ventrum. They were dried, taken to a separate room and placed in a flannel-lined bucket containing three kittens from an older litter to provide warmth and tactile stimulation. Three hours after the birth of the last kitten the litter was placed for 10 min in contact with the ventrum of a sedated lactating female, returned to the bucket for 15 min to regain warmth, and then tested in the same way on a nonlactating female.

The second litter was treated similarly except that three of the kittens were left with the mother to distract her from removal of the experimental kittens, and that this time the experimental kittens were tested first on a nonlactating and then on a lactating female.

Results and Discussion. When placed in contact with the ventrum of a lactating female, kittens of both litters showed vigorous search behavior (Prechtl, 1952) accompanied by loud vocalizations, and eight of the 12 kittens (66%) attached to and sucked nipples. Kittens concentrated their searching in the posterior, inguinal area of the females (cf. Hudson et al., 2009), and although those attached to nipples were sometimes pushed off in the general scramble, they quickly attached to other nipples and continued sucking to the end of the 10-min test. Although the kittens were only about 3 hr old at the start of testing, the percent that attached was within the range for older kittens tested on lactating females in the next experiment reported below (Fig. 1). Nevertheless, this was still considerably less than the high percent of attachment shown by newborn kittens left together with their mother after birth (Hudson et al., 2009), and when tested on their anesthetized mother at later ages (next experiment, Fig. 1). In the normal postpartum situation kittens have more time to attach to nipples than the 10 min chosen here to avoid kitten fatigue and cooling. Furthermore, the older test kittens used in the next experiment had time to learn to

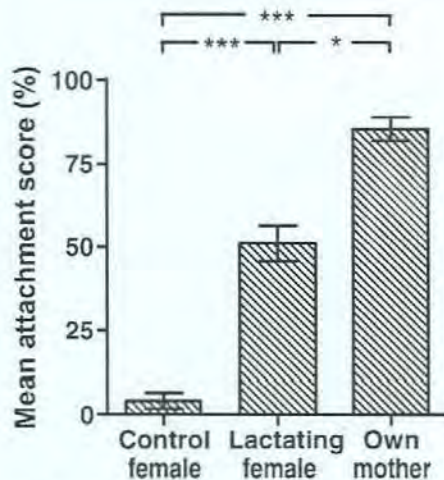


FIGURE 1 Percent of kittens ($n = 36$ from 7 litters) attaching to nipples when tested on a nonreproducing control female, on a female in the first month of lactation, and on their own mother in the first month of lactation. Kitten means and SEMs are shown, and the results of Dunn's post hoc tests following a Friedman ANOVA: $p < 0.001$ (***), $p < 0.05$ (*); see text for details of statistics and Table 2 for a description of litters and stimulus females.

identify their own principle nipples and possibly familiar and additionally stimulating odors on the ventrum of their own mother (cf. Figs. 1 and 3).

When placed in contact with the ventrum of a nonlactating female, kittens of both litters again started vigorously searching but quickly appeared disoriented, stopped searching and often crawled away, even when repeatedly retrieved and again placed with their muzzles in contact with the female's ventrum. Two kittens, however, attached to nipples although both let go within a few seconds. A sign test reported the difference in frequency of nipple attachments in the two conditions to be significant ($p = 0.035$). Furthermore, the attachment latencies (5.1 and 8.9 min) of the two kittens that took nipples on a nonlactating female were considerably longer than the latencies of the eight kittens that attached on the two lactating females (mean 2.9 min, $SD 1.7$).

Although only 12 kittens from two litters were tested, the results suggest the importance of cues on the ventrum of lactating females for stimulating nipple-search behavior and nipple attachment. Presumably these are at least partly olfactory, given that female cats have permanently erect nipples and that the sedated stimulus females did not obviously differ in any other way, although we did not control for possible differences in body temperature. While the females' soft ventral fur might also contribute to kittens' nipple-search behavior, alone it is not a sufficient stimulus given kittens' failure to search for and attach to nipples on the nonlactating females (see also Fig. 1). In addition, the results suggest that kittens respond appropriately to these cues without suckling experience.

Dependence of Nipple-Search Cues on Females' Reproductive State

Following from the above results, here it was our aim to examine the relation between the presence of cues eliciting nipple-search behavior in kittens and female cats' reproductive state.

Methods. As described in the General Methods Section, we tested the nipple-search behavior and nipple attachment of kittens on three stimulus females comprising the kittens' mother, and then depending on the availability of animals, on a nonreproducing control female and a lactating female other than the kittens' mother (Tab. 2, middle panel; Fig. 1), or on a pregnant female at any stage of gestation and a weaning female (Tab. 2, bottom panel; Fig. 2). Fifty-two kittens (10 litters) were tested on their mother, 36 kittens (7 litters) were tested on nonreproducing and on lactating females, and 23 kittens (4 litters) were tested on pregnant and on weaning females. Kittens were usually tested both before and after eye opening, and

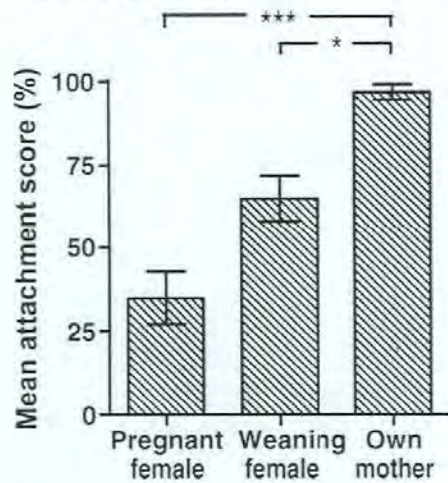


FIGURE 2 Percent of kittens ($n = 23$ from 4 litters) attaching to nipples when tested on a pregnant female, on a female in the second month of lactation and so weaning her young, and on their own mother in the first month of lactation. Kitten means and SEMs are shown, and the results of Dunn's post hoc tests following a Friedman ANOVA: $p < 0.001$ (**), $p < 0.05$ (*); see text for details of statistics and Table 2 for a description of litters and stimulus females.

balancing the order in which the stimulus females were presented across sessions.

Results and Discussion. Nipple-search behavior and nipple attachment by kittens clearly depended on the stimulus females' reproductive state. Thus, while only one kitten attached and only once to a nipple on a non-reproducing female, the percent of kittens attaching to nipples increased when tested on pregnant females, reached a peak when tested on females during the first month of lactation, and then declined on weaning females in the second month of lactation. A Friedman ANOVA comparing the percent of kittens attaching when tested on their mother, on another lactating female, and on a nonreproducing female (Fig. 1) reported significant differences ($F_{2,36 \text{ kittens}} = 67.2, p < 0.0001$), and for all post hoc pair-wise comparisons (Dunn's tests: kittens' mother vs. another lactating female, $p < 0.05$; kittens' mother vs. a nonreproducing female, $p < 0.001$; another lactating female vs. a nonreproducing female, $p < 0.001$). Nevertheless, only four kittens (from different litters) failed to attach to nipples on the unfamiliar lactating female in any trial.

A Friedman ANOVA comparing the percent of kittens attaching when tested on their mother, on a pregnant female, and on a weaning female (Fig. 2), also reported significant differences ($F_{2,23 \text{ kittens}} = 31.52, p < 0.0001$), although not for all comparisons (Dunn's tests: kittens'

mother vs. a pregnant female, $p < 0.001$; kittens' mother vs. a weaning female, $p < 0.05$; a pregnant female vs. a weaning female, ns).

As for the newborn young reported above, kittens often failed to maintain contact with the ventrum of the nonlactating control females, crawling away or climbing over the female's head and flanks.

It was notable that kittens attached to nipples more often when tested on their mother versus another lactating female at a similar stage of lactation (Fig. 1). Furthermore, even when kittens attached to nipples both on their mother and on another lactating female they did so significantly faster on their mother (Fig. 3; Wilcoxon signed ranks test: $W_{32 \text{ kittens}} = 299, p < 0.006$). In addition, 16 of the kittens that were tested individually and attached to nipples both on their mother and on another lactating female adopted postures indicating high arousal significantly more often when attached to nipples on their mother (Fig. 4; $W_{16 \text{ kittens}} = 42, p < 0.03$). There are at least two, not mutually exclusive explanations for the stronger response of kittens to their own mother than to other lactating females: that they learned and therefore responded more strongly to general odor cues specific to their mother, and that they responded more strongly to odor cues distinguishing their particular nipple(s) (see Identification of Particular Nipples Using Learned Odor Cues Section).

Although again the number of litters and stimulus females was small, the kittens' pattern of responding to females in different reproductive states was clear, and consistent with the results of the experiment testing kittens at birth. The pattern was also similar to the differential responding shown by rabbit pups to rabbit

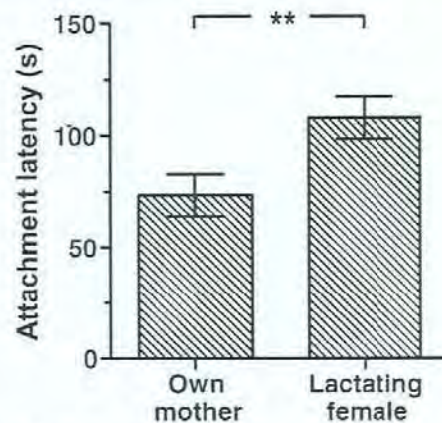


FIGURE 3 Time taken by kittens to attach to nipples when tested on their own mother and on another lactating female, both in the first month of lactation ($n = 32$ kittens from 7 litters). Kittens and stimulus females were the same animals as in Figure 1. Kitten means and SEMs are shown; Wilcoxon signed ranks test: $p < 0.01$ (**).

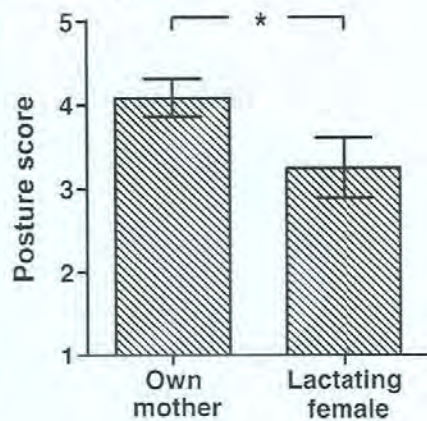


FIGURE 4 Postural scores of 16 kittens from the same litters as in Figure 1 when tested singly and attaching to nipples both on their own mother and on another lactating female, both in the first month of lactation. Kitten means and *SEMs* are shown; Wilcoxon signed ranks test; $p < 0.03$ (*).

females across the reproductive cycle (Hudson & Distel, 1984, 1990; reviews in Hudson & Distel, 1995; Hudson et al., 2008). This suggests that as in rabbits, female cats emit odor cues releasing nipple-search behavior and facilitating nipple attachment in their young, and that emission of these cues is under hormonal control (see General Discussion Section).

The finding that kittens responded more strongly to their mother than to other lactating females suggests, as mentioned above, that in addition to inborn responses, kittens learn postnatally cues associated with their mother and that enhance their suckling performance.

Identification of Particular Nipples Using Learned Odor Cues

As mentioned in the Introduction Section, during the first two or three postnatal days each kitten learns to identify and preferentially use a particular nipple or pair of nipples (Ewer, 1959, 1961; Hudson et al., 2009; Rosenblatt, 1971, 1972). How this is achieved is unclear, and more particularly, whether kittens use primarily olfactory cues, tactile cues, topographical features of the mother's body, cues from neighboring littermates, or some combination of these. Here it was our aim to investigate this by testing kittens' ability to locate their particular nipples when placed on their mother versus an unfamiliar lactating female, and when tested together as a litter and individually.

Methods. For this we analyzed the nipple-attachment behavior of the 32 kittens that attached to nipples both on their mother and on the unfamiliar lactating female

(Fig. 1). We asked what percent of kittens' attachments were to their particular nipples when they were tested together or individually on the two kinds of stimulus females. In the first litter all five kittens were tested individually, but then to reduce the time stimulus females remained sedated, only three kittens from each of the subsequent litters were used.

Results and Discussion. Kittens directed a significantly greater percent of attachments to their particular nipple when tested on their mother than to the corresponding nipple when tested on another lactating female (Fig. 5; Wilcoxon signed ranks test: $W_{32 \text{ kittens}} = 115$, $p < 0.05$). Expressed differently, whereas kittens tested on their mother attached to their particular nipple in a significantly greater percent of attachments than to be expected by chance (12.5% for each of the eight nipples; Wilcoxon signed ranks test comparing kittens' actual median scores with scores expected by chance: $W_{32 \text{ kittens}} = 372$, $p < 0.05$), this was not the case for the corresponding nipple on the lactating female ($W_{32 \text{ kittens}} = 45$, $p = 0.665$). This was true even for tests after postnatal day 13 when kittens had opened their eyes ($W_{29 \text{ kittens}} = 57$, $p < 0.525$), and even when including attachments in the same row as the particular nipple (25% for each of the four rows; $W_{29 \text{ kittens}} = 149$, $p = 0.093$).

Only in the case of five kittens might failure to attach to the equivalent of their particular nipple on another lactating female have been due to these nipples not having been used by the stimulus females' own kittens.

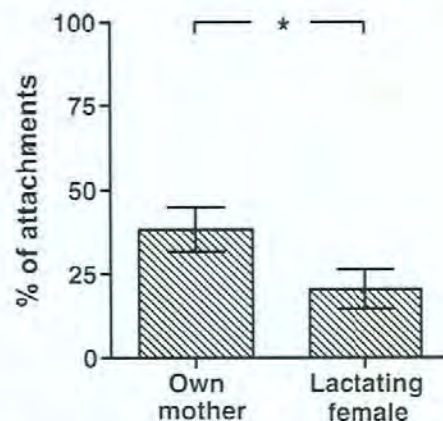


FIGURE 5 Percent of nipple attachments by kittens that were to their particular nipple when tested on their own mother and to a nipple in the corresponding location when tested on another lactating female, both in the first month of lactation. Kittens and stimulus females were the same animals as in Figure 1. Kitten means and *SEMs* are shown; Wilcoxon signed ranks test; $p < 0.05$ (*).

However, of these five kittens three attached to other nipples, and two to the equivalent of their particular nipples even though these were otherwise unused.

Kittens tested individually showed essentially the same behavior, that is they attached significantly more often to their particular nipple on their mother than to the corresponding nipple on another lactating female ($W_{20 \text{ kittens}} = 36, p < 0.008$).

These findings suggest that the kittens made little or no use of topographical features of their mother's body to locate particular nipples, and not even after eye opening. Nor did the presence of, or cues from littermates appear important given the kittens' ability to locate their particular nipples on their mother when tested singly. Although kittens can learn to recognize particular nipples on artificial brooders using distinctive tactile and possibly topographical cues distinguishing these (Rosenblatt, 1971, 1972, 1983), to our knowledge there is no evidence that they use such cues under natural conditions on the mother. Thus, at present it is difficult to imagine that the cues used by kittens to identify their particular nipple could be other than olfactory.

Nevertheless, the 38.3%, *SEM* 6.7 of attachments that were to particular nipples by kittens when tested on their own mother (Fig. 5) was lower than we expected from our previous report on the behavior of kittens suckling under normal conditions (Hudson et al., 2009). However, when we returned to the recordings of our previous study and calculated the percent of attachments that were to particular nipples during the first five minutes of nursing bouts (the duration of test sessions in the present study), we obtained a similar mean of 35.3%, *SEM* 4.2, suggesting that the test conditions used here had little effect on kittens' nipple-search behavior.

GENERAL DISCUSSION

The present study provides strong support for the hypothesis that kittens of the domestic cat use both inborn and postnatally learned responses to olfactory cues on the mother's ventrum to locate nipples and suckle. Evidence for inborn responses comes from the finding that kittens removed from their mother at birth and thus without suckling experience, responded on their very first contact with the ventrum of another lactating female but not to the ventrum of a nonlactating female with search behavior and nipple attachment. Evidence also comes from the finding that the frequency of nipple attachments by kittens depended on the stimulus females' reproductive state, with almost no attachments on nonreproducing females, an increase in attachments on pregnant females, a maximum on early lactating females, followed by a decline on late lactating females.

This pattern is remarkably similar to the pattern of nipple-search behavior and nipple attachment shown by rabbit pups in response to odor cues emitted by rabbit females across the reproductive cycle, which was termed "nipple-search pheromone" (Hudson & Distel, 1983, 1984; reviews in Hudson & Distel, 1995; Hudson et al., 2008), and to which pups respond postnatally without prior experience (Hudson, 1985). These odor cues are known to depend on females' hormonal state. Thus, rabbit pups do not attach to nipples on anestrous females, they attach more frequently on estrus females (rise in estrogen levels), more frequently still on pregnant females (rise in progesterone levels), reach a maximum on early lactating females (rise in prolactin levels), and less frequently on late lactating females (decline in prolactin levels accompanying weaning; Hudson & Distel, 1984, 1990). This pattern can be readily simulated in ovariectomized female rabbits by the sequential administration of estradiol, progesterone and prolactin (González-Mariscal et al., 1994; Hudson & Distel, 1984; Hudson et al., 1990; reviews in Hudson & Distel, 1995; Hudson et al., 2008).

A similar pattern of hormonal secretion across the reproductive cycle in the female cat makes it likely that here also the emission of cues stimulating inborn search behavior and facilitating nipple attachment is under hormonal control. In the cat, estrus is also accompanied by a rise in blood-borne estrogen, pregnancy by a rise in progesterone and prolactin, early lactation by a further rise in prolactin followed by a decline as females wean their young (Banks, Paape, & Stabenfeldt, 1983; Schmidt, Chakraborty, & Wildt, 1983). However, analogous to the experiments in rabbits, the response of kittens to non-reproducing females needs to now be tested before and after treating such females with these candidate hormones.

In addition to inborn responses, each kitten learns during the first two to three postnatal days to identify and suckle from a particular nipple or pair of nipples, apparently using learned olfactory cues (Ewer, 1959, 1961; Hudson et al., 2009; Rosenblatt, 1971, 1972, 1983). Evidence for olfactory guidance comes from the failure in the present study of kittens of all ages when tested on unfamiliar lactating females to attach to nipples corresponding in position to their primary nipples on their own mother above chance. This suggests that kittens make little use of topographical cues to locate their particular nipples and even several days after eye opening, when, however, visual function is still limited (Villablanca & Olmstead, 1979; Wilkinson & Dodwell, 1980). Furthermore, the similarity in kittens' ability to locate their particular nipples whether tested together or singly suggests that this does not depend on the presence of littermates. Thus, although we still lack direct evidence that kittens identify their particular nipples using olfactory cues, it is presently difficult to imagine another possibility,

at least under natural conditions on the mother (but see Rosenblatt, 1971, 1972, 1983 for kittens' ability to distinguish between milk outlets on a brooder using a combination of topographical and experimentally devised tactile cues). It is also difficult to imagine what the origin of such cues might be other than the kittens' own saliva, although this still needs to be tested.

It was also notable that kittens responded more strongly to their own mother than to another female of similar lactational age: they attached to nipples more often (Fig. 1), they had lower attachment latencies (Fig. 3), and once attached they more frequently adopted body postures suggesting high arousal (Fig. 4). While this could have been due to kittens' recognition of and response to their primary nipples, it is also possible that they learned odors, even prenatally, more generally characteristic of their mother which aroused them, stimulated them to search, and facilitated location of their particular nipples (Freeman & Rosenblatt, 1978 for learning of maternal and litter odors guiding orientation by kittens to the nest; cf. Altbäcker, Hudson, & Bilkó, 1995; Bilkó, Altbäcker, & Hudson, 1994; Coureaud, Schaal, Hudson, Orgeur, & Coudert, 2002; Semke, Distel, & Hudson, 1995 for learning of maternal odors by newborn rabbits, including prenatally, associated with the mother's diet). Again, this needs to be tested.

However, the role of olfactory cues in facilitating nipple attachment in kittens as argued above does not exclude the possibly equally important participation of other sensory modalities. Evidence that this is indeed the case comes from reports that in kittens perioral anesthesia results in disruption of nipple attachment (Blass et al., 1988; Larson & Stein 1984), and from our finding that while pheromonal cues are essential for nipple attachment in newborn rabbits, the removal of somatosensory input following denervation of the muzzle completely eliminates pups' ability to accomplish this (Distel & Hudson, 1985).

In conclusion, there seems little doubt that kittens use olfactory cues to search for and attach to nipples. Furthermore, the similarities between species as taxonomically different as rabbits and cats, and with very different nursing regimens (once a day vs. several times a day, respectively) in the use of inborn olfactory cues to locate nipples and in the ability to rapidly learn odors in the suckling context (Allingham, Brennan, Distel, & Hudson, 1999; Hudson, 1985; Hudson & Distel, 1987; Hudson, Labra-Cardero, & Mendoza-Soylovna, 2002; Kindermann, Gervais, & Hudson, 1991; Kindermann, Hudson, & Distel, 1994) suggests that such mechanisms might be common to many mammals, including humans (Macfarlane, 1975; reviewed in Schaal, Schaal, Coureaud, Doucet, Delaunay-EL Allam, Moncomble, Montigny, Patris, & Holley, 2009).

NOTES

Financial support was provided by CONACyT (48692-Q), DGAPA (IN229907), and to G.R. by the Postdoctoral Fellowship Program of the Universidad Nacional Autónoma de México. G.R. also received a generous travel award from the International Society for Developmental Psychobiology to present part of this work at the 2008 annual meeting in Washington. We thank Carolina Rojas for excellent technical and bibliographical assistance and Hans Distel for statistical advice and many discussions. We also thank neighbors, and particularly Martha Rosa and Jorge Avelino Dahdá Faour, for tolerating the presence of the cats in their gardens, and for helping care for them.

REFERENCES

- Allingham, K., Brennan, P. A., Distel, H., & Hudson, R. (1999). Expression of c-Fos in the main and olfactory bulb of neonatal rabbits in response to garlic as a novel and conditioned odour. *Behavioural Brain Research*, 104, 157–167.
- Altbäcker, V., Hudson, R., & Bilkó, Á. (1995). Rabbit mothers' diet influences pups' later food choice. *Ethology*, 99, 107–116.
- Banks, D. R., Paape, S. R., & Stabenfeldt, G. H. (1985). Prolactin in the cat. I. Pseudopregnancy, pregnancy and lactation. *Biology of Reproduction*, 28, 923–932.
- Bilkó, Á., Altbäcker, V., & Hudson, R. (1994). Transmission of food preference in the rabbit. The means of information transfer. *Physiology and Behavior*, 56, 907–912.
- Blass, E. M., Shuleikina-Turpaeva, K., & Lushekin, V. (1988). Sensory determinants of nipple-attachment behavior in 2-4-day-old kittens. *Developmental Psychobiology*, 21, 365–370.
- Blass, E. M., Teicher, M. H., Cramer, C. P., Bruno, J. P., & Hall, W. G. (1977). Olfactory, thermal, and tactile controls of suckling in preauditory and previsual rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 91, 1248–1260.
- Coureaud, G., Schaal, B., Hudson, R., Orgeur, P., & Coudert, P. (2002). Transnatal olfactory continuity in the rabbit: Behavioral evidence and short-term consequences of its disruption. *Developmental Psychobiology*, 40, 372–390.
- Distel, H., & Hudson, R. (1985). The contribution of the olfactory and tactile modalities to the nipple-search behaviour of newborn rabbits. *Journal of Comparative Physiology A*, 157, 599–605.
- Ewer, R. F. (1959). Suckling behaviour in kittens. *Behaviour*, 15, 146–162.
- Ewer, R. F. (1961). Further observations on suckling behaviour in kittens, together with some general considerations of the interrelations of innate and acquired responses. *Behaviour*, 17, 247–260.
- Fox, M. W. (1970). Reflex development and behavioral organization. In: W. A. Himwich (Ed.), *Developmental neurobiology* (pp. 553–580). Illinois: C.C. Thomas.

- Freeman, N. C. G., & Rosenblatt, J. S. (1978). Specificity of litter odors in the control of home orientation among kittens. *Developmental Psychobiology*, 11, 459–468.
- González-Mariscal, G., Chirino, R., & Hudson, R. (1994). Prolactin stimulates emission of nipple pheromone in ovariectomized New Zealand white rabbits. *Biology of Reproduction*, 50, 373–376.
- Hudson, R. (1985). Do newborn rabbits learn the odor stimuli releasing nipple-search behavior? *Developmental Psychobiology*, 18, 575–585.
- Hudson, R., & Distel, H. (1983). Nipple location by newborn rabbits. Behavioural evidence for pheromonal guidance. *Behaviour*, 85, 260–275.
- Hudson, R., & Distel, H. (1984). Nipple-search pheromone in rabbits: Dependence on season and reproductive state. *Journal of Comparative Physiology A*, 155, 13–17.
- Hudson, R., & Distel, H. (1987). Regional autonomy in the processing of odor signals in newborn rabbits. *Brain Research*, 421, 85–94.
- Hudson, R., & Distel, H. (1990). Sensitivity of female rabbits to changes in photoperiod as measured by pheromone emission. *Journal of Comparative Physiology A*, 197, 225–230.
- Hudson, R., & Distel, H. (1995). On the nature and action of the rabbit nipple-search pheromone: A review. In: R. Apfelbach, & D. Müller-Schwarze (Eds.), *Chemical signals in vertebrates VII* (pp. 223–232). Oxford: Elsevier Science.
- Hudson, R., González-Mariscal, G., & Beyer, C. (1990). Chin marking behavior, sexual receptivity, and pheromone emission in steroid-treated, ovariectomized rabbits. *Hormones and Behavior*, 24, 1–13.
- Hudson, R., Labra-Cardero, D., & Mendoza-Soylovna, A. (2002). Sucking, not milk, is important for the rapid learning of nipple-search odors in the newborn rabbit. *Developmental Psychobiology*, 41, 226–235.
- Hudson, R., Rojas, C., Arteaga, L., Martínez-Gómez, M., & Distel, H. (2008). Rabbit nipple-search pheromone versus rabbit mammary pheromone revisited. In: J. L. Hurst, R. J. Benyon, S. C. Roberts, & T. D. Wyatt (Eds.), *Chemical signals in vertebrates II* (pp. 315–324). New York: Springer Verlag.
- Hudson, R., Raihani, G., González, D., Bautista, A., & Distel, H. (2009). Nipple preference and contests in suckling kittens of the domestic cat are unrelated to presumed nipple quality. *Developmental Psychobiology*, 51, 322–332.
- Kindermann, U., Gervais, R., & Hudson, R. (1991). Rapid odor conditioning in newborn rabbits: Amnesic effects of hypothermia. *Physiology and Behavior*, 50, 457–460.
- Kindermann, U., Hudson, R., & Distel, H. (1994). Learning of suckling odors by newborn rabbits declines with age and suckling experience. *Developmental Psychobiology*, 27, 111–122.
- Kovach, J. K., & Kling, A. (1967). Mechanisms of neonate sucking behaviour in the kitten. *Animal Behaviour*, 15, 91–101.
- Larson, M. A., & Stein, B. E. (1984). The use of tactile and olfactory cues in neonatal orientation and localization of the nipple. *Developmental Psychobiology*, 17, 423–436.
- Macfarlane, A. J. (1975). Olfaction in the development of social preferences in the human neonate. *Ciba Foundation Symposium*, 33, 103–113.
- McClelland, R. J., & Cowley, J. J. (1982). The effect of lesions of the olfactory bulbs on the growth and behavior of mice. *Physiology and Behavior*, 9, 319–324.
- Mermet, N., Coureaud, G., McGrane, S., & Schaal, B. (2008). Odour-guided social behaviour in newborn and young cats: An analytical survey. *Chemoecology*, 17, 187–199.
- Precht, H. F. R. (1952). Angeborene Bewegungsweisen junger Katzen. *Experientia*, 8, 220–221.
- Rosenblatt, J. S. (1962). Development of suckling and related behavior in neonate kittens. In: E. L. Bliss (Ed.), *Roots of behavior: Genetics, instinct and socialization in animal behavior* (pp. 198–210). New York: Harper.
- Rosenblatt, J. S. (1971). Suckling and home orientation in the kitten: A comparative developmental study. In: E. Tobach, L. R. Aronson, & E. Shaw (Eds.), *Biopsychology of development* (pp. 345–410). New York: Academic Press.
- Rosenblatt, J. S. (1972). Learning in newborn kittens. *Scientific American*, 227, 18–25.
- Rosenblatt, J. S. (1983). Olfaction mediates developmental transition in the altricial newborn of selected species of mammals. *Developmental Psychobiology*, 16, 347–375.
- Schaal, B., Coureaud, G., Doucet, S., Delaunay-Ell Allam, M., Moncomble, A.-S., Montigny, D., Patris, B., & Holley, A. (2009). Mammary olfactory signalisation in females and odor processing in neonates: Ways evolved by rabbits and humans. *Behavioural Brain Research*, 200, 346–358.
- Schmidt, P. M., Chakraborty, P. K., & Wildt, D. E. (1983). Ovarian activity, circulating hormones and sexual behavior in the cat. II. Relationships during pregnancy, parturition, lactation and postpartum estrus. *Biology of Reproduction*, 28, 657–671.
- Schuleikina-Turpaeva, K. V. (1986). Sensory organization of alimentary behavior in the kitten. In: J. S. Rosenblatt, M. C. Busnel, & R. A. Hinde (Eds.), *Advances in the study of behavior* (Vol. 16, pp. 1–37). New York: Academic Press.
- Semke, E., Distel, H., & Hudson, R. (1995). Specific enhancement of olfactory receptor sensitivity associated with foetal learning of food odors in the rabbit. *Naturwissenschaften*, 82, 148–149.
- Singh, P. J., Tucker, M., & Hofer, M. (1976). Effects of nasal ZnSO₄ irrigation and olfactory bulbectomy on rat pups. *Physiology and Behavior*, 17, 373–383.
- Villablanca, J. R., & Olmstead, C. E. (1979). Neurological development of kittens. *Developmental Psychobiology*, 12, 101–127.
- Wilkinson, F., & Dodwell, P. C. (1980). Young kittens can learn complex visual pattern discriminations. *Nature*, 284, 258–259.