



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Tolerancia social en hembras gestantes y no gestantes del ratón de las rocas (*Peromyscus difficilis*) y su relación con los niveles de testosterona

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Luis Enrique Osorio Cordero

Co-directoras

Dra. María Luisa Rodríguez Martínez
Dra. Bibiana Carolina Montoya Loaiza

Tlaxcala, Tlax.

Diciembre, 2020



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Tolerancia social en hembras gestantes y no gestantes del ratón de las rocas (*Peromyscus difficilis*) y su relación con los niveles de testosterona

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Luis Enrique Osorio Cordero

Comité Tutorial

Dra. María Luisa Rodríguez Martínez
Dra. Bibiana Carolina Montoya Loaiza
Dr. Eduardo Felipe Aguilera Miller
Dra. Leticia Nicolás Toledo

El presente trabajo se desarrolló en las instalaciones de la Estación Científica La Malinche y del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta. Se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Beca 925640) y el apoyo de la Maestría en Ciencias Biológicas, la cual se encuentra registrada en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNCP).

COORDINACIÓN POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Luis Enrique Osorio Cordero** realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es: “Tolerancia social en hembras gestantes y no gestantes del ratón de las rocas (*Peromyscus difficilis*) y su relación con los niveles de testosterona”.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., DICIEMBRE 01 DE 2020



DRA. LETICIA NICOLÁS TOLEDO



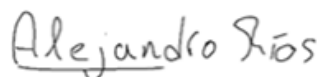
DRA. MARIA LUISA RODRIGUEZ MARTÍNEZ



DR. EDUARDO FELIPE AGUILERA MILLER



DR. JORGE VÁZQUEZ PÉREZ



DR. ALEJANDRO ARIEL RÍOS CHELÉN

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, al Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta y la Estación Científica La Malinche.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Beca 925640).

A mis codirectoras, la Dra. Bibiana Carolina Montoya Loaiza y la Dra. María Luisa Rodríguez Martínez.

A mis tutores, el Dr. Eduardo Felipe Aguilera Miller y la Dra. Leticia Nicolás Toledo.

Al grupo de trabajo de los silvestres.

A todos los que de alguna forma brindaron su apoyo para que este trabajo pudiera llevarse a cabo (Profesores del posgrado, alumnos de servicio social y de prácticas profesionales).

Resumen

La tolerancia social es un factor determinante en la estructura social de los grupos animales. Específicamente, la tolerancia social femenina ha sido poco estudiada y la evidencia resultante se encuentra restringida a estudios farmacológicos y de grupos taxonómicos particulares donde las hembras suelen ser poco tolerantes. La evidencia señala que la variación de esta conducta podría estar relacionada con los niveles de testosterona. Para el grupo de los roedores, los niveles más bajos de tolerancia social coinciden con la gestación, etapa en la que también se reportan los niveles más altos de testosterona. En este trabajo se buscó realizar una aproximación integrativa de la tolerancia social femenina, al comparar el comportamiento social entre hembras gestantes y no gestantes y ver si se relaciona con sus niveles de testosterona. Aunque la tendencia es clara en los grupos mencionados, la evidencia disponible para especies más sociables es contradictoria. Por esta razón, se utilizó como modelo de estudio hembras silvestres de *Peromyscus difficilis*, una especie con alta tolerancia social que hace parte de un grupo de especies muy poco estudiadas bajo este paradigma. La hipótesis que se evaluó fue que las hembras gestantes, al tener niveles más altos de testosterona, presentarían menor tolerancia social que las hembras no gestantes. Para poner a prueba esta idea, se capturaron hembras del ratón *P. difficilis* en tres sitios del volcán La Malinche. Se realizaron confrontaciones diádicas en arenas neutrales y se tomaron muestras de excretas fecales para medir niveles de testosterona. Se encontró que el nivel de tolerancia social no difiere de forma significativa entre las hembras gestantes y las no gestantes y tampoco se relacionan con los niveles de testosterona. En conclusión, las hembras de *P. difficilis* son altamente tolerantes hacia sus conespecíficas y esta tolerancia no se ve afectada por la gestación ni se encuentra relacionada con sus niveles de testosterona.

INDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Tolerancia social en hembras	4
2.2 Tolerancia social femenina y testosterona.....	5
3. JUSTIFICACIÓN.....	8
4. HIPÓTESIS	9
4.1 Predicciones	9
5. OBJETIVOS.....	9
5.1 General.....	9
5.2 Específicos.....	9
6. METODOLOGÍA.....	10
6.1 Sitio de estudio.....	10
6.2 Especie de estudio	11
6.3 Captura y manipulación hembras de <i>P. difficilis</i>	11
6.4 Descripción de la actividad reproductiva de las hembras de <i>P. difficilis</i>	12
6.5 Registro de la conducta agresiva en hembras de <i>P. difficilis</i>	13
6.6 Registro de la conducta afiliativa en hembras de <i>P. difficilis</i>	14
6.7 Elaboración del Etograma de las hembras de <i>P. difficilis</i>	15
6.8 Colecta de heces fecales para la medición de testosterona en hembras	16
6.9 Extracción de la hormona testosterona	16
6.10 ELISA competitivo.....	17
6.11 Análisis estadísticos.....	18
7. RESULTADOS	19
7.1 Actividad reproductiva de las hembras de <i>P. difficilis</i>	19
7.2 Descripción de la conducta agresiva y afiliativa en las hembras de <i>P. difficilis</i>	19
7.3 Comparación de la conducta agresiva entre los grupos HG:HNG, HNG:HG y HNG:HNG	22
7.4 Comparación de las conductas afiliativas entre los grupos HG:HNG, HNG:HG y HNG:HNG	23
7.5 Niveles de testosterona de las hembras de <i>P. difficilis</i> gestantes y no gestantes	28
7.6 Relación entre el comportamiento agresivo y los niveles de testosterona de las hembras de <i>P. difficilis</i>	29

7.7 Relación entre el comportamiento afiliativo y los niveles de testosterona de las hembras de <i>P. difficilis</i>	30
8. DISCUSIÓN	33
8.1 Actividad reproductiva de las hembras	33
8.2 Descripción del comportamiento social intrasexual de las hembras	34
8.3 Comportamiento agresivo en hembras gestantes y no gestantes	35
8.4 Comportamiento afiliativo en hembras gestantes y no gestantes.	35
8.5 Relación entre los niveles de testosterona y la tolerancia social de las hembras gestantes y no gestantes	36
9. CONCLUSIONES	39
10. PERSPECTIVAS	40
11. REFERENCIAS	41

1. INTRODUCCIÓN

El nivel de tolerancia en las interacciones intraespecíficas es un elemento central de la organización social de una especie (Melis y cols. 2006). La variación en la tolerancia social puede influir en diversos parámetros relevantes para la supervivencia de los organismos (De Waal y Luttrell 1989). Los niveles de tolerancia social suelen ser variables dentro de estas relaciones y pueden verse reflejados en patrones de afiliación y agresión entre los individuos de una población (Ciani y cols. 2012; Fichtel y cols. 2017). Tanto los comportamientos afiliativos como los agresivos tienen relación con el estatus social y la supervivencia de los individuos (Soria y cols. 2008) y pueden influir en la intensidad y la selectividad de cooperación que hay entre los conespecíficos (Melis y cols. 2006; Range y cols. 2015), así como la competencia por acceso a recursos limitados y el aprendizaje de nuevas conductas (Fichtel y cols. 2017).

Los niveles altos de tolerancia favorecen la cooperación entre los individuos en diversas actividades grupales (Range y cols. 2015). Mientras que, los niveles bajos de tolerancia conducen a la agresión, favorecen la segregación espacial de los individuos (Gipps 1984), permiten el acceso a recursos de mayor calidad y se relacionan con un mayor éxito reproductivo (Raleigh y McGuire 1989). Entre los mamíferos, la variación en los niveles de tolerancia tiene consecuencias importantes sobre la dinámica poblacional (Gipps 1984; Heske y cols. 1988). Por ejemplo, en roedores, el nivel de tolerancia exhibido es un factor determinante en la organización social y la segregación espacial de los grupos (Gipps 1984), teniendo un impacto directo sobre el reclutamiento de nuevos individuos en las poblaciones (Halpin 1981).

Debido a que la expresión de la agresión en las interacciones sociales intraespecíficas ha sido asociada con la protección del territorio y recursos, cómo alimento, espacio y hembras, por mucho tiempo ha sido descrita como un rasgo funcional exclusivo de los machos (French y cols. 2013). Esto ha llevado a un escaso estudio de las interacciones sociales agresivas entre hembras. Sin embargo, actualmente se conoce que además de las relaciones afiliativas, las hembras pueden tener un papel de amplia importancia en las interacciones agresivas en contextos asociados con la defensa del territorio, recursos alimenticios, parejas sexuales o las crías (Stockley y Bro-Jorgensen 2011).

La tolerancia social en las interacciones hembra-hembra ha sido estudiada en el contexto de la competencia intra-sexual, en donde se ha visto que varía en función de la

abundancia de recursos, así como de la disponibilidad y calidad de los machos (Rosvall 2011; Rosvall 2013). Específicamente, en roedores, se ha reportado que los niveles de tolerancia social en hembras suelen variar estacionalmente con el estado reproductivo (Courtalon y cols. 2003). Esto se evidencia dentro de algunas especies de ratones silvestres donde las hembras, a pesar de mostrar niveles altos de tolerancia en la mayoría de las situaciones, durante los días cercanos y posteriores al parto atacan a sus conespecíficas (Palanza y cols. 2005). Durante la etapa de gestación de algunas hembras de roedores, la tolerancia social es muy baja, y las interacciones pueden ser tan agresivas que llegan a comprometer la supervivencia de los actores involucrados (Wolff 2008). Esto resulta relevante en la regulación del crecimiento poblacional, ya que se sabe que, en hembras, un aumento en la agresión durante la etapa reproductiva favorece la protección de las crías y evita el infanticidio (Palanza y cols. 1996).

A pesar de que existe evidencia sobre la ocurrencia de variación en la tolerancia social de las hembras relacionada con el estado reproductivo, hay poca información sobre los posibles mecanismos fisiológicos que le subyacen (Rosvall 2013). En machos de roedores, está bien establecido que la testosterona y sus metabolitos son mediadores inmediatos de la tolerancia social, pero recientemente se ha presentado un creciente interés en evaluar si existe también esta relación en hembras (Adkins-Regan 2005; Hau 2007). En primer lugar, porque la mayoría de la evidencia sobre los picos de agresión femenina en mamíferos corresponde a la etapa de la gestación y lactancia, lo cual coincide con los picos de testosterona reportados (Wolff y Peterson 1998; Rodel y cols. 2008). En segundo lugar, porque diversos trabajos experimentales han encontrado una relación negativa entre la administración de testosterona exógena en hembras y la tolerancia social expresada (Edwards 1969; Albert y cols. 1993).

Fisiológicamente esto tiene sentido, pues las hembras producen naturalmente testosterona en las gónadas, el cerebro y las glándulas suprarrenales y en diversas especies es la hormona circulante que presenta niveles más altos durante la etapa reproductiva (Staub y DeBeer 1997; Ketterson y cols. 2005). Aunado a esto, ambos sexos expresan receptores de andrógenos en una serie de tejidos neurales y periféricos, así como, respuestas comportamentales y fisiológicas ante la administración exógena de testosterona (Ketterson y cols. 2005). Además, la exposición a niveles elevados de testosterona a menudo

masculiniza el comportamiento de las hembras, disminuyendo el nivel de tolerancia en algunas especies de vertebrados (Rosvall 2013).

Se sabe que la testosterona afecta el comportamiento a través de una cascada de procesos fisiológicos relacionados entre sí, como lo es la variación de su producción (Rosvall 2013). La principal fuente de testosterona en circulación es la gónada, y la producción gonadal de testosterona está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, que se activa por estímulos externos (organización social, duración del día, dieta o la presencia de una pareja) (Wingfield y cols. 2001). La hormona liberadora de gonadotropina se libera del hipotálamo y actúa sobre la pituitaria para liberar gonadotropinas, incluida la hormona luteinizante. La hormona luteinizante se une a sus receptores en la gónada para estimular la biosíntesis de esteroides y la liberación de testosterona (Rosvall 2013). Muchos de los efectos conductuales de la testosterona son generados por el estradiol después de la conversión local a través de la aromatasa (Ball y Balthazart 2008). Los individuos también pueden diferir en la sensibilidad del tejido diana o en el metabolismo de las hormonas, debido a la variación en la ubicación o la abundancia de receptores nucleares, enzimas involucradas en la síntesis o metabolismo de esteroides locales (Rosvall 2013).

Aunque los andrógenos podrían modular el comportamiento de las hembras de manera similar a lo que se ha observado en machos de este taxón, la evidencia al respecto es muy escasa (Ross y French 2011). Aunado a esto, las pruebas de tolerancia social suelen realizarse principalmente en poblaciones semi-libres o cautivas, por lo que el conocimiento sobre los mecanismos fisiológicos vinculados a la tolerancia social en condiciones naturales es aún menor (Fichtel y cols. 2017).

2. ANTECEDENTES

2.1 Tolerancia social en hembras

La principal función asociada a los comportamientos agresivos y afiliativos en las hembras es el acceso preferencial a los recursos reproductivos (Raleigh y McGuire 1989) y alimenticios (Fichtel y cols. 2017).

En hembras existe evidencia sobre diversas fuentes de variación en la tolerancia social. En especies de ratones heterómidos, como es el caso de *Chaetodipus siccus*, las hembras presentan aumentos de agresión durante el establecimiento de jerarquías de dominancia y subordinación (Aguilera-Miller y cols. 2018). En el caso del ratón de California *Peromyscus californicus*, el nivel de tolerancia social de las hembras es similar al de los machos; sin embargo, durante los días cortos similares a los de invierno, ellas exhiben mayores niveles de agresión (Silva y cols. 2010). De forma similar, en las hembras del hámster dorado *Mesocricetus auratus*, los niveles de tolerancia social van disminuyendo con la edad resultando en que las hembras maduras pueden llegar a ser más agresivas que los machos de su misma edad (Taravosh y Delville 2004).

Por otra parte, aunque la evidencia enumera múltiples fuentes de variación en la tolerancia que presentan las hembras, la mayor parte de los estudios sugieren que es durante la gestación y la lactancia cuando las hembras son menos tolerantes hacia sus conespecíficas (Rodel y cols. 2008). Esto se ha observado dentro de algunas poblaciones silvestres del múrido *Mus musculus*, en los que la tolerancia suele variar conforme a la densidad poblacional y a la actividad reproductiva. Particularmente, se observa que las hembras se vuelven menos tolerantes durante la reproducción, aumentando el despliegue de comportamientos agresivos hacia los conespecíficos intrusos (Chovnik y cols. 1987). También, para esta especie se ha reportado que las hembras juveniles presentan niveles altos de tolerancia social, pero una vez que se aparean por primera vez, la tolerancia disminuye aumentando el número de eventos agresivos y la intensidad de estos (Palanza y cols. 2005). En esta misma línea de evidencia, en las hembras gestantes de *Mus musculus*, *Peromyscus maniculatus gambelii*, y *Peromyscus californicus parasiticus* se ha descrito una disminución en la tolerancia hacia sus conespecíficos extraños a medida que se acerca el parto. Justo antes de presentarse el parto, la tolerancia social es tan baja que las hembras con frecuencia excluyen a la pareja del nido (Eisenberg 1962; Crowcroft y Rowe 1963).

2.2 Tolerancia social femenina y testosterona

La respuesta social de los individuos se puede entender como un repertorio de comportamientos estrechamente relacionados entre sí, regulados por las hormonas, moldeados por el desarrollo y la experiencia y modulados de manera aguda por las señales ambientales y el entorno (Newman 1999). En los vertebrados, los niveles de hormonas circulantes son considerados como unas de las principales causas próximas de diferentes comportamientos como los sexuales, de crianza, de afiliación y agresión (Manning 1981). En diversas especies de mamíferos se ha comprobado que las conductas agresivas se relacionan positivamente con los niveles circulantes de testosterona (von Engelhardt y cols. 2000).

Varios trabajos abordan el estudio de la tolerancia social en hembras de distintas especies de roedores y la forma en que estos patrones conductuales se relacionan con la testosterona. Para poner a prueba esta relación se han realizado diferentes trabajos farmacológicos, como el realizado con las ratas marrones *Rattus norvegicus*, donde se encontró que en las hembras que expresaban comportamientos agresivos, se vio aumentada su agresividad al ser tratadas con testosterona (Albert y cols. 1993). Lo mismo se ha observado al trabajar con hembras de la cepa Swiss Webster, mostrando que la tolerancia social era significativamente más baja en aquellas hembras que habían sido tratadas con testosterona en comparación con las hembras a las que no se les administró testosterona (Pinna y cols. 2005).

Fuera de los estudios farmacológicos, muchos trabajos se han centrado en el análisis de especies con sistemas de organización social particulares. Por ejemplo, la rata topo desnuda *Heterocephalus glaber*, una especie eusocial que vive en colonias divididas por castas, donde la reina tiene el mayor rango social. Cuando la reina muere, las hembras de mayor jerarquía social compiten por el puesto de reina, aumentando el nivel de agresión a la vez que aumentan sus niveles de testosterona (Clarke y Faulkes 1997). También se encuentra el caso del Damán de El Cabo *Procavia capensis*, una de las pocas especies de mamíferos en las que se han registrado hembras con niveles de testosterona que llegan a ser superiores a los de los machos. En esta especie se han analizado las interacciones sociales de los individuos, encontrando un menor nivel de tolerancia entre las hembras que entre los machos (Koren y cols. 2006).

Finalmente, la mayor parte de la evidencia sobre variación en los niveles de tolerancia social en hembras de mamíferos se centra en especies atípicas (aquellas especies donde las hembras son igual o más agresivas que los machos), donde las hembras suelen ser conductualmente dominantes sobre los machos (French y cols. 2013). Es el caso de los titíes de orejas copetudas negras *Callithrix kuhlii*, donde aquellas hembras que presentaron mayores niveles de agresión durante encuentros de intruso-residente, mostraron también un incremento en los niveles de testosterona. En contraste, las hembras más tolerantes no tuvieron un incremento hormonal (Ross y French 2011). Otro ejemplo se encuentra en los lémures de cola anillada *Lemur catta*, donde las hembras presentan un aumento del doble en sus niveles de testosterona fecal durante la temporada reproductiva, al tiempo que la tolerancia hacia sus conespecíficos disminuye en la misma proporción (von Engelhardt y cols. 2000).

En muchas especies reproductoras estacionales (aquellas donde la reproducción es regulada por el ambiente, generando crías durante la temporada más óptima), se ha observado que el aumento de los niveles de testosterona sincroniza el incremento en los niveles de agresión territorial con el comportamiento de apareamiento (Wingfield y cols. 2001). En las hembras, la evidencia señala que la testosterona aumenta con el inicio de la reproducción (Ketterson y cols. 2005). Esto sugiere que la relación conducta-testosterona podría esperarse en etapas donde las hembras presentan los niveles más altos de testosterona, como es el caso de la gestación, donde las hembras de diversas especies de roedores presentan sus niveles más altos de testosterona, como es el caso de los ratones domésticos (deCatanzaro y cols. 2004) y los ratones rayados del desierto (Carsten 2008). Considerando también que esta etapa coincide con los picos de menor tolerancia registrados en las hembras de ratones domésticos (Chovnik y cols. 1987; Palanza y cols. 2005) y otros mamíferos (Beehner y cols. 2005; French y cols. 2013).

Dentro del grupo de los roedores, las hembras de especies socialmente más tolerantes son las que menos se han investigado, como es el caso de *Peromyscus difficilis*. Esta es una especie gregaria (Fernández y cols. 2010) con alta tolerancia social (Huerta 2018). Sin embargo, anteriormente se ha reportado que las hembras de esta especie tienden a hacer un uso diferencial del espacio influenciado por la actividad reproductiva. Las hembras suelen movilizarse menos durante la temporada reproductiva en comparación con la temporada no reproductiva, además existe una mayor segregación espacial en las hembras gestantes en

comparación con las hembras no reproductivas (De-la-Cruz y cols. 2019). Considerando que la distribución espacial entre individuos es un indicador del nivel de tolerancia social entre los organismos (Gipps 1984), el cambio registrado en las hembras de esta especie durante la temporada reproductiva puede ser evidencia de una disminución en la tolerancia social. Esto vuelve a las hembras del ratón de las rocas una especie de interés para evaluar si el cambio en los patrones de tolerancia reportados en hembras de otras especies de roedores puede manifestarse también en hembras de especies socialmente tolerantes, y de ser así, si la variación en este comportamiento también se encuentra relacionada con una modificación en los niveles de testosterona. Por lo tanto, el presente estudio estuvo dirigido a responder la pregunta ¿cómo se relaciona la tolerancia social de las hembras de *Peromyscus difficilis* hacia sus conespecíficas con sus niveles de testosterona dentro y fuera de la gestación?

3. JUSTIFICACIÓN

Recientes investigaciones se han enfocado en el estudio de la tolerancia social en las hembras, particularmente en la agresión intrasexual. Aunque algunos estudios sugieren que la testosterona podría estar positivamente relacionada con el despliegue de esta conducta en las hembras, la evidencia al respecto es escasa. El presente trabajo busca aproximarse de manera integrativa al estudio de la tolerancia social femenina, analizando en conjunto el impacto que la gestación tiene en el nivel de tolerancia social y el papel que juega la testosterona en la regulación de estos patrones conductuales durante dicha etapa en individuos silvestres. Este trabajo nos permitirá conocer si existe una menor tolerancia dentro de las relaciones hembra-hembra durante la gestación y en caso de existir, nos permitirá saber si esta disminución en la tolerancia se relaciona con un aumento en los niveles de testosterona durante la gestación. Los resultados ayudarán a conocer si la testosterona puede tener un papel como mecanismo próximo que subyace a la variación en el comportamiento social de las hembras en especies que presentan alta tolerancia social.

4. HIPÓTESIS

Las hembras gestantes, al mantener niveles más altos de testosterona, presentarán menor tolerancia social que las hembras no gestantes.

4.1 Predicciones

- La duración de los comportamientos afiliativos será menor en las hembras gestantes en comparación a las hembras no gestantes.
- La frecuencia de los comportamientos agresivos será mayor en las hembras gestantes en comparación a las hembras no gestantes.
- La frecuencia de ataques del grupo de hembras gestantes estará positivamente relacionada con sus niveles de testosterona.
- La duración de las conductas afiliativas del grupo de las hembras gestantes estará negativamente relacionada con sus niveles de testosterona.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Determinar si el nivel de tolerancia social de las hembras de *Peromyscus difficilis* está relacionado con sus niveles de testosterona durante la gestación.

5.2 Específicos

1. Describir la actividad reproductiva de las hembras de *P. difficilis*
2. Elaborar el etograma de las hembras de *P. difficilis* en confrontaciones sociales intraespecíficas e intrasexuales.
3. Comparar las conductas afiliativas y agresivas de las hembras de *P. difficilis* de acuerdo a su estado reproductivo.
4. Determinar los niveles de testosterona de las hembras de *P. difficilis* de acuerdo a su estado reproductivo.
5. Determinar si existe una relación entre los niveles de testosterona y la tolerancia social intrasexual de las hembras de *P. difficilis*.

6. METODOLOGÍA

6.1 Sitio de estudio

La zona de estudio se localizó en el Volcán La Malinche, dentro de la zona correspondiente al área natural protegida con categoría de Parque Nacional, destinado a la protección y conservación de sus recursos naturales (Ruiz y Gómez 2010). La vegetación principal de los sitios de estudio está constituida por bosques de pino con géneros predominantes de *Pinus*, *Abies*, *Quercus* y *Alnus* (López y Acosta 2005). El clima es semifrío subhúmedo, con una temperatura anual que oscila entre los 4 y 12 °C y una precipitación media anual entre los 800 y 1000 mm, con 100 a 120 días de heladas moderadas a fuertes en invierno (Ruiz y Gómez 2010). Los muestreos se llevaron a cabo en tres sitios localizados en las coordenadas N: 19.23636, W: 97.97955, con una extensión aproximada de media hectárea cada uno y con una separación de aproximadamente 200 metros entre cada sitio (Figura 1). La separación entre sitios permitió evitar que las hembras capturadas en un sitio se encontraran familiarizadas con las de los otros sitios. Los sitios de muestreo fueron elegidos de forma no probabilística, por conveniencia, ya que el muestreo se concentró en las zonas donde se ha registrado la especie.

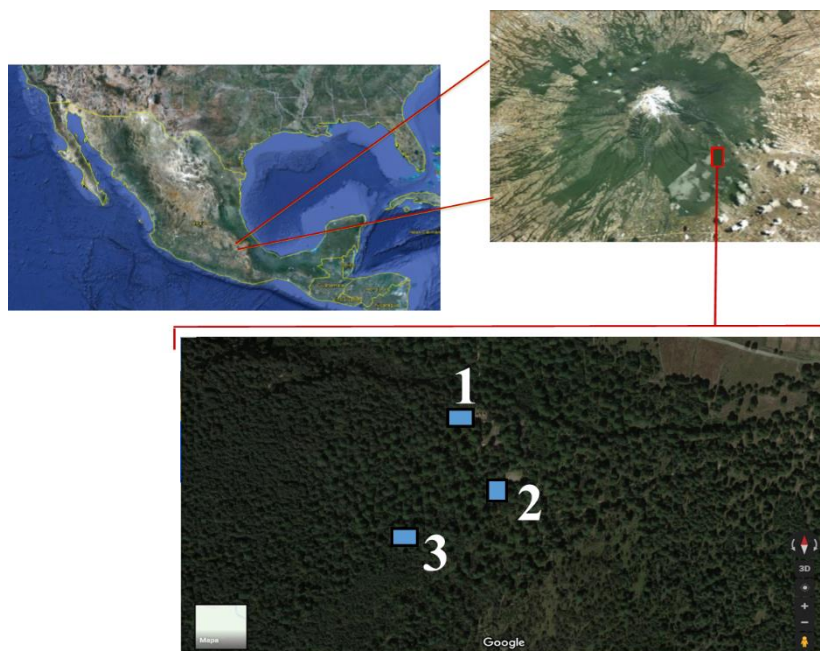


Figura 1. Sitios de muestreo. Se ubicaron dentro del Parque Nacional La Malinche, entre los 2800 y 2890 m.

6.2 Especie de estudio

El ratón de las rocas (*P.difficilis*) es una especie de tamaño grande dentro de su género, pesa de 28 a 43 gramos y tiene una cola más larga que el cuerpo, orejas grandes y hocico alargado. Su longitud total va de los 90 a los 125 mm. (Figura 2) (Fernández y cols. 2010). El ratón de las rocas se reproduce durante los meses más húmedos del año, de junio a diciembre (Galindo-Leal y Krebs 1997). Son ratones semiarborícolas y sus ámbitos hogareños se mantienen separados entre individuos, sobre todo en la temporada reproductiva. Su densidad poblacional alcanza un máximo de 13 individuos por hectárea (Fernandez y cols. 2010).



Figura 2. Individuos de *Peromyscus difficilis* capturados en el Parque Nacional La Malinche durante el periodo de muestreo.

6.3 Captura y manipulación de hembras de *P. difficilis*

Los muestreos se realizaron de agosto 2018 a octubre 2019 en los tres sitios previamente descritos. Para la captura de las hembras de *P. difficilis* se utilizaron trampas tipo Sherman mediante un proceso de captura-recaptura. Se colocaron 50 trampas en un emparillado de 10 x 10 metros, durante tres noches consecutivas cada semana (de viernes a domingo). Las trampas fueron cebadas con hojuelas de avena y se colocaron entre las 17:00 y 18:00 horas para ser revisadas a la mañana siguiente alrededor de las 07:00 horas.

Los individuos capturados fueron transportados al laboratorio de la Estación Científica La Malinche, donde se les registraron sus datos biométricos (mm) (medición de longitud de oreja, longitud de pata, longitud de cola vertebral, longitud del cuerpo) y el peso corporal (g) (Figura 3). Finalmente, cada hembra fue marcada mediante un patrón de perforaciones en las orejas para poder identificarlas en capturas posteriores. El marcaje fue continuo, así que a cada hembra se le asignó un número único, independiente del sitio en el que fue capturada.



Figura 3. Hembra de *Peromyscus difficilis* capturada para la toma de datos.

6.4 Descripción de la actividad reproductiva de las hembras de *P. difficilis*

La condición reproductiva de las hembras se determinó mediante sus características morfológicas asociadas a cada etapa específica de la reproducción.

Se clasificaron como:

- Hembras gestantes: Aquellas sin presencia de tapón vaginal, con abultamiento abdominal y en las que los fetos eran palpables (Figura 4a).
- Hembras no gestantes: Aquellas que presentaron tapón vaginal, que no presentaron abultamiento abdominal y/o en las que no se podían palpar los fetos (Figura 4b).
- Hembras lactantes: Aquellas sin presencia de tapón vaginal, que tuvieron pezones conspicuos y en las que no se palparon fetos.

El registro de la actividad reproductiva se obtuvo de forma porcentual y mensual, tomando en cuenta el número de hembras de cada categoría reproductiva con relación al total de hembras capturadas.

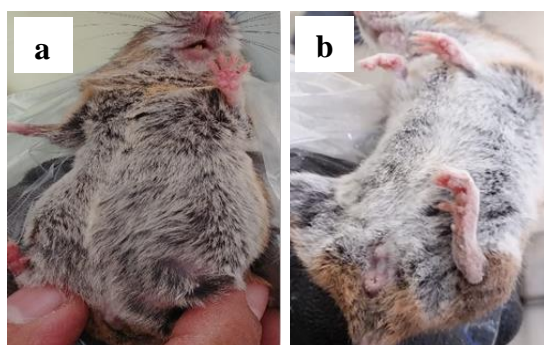


Figura 4. Hembras de *P. difficilis*: a) gestante, b) no gestante.

6.5 Registro de la conducta agresiva en hembras de *P. difficilis*

Para evaluar la conducta agresiva de las hembras se formaron diadas de HG:HNG (Hembra Gestante vs Hembra No Gestante) y HNG:HNG (Hembra No Gestante vs Hembra No Gestante). Aunque las diadas fueron asignadas en dos combinaciones, los grupos comparados fueron tres. La razón de esto es que, el comportamiento de las hembras no gestantes se analizó con relación al grupo con el que fueron confrontadas (Hembras gestantes y no gestantes), dando tres grupos a comparar: HG:HNG, HNG:HG y HNG:HNG. Esto se hizo con la finalidad de saber si la conducta de las hembras no gestantes podría diferir de acuerdo al estado reproductivo del contrincante. Sin embargo, esta medida no se pudo realizar con las hembras gestantes debido a su bajo número de capturas.

Las hembras asignadas a cada diada procedían de diferentes sitios de captura con el propósito de evitar la familiaridad entre oponentes. La conducta de las hembras siempre se registró durante la noche en un horario de 20:00 h. a 02:00 h. ya que esta es una especie de hábitos nocturnos. Las confrontaciones, se llevaron a cabo en dos arenas neutrales circulares de lámina acrílica de 50 cm de radio y 70 cm de alto, con una división removible y una cama de aserrín (Figura 5). Cabe mencionar que la cama de aserrín fue cambiada al final de cada enfrentamiento, esto con el propósito de mantener al mínimo la contaminación odorífera. Antes de empezar con las videograbaciones de la conducta de las hembras, éstas permanecieron dentro de la arena separadas por una placa de acrílico durante 10 minutos para su habituación. Después de este tiempo, se retiró la placa divisoria y se procedió a videograbar por 10 minutos las interacciones entre las hembras.

Las confrontaciones fueron videograbadas con un circuito cerrado de dos cámaras, utilizando el modo nocturno y en condiciones de completa oscuridad, para evitar interferir con la conducta de las hembras. Estas cámaras estuvieron instaladas a una altura de 1 metro sobre el suelo, donde la visión pudiera cubrir toda el área de la arena. El registro conductual se llevó a cabo dos veces a la semana (viernes y sábado, durante las salidas al campo), en un cuarto de registro conductual adaptado en la ECLM, con la finalidad de mantener a las hembras en un terreno neutral. Este método se implementó para mantener a las hembras en las mismas condiciones y evitar que factores, como la agresión territorial, influyeran en su comportamiento (Courtalon y cols. 2003; Shier y Randall 2007; Hernández 2018; Huerta 2018).



Figura 5. Arena circular de acrílico donde se realizaron las confrontaciones

6.6 Registro de la conducta afiliativa en hembras de *P. difficilis*

A partir de las videograbaciones obtenidas en campo con las diadas entre hembras se registró la conducta afiliativa. Para esto, se hicieron observaciones focales de cada una de las diadas arriba descritas. Estos comportamientos se registraron de la misma forma que los agresivos, mediante su frecuencia o duración, dependiendo de la naturaleza de la conducta.

No obstante, se registraron tres aspectos adicionales para evaluar el nivel de tolerancia de las hembras: el área recorrida durante cada prueba, el número de aproximaciones al contrincante y el tiempo total que se mantuvo esta proximidad. Para realizar dichos registros, en una hoja de acetato se trazó una cuadrícula de 5 cm x 5 cm, la cual se adhirió a la pantalla de la computadora en la que se analizaron los videos. Con el acetato dispuesto sobre la pantalla se procedió a contar, por un lado, el número de cuadros recorridos por cada hembra durante los 10 minutos de la confrontación (Figura 6a). Por otro lado, se registró la frecuencia en que las hembras focales se acercaron a su contrincante y el tiempo total que pasaron cerca al oponente durante los 10 minutos de la confrontación (En la figura 6b se muestra el área que se consideró para medir la cercanía entre las hembras).

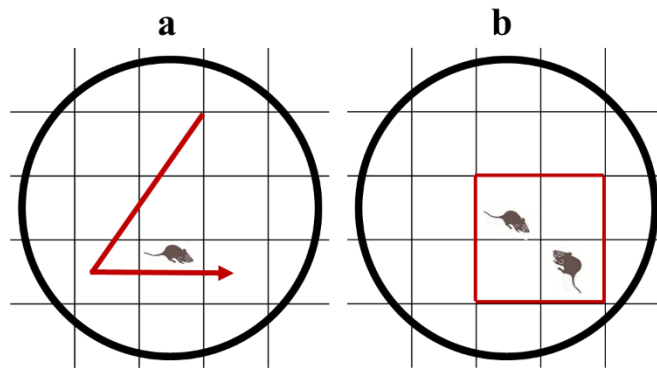


Figura 6. a) Método utilizado para medir el área recorrida por las hembras y b) la distancia para registrar la proximidad entre las hembras.

6.7 Elaboración del Etograma de las hembras de *P. difficilis*

Para la descripción de los comportamientos agresivos y afiliativos de *P. difficilis* se utilizaron las videograbaciones obtenidas a partir de las confrontaciones entre las hembras. Los videos fueron analizados con el programa Solomon Coder beta 15.11.19. De cada confrontación se realizaron observaciones focales, es decir, se observó la conducta de cada una de las hembras confrontadas de forma individual. Para mantener estandarizado el análisis de los videos, siempre se inició con el registró conductual de la hembra que se encontraba del lado derecho de la arena.

Las conductas se categorizaron entre agresivas y afiliativas tomando en cuenta la categorización realizada en los etogramas reportados en otros estudios sobre conducta social intraespecífica de roedores (Courtalon y cols. 2003; Wolff y Macdonald 2004). Se revisó que las conductas registradas y descritas coincidieran con las reportadas anteriormente para asignarles un nombre en caso de que ya hubieran sido descritas anteriormente. Las conductas de estado (aquellas cuyo principal atributo es la duración) se describieron en porcentaje de tiempo, mientras que la de evento (conductas que se caracterizan por el número de ocurrencia) se reportaron en número de ocurrencia. Posteriormente, los datos de número y duración de eventos y se utilizaron para la comparación entre hembras gestantes y no gestantes y para ver la relación entre conducta y testosterona.

6.8 Colecta de heces fecales para la medición de testosterona en hembras

A todas las hembras adultas capturadas se les tomó una muestra de heces (aproximadamente 0.5 g por muestra) directamente del ano con una pinza metálica. Las muestras de heces se depositaron en viales de vidrio (Figura 7), se almacenaron y transportaron dentro de una hielera para su correcta preservación hasta llegar al laboratorio del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC). Una vez en el laboratorio las muestras se almacenaron dentro de un congelador a una temperatura de -17°C hasta el momento de su extracción (de 7 a 20 días).



Figura 7. Colecta directa de heces de las hembras de *P. difficilis*

6.9 Extracción de la hormona testosterona

En el laboratorio de inmunohistoquímica del CTBC se realizó la extracción de la hormona testosterona de las heces colectadas. En cada proceso de extracción se incluyeron de 4 a 9 muestras. De cada una de estas muestras, se registró el peso (g) de las excretas, enseguida se colocaron en matraces de manera individual y se les agregó 4 ml de metanol y 1 ml de agua desionizada. Los matraces fueron sellados con papel parafilm y se dejaron reposar durante 24 horas para permitir la hidratación de las excretas y así se pudieran triturar con mayor eficacia. Pasadas las 24 horas, las muestras se maceraron, se agitaron en un Vórtex durante 15 minutos y se dejaron reposar durante 3 horas. Posteriormente, se extrajo el sobrenadante con una micropipeta de 1000 μl para ser depositado en tubos de ensayo que posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 minutos. Después del centrifugado, se volvió a extraer el sobrenadante y cada muestra se repartió proporcionalmente en 4 tubos eppendorf de 1.5 ml. todos los eppendorf se mantuvieron abiertos y se colocaron dentro de una campana de extracción hasta que el metanol se evaporó.

Una vez evaporado el metanol, se colocó 1 ml de éter etílico en dos de los cuatro tubos eppendorf, se agitaron durante 30 minutos en el vórtex y se centrifugaron durante siete minutos. Finalmente, las muestras contenidas en los eppendorf se depositaron en un ultracongelador revco a -75°C para congelar el sedimento. Una vez congelado el sedimento, el sobrenadante fue vertido en los dos tubos eppendorf restantes y estos fueron colocados sin tapar, dentro de una campana de extracción hasta que el éter se evaporó. Una vez evaporado el éter, se repitió por segunda vez el procedimiento hasta volver a verter el sobrenadante en los dos tubos restantes.

El mismo proceso de lavado con el éter etílico se realizó con uno de los dos tubos restantes, hasta depositar el sobrenadante en el último eppendorf, repitiendo el proceso para este tubo final hasta depositar el sobrenadante en un tubo nuevo. Finalmente, el eppendorf nuevo se colocó abierto dentro de una campana de extracción hasta que se evaporó por completo el éter. Una vez terminada la extracción, las muestras fueron almacenadas en refrigeración (entre -4 y -7°C) hasta el conteo de la hormona.

6.10 ELISA competitivo

La cuantificación de los niveles de testosterona se realizó utilizando un kit comercial de ELISA de Cayman para DSL activa de testosterona. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se prepararon los buffers, el estándar de testosterona y se reconstituyeron los trazadores y el antígeno para el desarrollo del ensayo. Posteriormente, se realizó la configuración de la placa según las instrucciones del kit, se agregaron las muestras por duplicado y se colocó el trazador y el antígeno. La placa se cubrió con plástico fil y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente en un agitador orbital. Al término de la incubación, la placa se enjuagó dos veces con el buffer de lavado y se agregó el reactivo de Ellmans previamente reconstituido. Finalmente, se agregó marcador a los pozos indicados en el instructivo y ya cubierta la placa, se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente en un agitador orbital. Una vez terminado el ensayo, se utilizó un fotocolorímetro 800 LX Biotec con una longitud de onda de 450 nm para obtener el valor de la absorbancia. Con estos valores se calculó la concentración de testosterona al aplicar la ecuación de la pendiente ($Y = mx+b$) en la curva obtenida previamente.

Cabe señalar que, para llegar a las muestras utilizadas se realizaron diluciones seriadas:

- a. El primer factor de dilución fue 1:1, se mezclaron 300 μ l de muestra por 300 μ l de buffer ELISA.
- b. El segundo factor de dilución fue de 10, se mezclaron 30 μ l de muestra por 270 μ l de buffer ELISA.
- c. El tercer factor de dilución fue de 25, se mezclaron 20 μ l de muestra por 480 μ l de buffer ELISA.

6.11 Análisis estadísticos

Para el etograma, se obtuvieron los porcentajes de tiempo que cada uno de los grupos reproductivos invirtió desplegando cada una de las conductas registradas.

Tanto las conductas de agresión y de tolerancia, como los niveles de testosterona y la relación entre ambas variables (testosterona y comportamiento) se analizaron estadísticamente mediante modelos lineales mixtos. La significancia de los factores fijos se calculó utilizando el procedimiento de eliminación hacia atrás (Stepwise backward deletion). Para ello, fueron introducidas todas las variables en el modelo general: estado reproductivo (HG y HNG), longitud corporal (mm), peso corporal (g), temporada climática (lluvias y secas) en la que fueron confrontadas las hembras y la interacción entre estado reproductivo y niveles de testosterona. Posteriormente se fueron descartando una a una las variables con los menores valores de F hasta llegar al modelo mínimo que contenía solo los términos que explicaban una proporción significativa de la variación. Cabe mencionar que estas variables se eligieron por ser reportadas como factores que afectan la expresión conductual en encuentros diádicos intraespecíficos (Wolff y Peterson 1998; Kalueff y cols. 2013). Debido a que se registró el comportamiento de una misma hembra en repetidas ocasiones, se consideró a la identidad del individuo focal como un efecto aleatorio. Todos los análisis se realizaron en RStudio utilizando el paquete lme4 (RStudio Team 2020).

Para el caso de la relación entre testosterona-conducta y testosterona-estado reproductivo, se descartó la variable de temporada climática, ya que la mayoría de muestras para medir la testosterona fueron obtenidas durante la temporada de lluvias.

7. RESULTADOS

7.1 Actividad reproductiva de las hembras de *P. difficilis*

De agosto de 2018 a octubre de 2019, se realizó un esfuerzo de captura de 5500 trampas/noche. Durante estos 14 meses de muestreo, se capturó un total de 62 hembras. De este total, 18 estuvieron gestantes y 44 estuvieron no gestantes, de las hembras no gestantes cuatro fueron juveniles. Aunque las hembras gestantes se encontraron en casi todo el año, la mayor actividad se registró en los meses de abril, julio, agosto y octubre de 2019 (Figura 8). Cabe señalar que las hembras lactantes fueron descartadas porque no pudieron ser capturadas durante el periodo de muestreo.

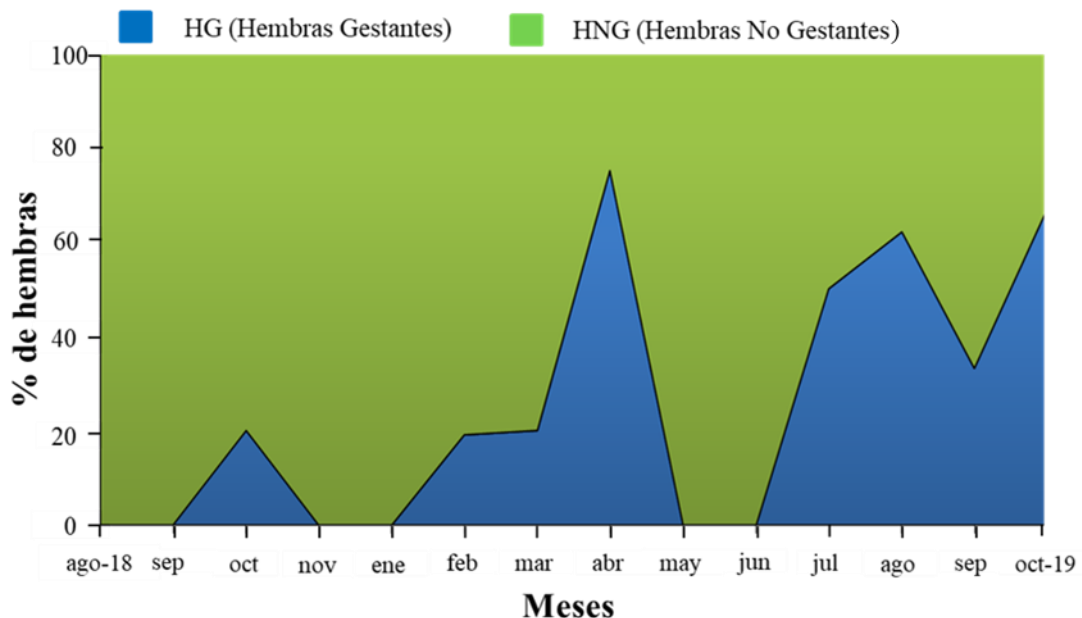


Figura 8. Actividad reproductiva de hembras de *P. difficilis* en el PNLM.

7.2 Descripción de la conducta agresiva y afiliativa en las hembras de *P. difficilis*

De las 62 hembras capturadas, solamente se utilizaron a las 58 hembras adultas que se capturaron para las confrontaciones diádicas, las cuatro hembras restantes fueron descartadas por ser juveniles. Se obtuvieron 49 confrontaciones, de las cuales, 14 correspondieron a las diadas HG:HNG y HNG:HG y 35 a la diada HNG:HNG. Algunas de las hembras utilizadas se repitieron entre las diferentes diadas, pero nunca dentro de la misma salida. Ninguna hembra participó en más de una confrontación durante una misma semana, ni se confrontó

con el mismo individuo por segunda vez, esto para evitar un efecto de aprendizaje y familiarización.

En la elaboración del etograma de las hembras de *P. difficilis*, se identificaron y describieron en primer lugar las conductas agresivas y afiliativas. Ataque y persecución (agresivas), así como acicalamiento, investigación social, acurrucamiento y exploración ambiental (afiliativas) (Ver Tabla 3 para la descripción de las conductas).

Tabla 3. Descripción de las conductas agresivas y afiliativas en las hembras de *P. difficilis*.

Categoría de conductas	Conductas	Descripción de conductas
Agresivas	Ataque	Patadas, mordidas, empujones o investidas realizadas hacia el contrincante.
	Persecución	La hembra sigue de manera persistente a su oponente en retirada durante al menos 3 segundos.
Afiliativas	Acicalamiento	La hembra se asea y rasca con el hocico y patas delanteras y traseras, sin un orden determinado.
	Investigación social	La hembra olfatea de manera repetida a su contrincante a menos de 5 cm aproximadamente.
	Acurrucamiento	La hembra se aproxima y mantiene contacto corporal con la hembra contrincante sin desplegar comportamiento agresivo.
	Exploración ambiental	La hembra se desplaza por la arena mientras olfatea de forma repetida con movimientos de la cabeza.

De las conductas agresivas registradas dentro de los encuentros diádicos, sólo el ataque estuvo presente en los tres grupos. La conducta de persecución se presentó sólo en el grupo HNG:HNG, por lo cual fue descartada para los análisis posteriores. El número máximo de ataques durante los enfrentamientos fue de cinco, sin embargo, no hubo presencia de ataques en más del 70 % de los encuentros.

En cuanto a las conductas afiliativas registradas, todas estuvieron representadas dentro de los tres grupos. Las conductas de acicalamiento y exploración al medio fueron las que presentaron un porcentaje de tiempo mayor en los distintos grupos (4% – 9.8% y 6.3% – 14.6% respectivamente) durante las confrontaciones. A su vez, para ambas conductas, el porcentaje mínimo estuvo en el grupo HG:HNG y el máximo en el grupo HNG:HG. La conducta de investigación social fue la menos representada en todos los grupos (0.9% – 1.5%). El tiempo que las hembras pasaron acurrucadas fue mayor en el grupo HNG:HNG (8%), mientras que en los grupos restantes estuvo en 4.2% (HNG:HG) y 4.4% (HG:HNG). Sin embargo, la conducta de acurrucamiento solo se presentó en el 10% de las confrontaciones analizadas, por lo que no se incluyó en las comparaciones entre grupos. Durante las confrontaciones, las hembras de los tres grupos estuvieron inmóviles la mayor parte del tiempo (70% – 83.6% del tiempo total) (Figura 9).

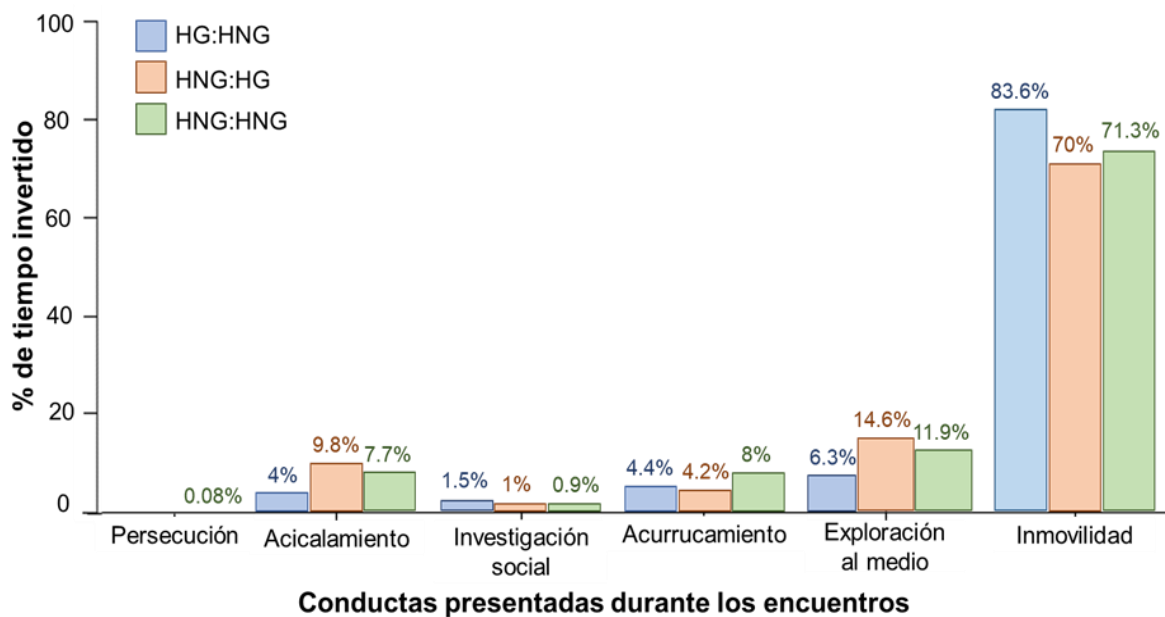


Figura 9. Porcentaje de tiempo invertido en cada conducta por los grupos de hembras. Se incluyen todas las conductas agresivas y afiliativas de estado descritas en el etograma. HG = Hembras Gestantes; HNG = Hembras No Gestantes.

7.3 Comparación de la conducta agresiva entre los grupos HG:HNG, HNG:HG y HNG:HNG

Para el comportamiento agresivo se compararon un total de 94 registros conductuales (n de HG:HNG = 14; n de HNG:HG = 14; n de HNG:HNG = 66). El número de ataques desplegados por las hembras no difirió de forma significativa entre los grupos comparados ($F_2 = 2.26$, $P = .11$; Figura 10). De igual forma, los resultados del modelo lineal mixto mostraron que los factores longitud y peso corporales no influyeron sobre el número de ataques desplegados por las hembras (longitud corporal: $F_1 = 0.70$, $P = .40$; peso corporal: $F_1 = 3.09$, $P = .08$). Sin embargo, mostró que la variación de esta conducta está siendo explicada por la temporada climática ($F_1 = 3.91$, $P = .05$), aunque estos resultados se sostienen apenas por cuatro datos que se encuentran fuera de la mediana.

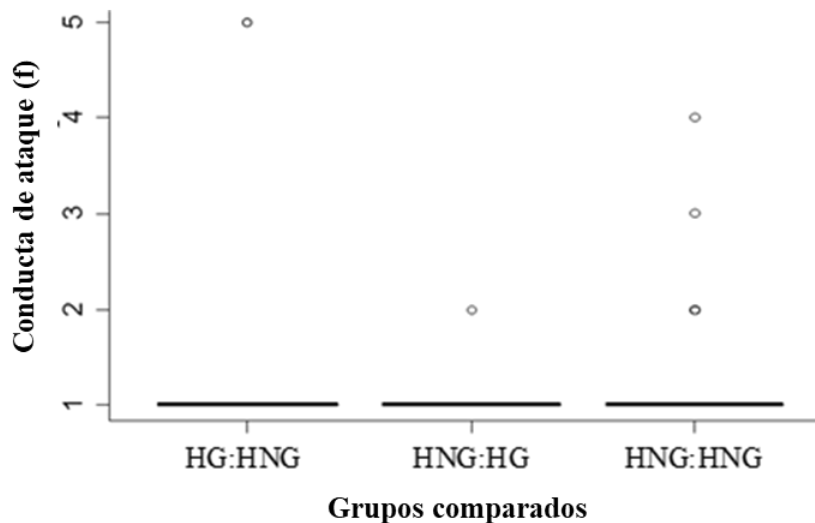


Figura 10. Frecuencia de ocurrencia de la conducta de ataque desplegada por los diferentes grupos de comparados. HG = Hembras Gestantes; HNG = Hembras No Gestantes.

7.4 Comparación de las conductas afiliativas entre los grupos HG:HNG, HNG:HG y HNG:HNG

Para el comportamiento afiliativo se compararon un total de 94 registros conductuales (n de HG:HNG = 14; n de HNG:HG = 14; n de HNG:HNG = 66). La duración en la conducta de acicalamiento expresada por las hembras no presentó diferencias estadísticas entre los grupos comparados ($F_2 = 1.74, P = .17$). De la misma forma, los resultados del modelo lineal mixto mostraron que los factores longitud y peso corporales y temporada climática no influyeron sobre la duración de la conducta de acicalamiento (longitud corporal: $F_1 = 1.11, P = .29$; peso corporal: $F_1 = 0.05, P = .81$; temporada climática: $F_1 = 2.12, P = .14$). Sin embargo, la distribución de los datos parece diferir entre los dos grupos de HNG y el grupo de las HG, siendo el grupo “HG:HNG” el que muestra menos tiempo de acicalamiento, pero esta diferencia no es apoyada estadísticamente (Figura 11).

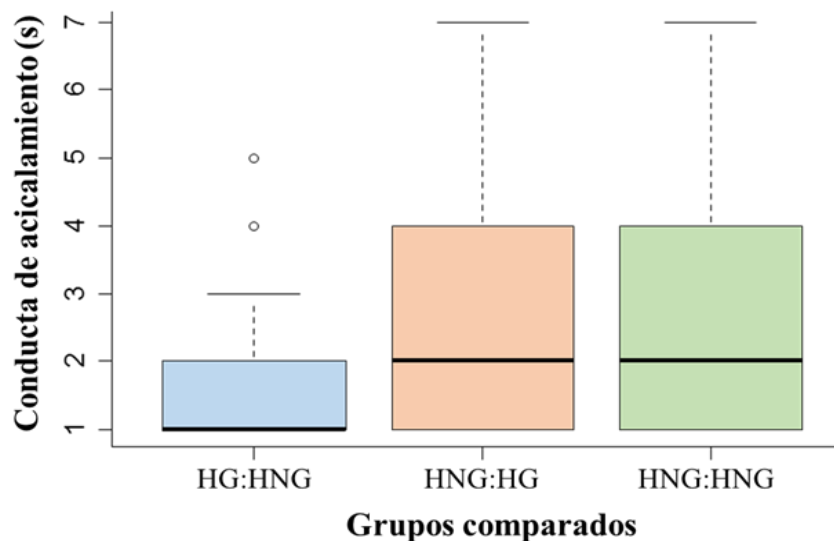


Figura 11. Duración de la conducta de acicalamiento por cada uno de los diferentes grupos de hembras comparados. HG = Hembras Gestantes; HNG = Hembras No Gestantes.

La duración de la conducta de investigación social no mostró diferencias estadísticas entre los grupos comparados ($F_2 = 0.47, P = .62$). Aunque se aprecia una diferencia en la distribución de los datos, mostrándose mayor en el grupo “HG:HNG” con respecto a los dos grupos de HNG (Figura 12), la ocurrencia de esta diferencia no tiene respaldo estadístico.

De igual forma, los resultados del modelo lineal mixto mostraron que los factores longitud y peso corporales y temporada climática no influyeron sobre la duración de la conducta de investigación social (longitud corporal: $F_1 = 1.02$, $P = .31$; peso corporal: $F_1 = 0.04$, $P = .83$; temporada climática: $F_1 = 0.43$, $P = .50$).

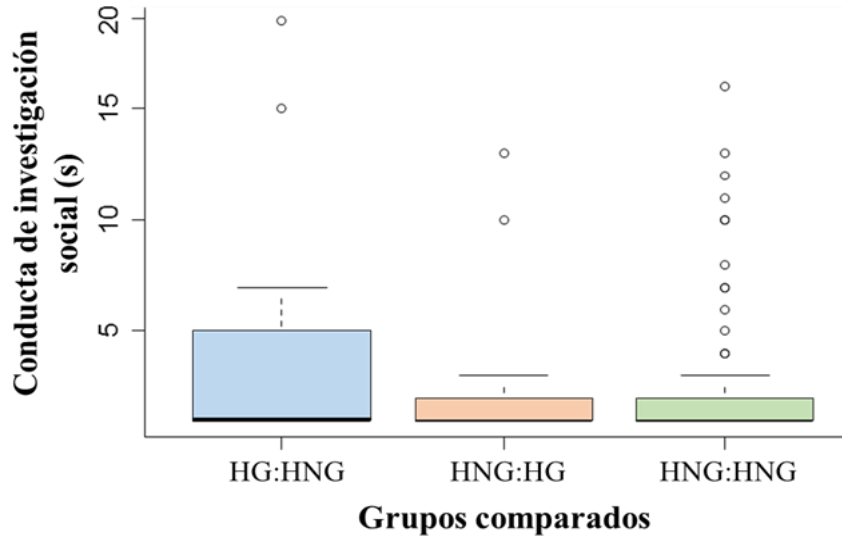


Figura 12. Duración de la conducta de investigación social mostrada por cada uno de los grupos de hembras comparados. HG = Hembras Gestantes; HNG = Hembras No Gestantes.

En la conducta de exploración al medio, la duración del comportamiento no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos comparados ($F_2 = 0.53$, $P = .62$; Figura 13). Así mismo, los resultados del modelo lineal mixto mostraron que los factores longitud y peso corporales y temporada climática no influyeron sobre el tiempo que las hembras se mantuvieron explorando la arena (longitud corporal: $F_1 = 0.50$, $P = .47$; peso corporal: $F_1 = 0.001$, $P = 0.97$; temporada climática: $F_1 = 0.26$, $P = .60$).

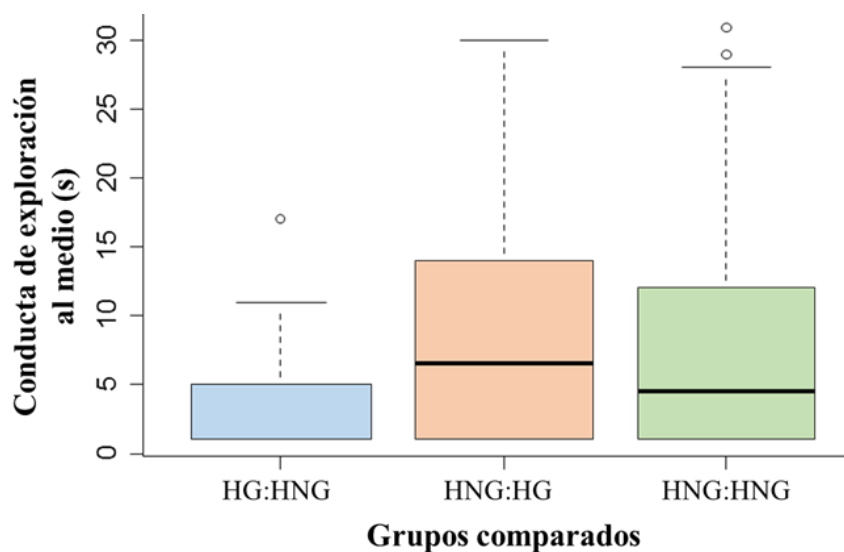


Figura 13. Duración de la conducta de exploración al medio mostrado por cada uno de los grupos de hembras comparados. HG = Hembras Gestantes; HNG = Hembras No Gestantes.

El área recorrida por las hembras no difirió estadísticamente entre cada uno de los tres grupos comparados ($F_2 = 0.22$, $P = .80$; Figura 14). De igual forma, los resultados del modelo lineal mixto mostraron que los factores longitud y peso corporales y temporada climática no influyeron de forma significativa sobre el área que recorrieron las hembras de cada grupo (longitud corporal: $F_1 = 0.005$, $P = .94$; peso corporal: $F_1 = 1.11$, $P = .29$; temporada climática: $F_1 = 0.50$, $P = .48$).

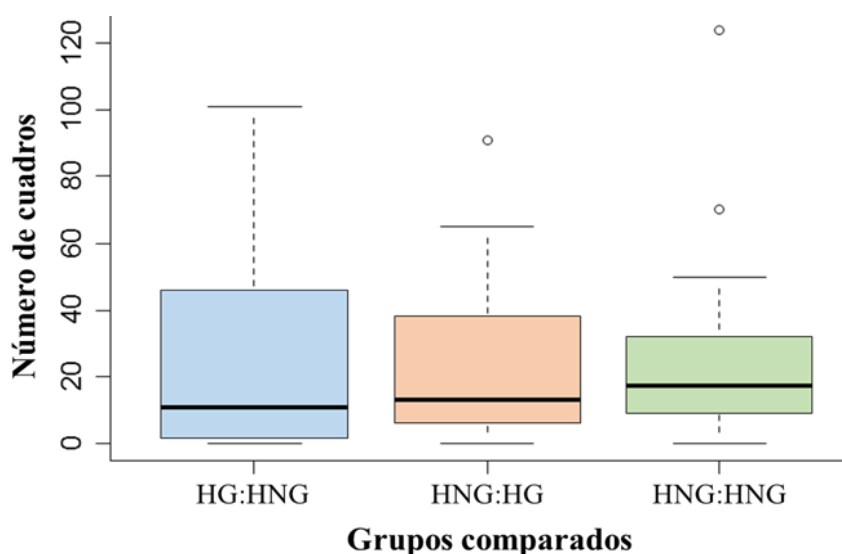


Figura 14. Área recorrida en cuadros por cada uno de los grupos de hembras comparados. HG = Hembras Gestantes; HNG = Hembras No Gestantes.

La frecuencia en que las hembras se aproximaron a su contrincante no difirió de forma significativa entre los tres grupos comparados ($F_2 = 0.69$, $P = .50$; Figura 15). De la misma forma, los resultados del modelo lineal mixto mostraron que los factores longitud y peso corporales y temporada climática no influyeron en la frecuencia en que las hembras focales de cada grupo se aproximaron a la hembra contrincante (longitud corporal: $F_1 = 0.09$, $P = .76$; peso corporal: $F_1 = 1.36$, $P = .24$; temporada climática: $F_1 = 2.73$, $P = .10$).

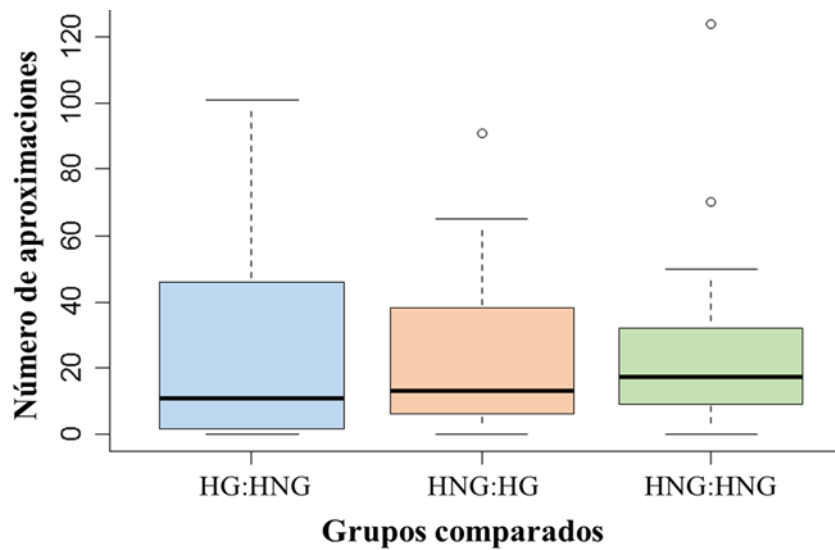


Figura 15. Comparación del número de veces que las hembras de cada grupo se mantuvieron cercanas a su contrincante. HG = Hembras Gestantes; HNG = Hembras No Gestantes.

El tiempo que las hembras se encontraron cercanas a su contrincante no difirió estadísticamente entre los grupos comparados ($F_2 = 2.67$, $P = .39$; Figura 16). De la misma forma, los resultados del modelo lineal mixto mostraron que los factores longitud y peso corporales y temporada climática no influyen sobre el tiempo que las hembras se mantuvieron cercanas a su contrincante (longitud corporal: $F_1 = 2.04$, $P = .15$; peso corporal: $F_1 = 0.13$, $P = .71$; temporada climática: $F_1 = 0.008$, $P = .92$).

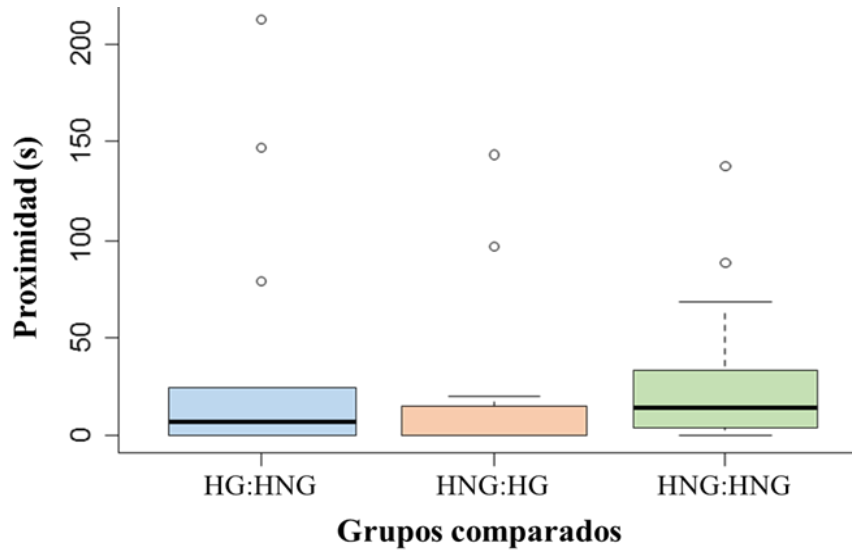


Figura 16. Tiempo que las hembras de cada uno de los grupos se mantuvieron cercanas a sus contrincantes. HG = Hembras Gestantes; HNG = Hembras No Gestantes.

7.5 Niveles de testosterona de las hembras de *P. difficilis* gestantes y no gestantes

Se obtuvieron los niveles de testosterona a partir de 12 muestras de HG y 21 muestras de HNG. Los niveles de testosterona de las hembras gestantes fueron de los 187 pg/ml – 1465 pg/ml, mientras que en las hembras no gestantes variaron entre los 189 pg/ml – 1012 pg/ml. El grupo HG tuvo un nivel medio de testosterona de 619 pg/ml, mientras que el promedio para el grupo HNG fue de 584 pg/ml. Se encontró que la mitad de las hembras del grupo HG tuvieron niveles de testosterona iguales o mayores a 523 pg/ml, en tanto que la mitad de hembras del grupo HNG presentó niveles iguales o mayores a 541 pg/ml (Figura 17).

Aunque los niveles de testosterona fueron variables entre las hembras, dicha variación no fue significativa entre las hembras gestantes y entre las hembras no gestantes ($F_1 = 0.15$, $P = .70$; Figura 17). Los resultados del modelo lineal mixto mostraron que la variabilidad en los niveles de testosterona tampoco puede ser explicada por los factores de longitud y peso corporales (longitud corporal: $F_1 = 0.44$, $P = .51$; peso corporal: $F_1 = 0.08$, $P = .77$).

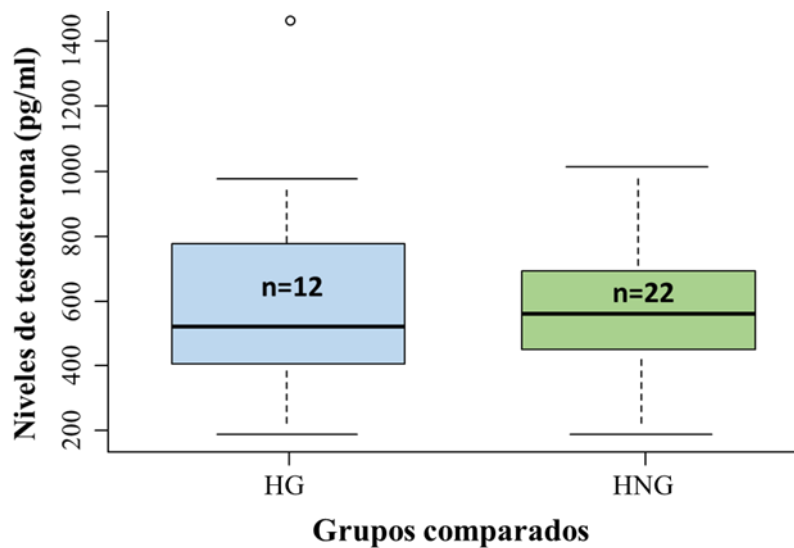


Figura 17. Niveles de testosterona en las hembras gestantes y en las hembras no gestantes. HG = Hembras Gestantes; HNG = Hembras No Gestantes.

7.6 Relación entre el comportamiento agresivo y los niveles de testosterona de las hembras de *P. difficilis*

Los resultados del modelo lineal mixto mostraron que el número de ataques realizados por las hembras es explicado por los niveles de testosterona ($F_1 = 10.87, P = .003$). Sin embargo, esta aparente relación entre ataque y testosterona se debe a que dos hembras presentaron más de un ataque (Figura 19). Una vez retirados estos dos valores, la significancia de la asociación es nula. Por otra parte, el modelo mostró que la variación en la frecuencia de esta conducta no presenta una relación con la testosterona dependiendo del estado reproductivo ($F_1 = 2.39, P = .13$; Figura 19).

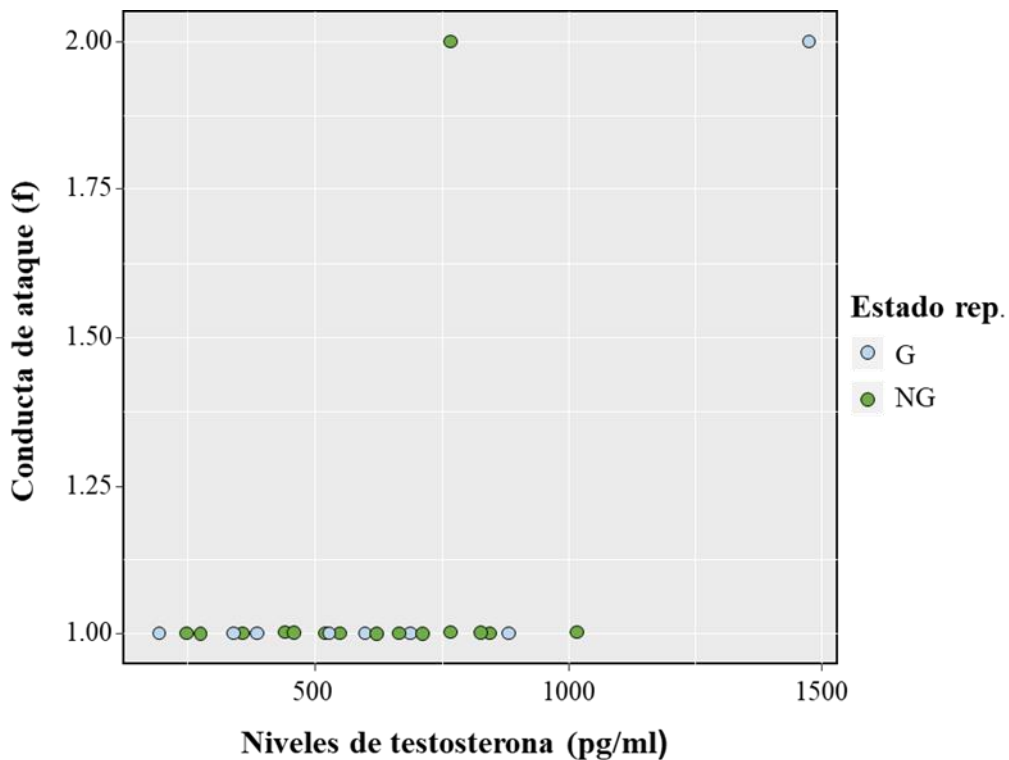


Figura 19. Relación entre la frecuencia de ataques y los niveles de testosterona de las HG y HNG. HG = Hembras Gestantes; HNG = Hembras No Gestantes.

7.7 Relación entre el comportamiento afiliativo y los niveles de testosterona de las hembras de *P. difficilis*

Los resultados del modelo lineal mixto mostraron que, la variación en la duración del comportamiento de acicalamiento en las hembras no es explicada por los niveles de testosterona ($F_1 = 0.21$, $P = .64$; Figura 20). Así mismo, los resultados mostraron que este comportamiento no presenta una relación con la testosterona dependiendo del estado reproductivo de las hembras de esta especie ($F_1 = 1.40$, $P = .24$; Figura 20).

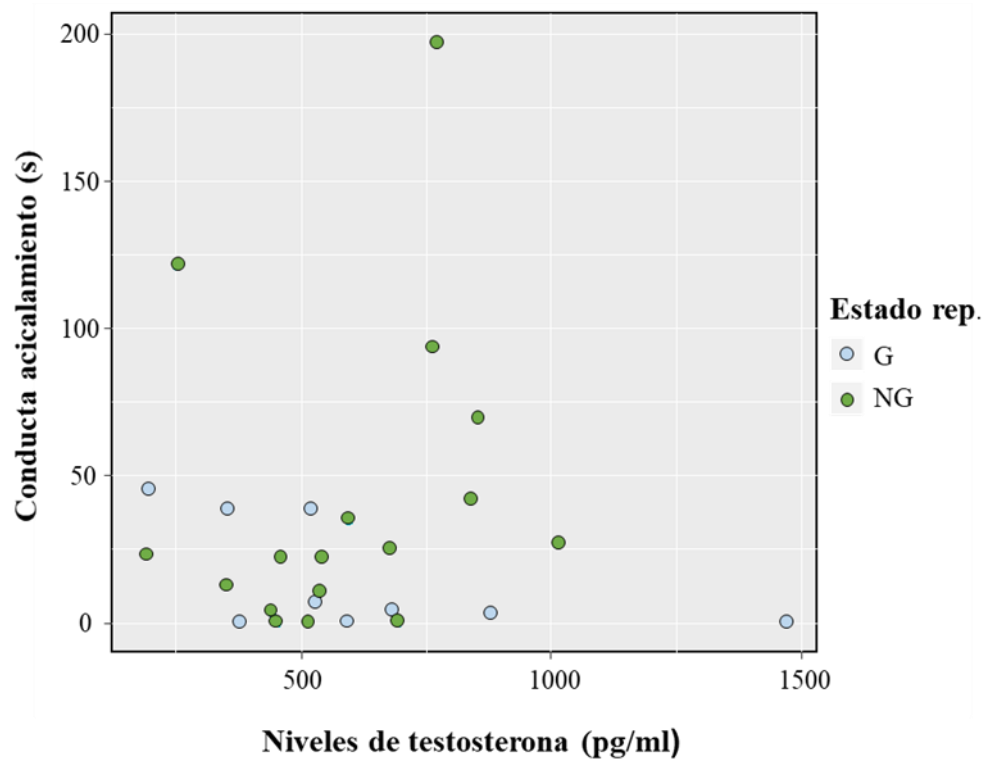


Figura 20. Relación entre la duración de la conducta de acicalamiento y los niveles de testosterona de las HG y HNG.

Los resultados del modelo lineal mixto mostraron que, la variación en la duración del comportamiento de investigación social en las hembras no es explicada por sus niveles de testosterona ($F_1 = 6.46, P = .13$; Figura 21). Así mismo, los resultados del modelo mostraron que la duración de este comportamiento no presenta una relación con la testosterona dependiendo del estado reproductivo de las hembras de esta especie ($F_1 = 8.25, P = .10$; Figura 21).

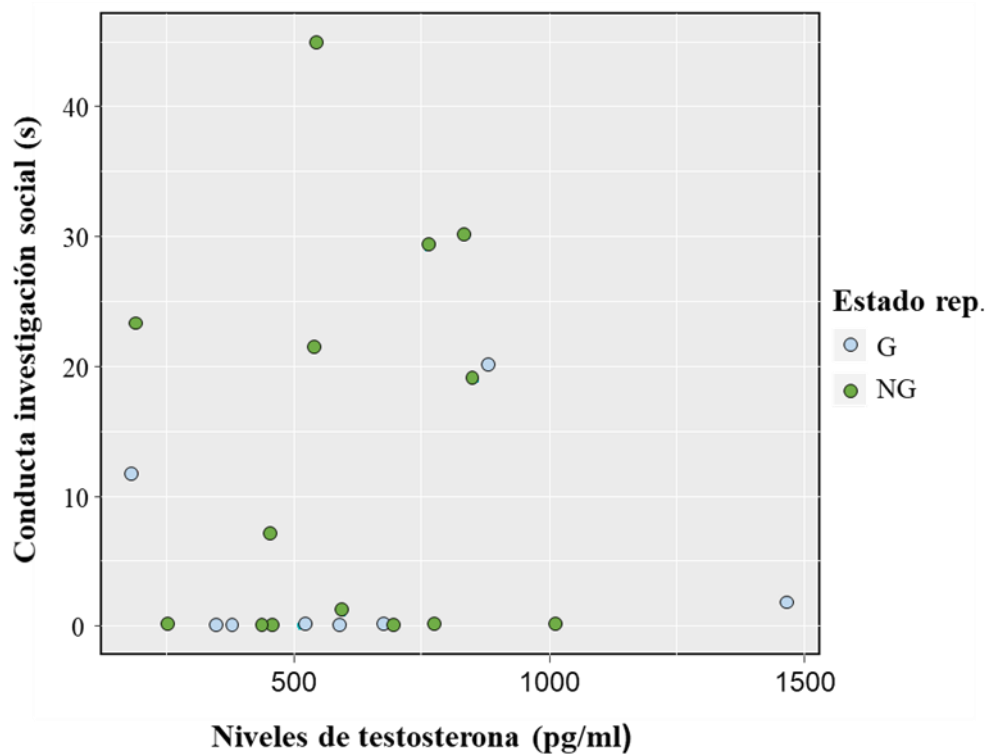


Figura 21. Relación entre la duración de la conducta de investigación social y los niveles de testosterona de las HG y HNG.

Los resultados del modelo lineal mixto mostraron que, la variación en la duración del comportamiento de exploración al medio en las hembras, no es explicada por los niveles de testosterona ($F_1 = 1.14$, $P = .31$; Figura 22). De igual forma, estos resultados mostraron que el comportamiento de exploración al medio no presenta una relación con la testosterona que sea dependiente del estado reproductivo de las hembras de esta especie ($F_1 = 0.01$, $P = .90$; Figura 22).

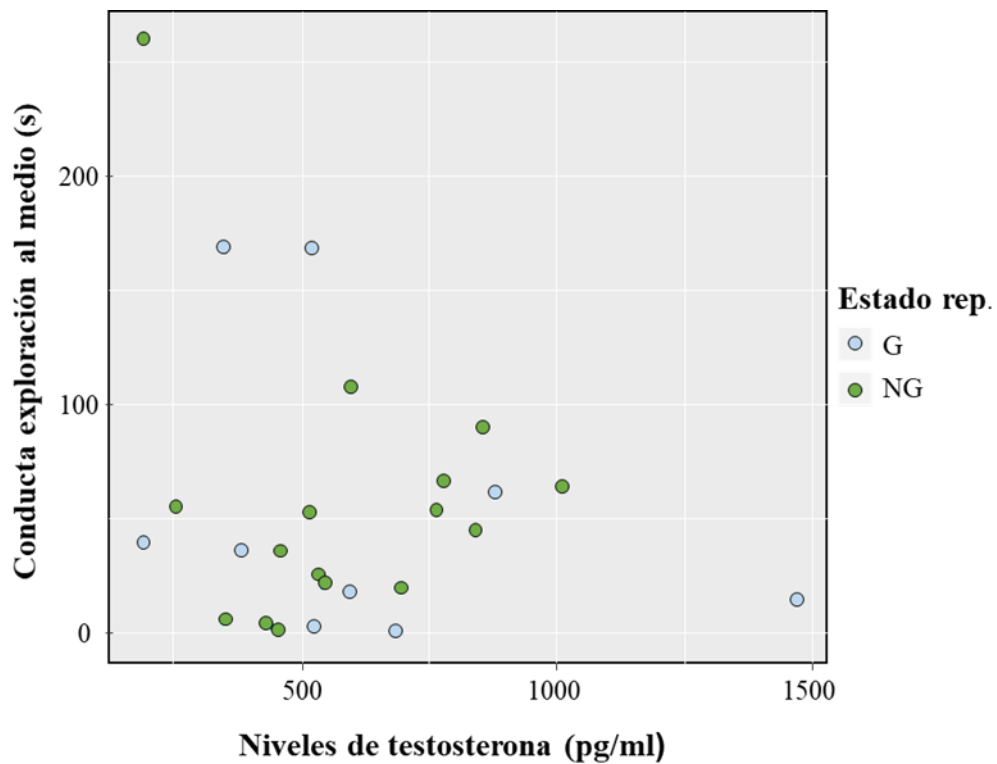


Figura 22. Relación entre la duración de la conducta de exploración al medio y los niveles de testosterona de las HG y HNG.

8. DISCUSIÓN

En este estudio se analizó si existe una disminución en la tolerancia social de las hembras durante el periodo de gestación en comparación a la etapa no reproductiva y en caso de existir, si dicha disminución podría estar relacionada con los niveles de testosterona de las hembras en dicho estado.

8.1 Actividad reproductiva de las hembras

La actividad reproductiva de las hembras se describió durante 14 meses de muestreo (agosto de 2018-octubre de 2019) con 62 hembras capturadas. Durante esta temporada, solo 18 de las hembras estuvieron gestantes, concentrándose la actividad reproductiva en los meses de abril, julio, agosto y octubre de 2019. Los meses de mayor actividad reproductiva para la zona del volcán La Malinche concuerdan con lo reportado por otros autores (Galindo-Leal y Krebs 1997; Fernández y cols. 2010), los cuales ubican la temporada de reproducción en los meses de junio hasta diciembre, siendo éstos los meses más húmedos del año. Además, estos resultados concuerdan con lo descrito para otras especies del género *Peromyscus* (Dupree y cols. 2020) en donde se describe que los picos reproductivos se localizan en los meses de mayor humedad (agosto-diciembre). Lo mismo se observó en este trabajo, los meses en los que se registró un mayor número de hembras gestantes fue en los mismos en los que se registró un mayor número de lluvias para la zona de estudio.

8.2 Descripción del comportamiento social intrasexual de las hembras

La descripción del comportamiento social registrado en los encuentros diádicos se clasificó en conductas agresivas y afiliativas. Durante los encuentros, sólo se registraron dos conductas agresivas (ataque y persecución), mientras que se registraron cuatro conductas afiliativas (acicalamiento, investigación social, exploración al medio y acurrucamiento). Además de que las conductas de agresión estuvieron presentes en menor número y duración que las conductas afiliativas, el comportamiento agresivo también fue expresado por un menor porcentaje de hembras, en comparación a las conductas afiliativas.

El bajo despliegue de conductas agresivas de las hembras hacia sus conespecíficas podría relacionarse con una agresión dependiente del territorio. Diversos trabajos han descrito que existen especies en las que los individuos sólo reaccionan de forma agresiva hacia los intrusos cuando se encuentran dentro de su territorio (Stockley y Bro-Jorgensen

2011). Aunque en trabajos anteriores, utilizando la misma especie de estudio que en este trabajo, se ha encontrado que tanto hembras como machos son capaces de desplegar comportamientos agresivos en ambientes neutrales (Huerta 2018).

Por lo tanto, estos resultados indican que, al menos en estas condiciones, las hembras de esta especie son ampliamente tolerantes hacia sus conespecíficas sin importar el grado de familiarización que tengan con ellas. Dichos resultados contradicen diversos trabajos realizados en roedores, en los cuales se indica que a medida que la familiaridad es menor entre los individuos, también lo es el nivel de tolerancia que existe entre estos (Zenuto 2010). Esto se basa en el supuesto de que los extraños representan un mayor peligro que los vecinos cercanos, por lo cual los individuos deben ser capaces de distinguir entre el olor de los individuos familiares de los individuos extraños (Vaché y cols. 2001; Lai y Johnston 2002). En cambio, a pesar de que en el presente trabajo las confrontaciones diádicas se realizaron entre hembras de distintos sitios de captura, la baja familiaridad entre los individuos no disminuyó la duración de los comportamientos afiliativos, ni aumento la frecuencia de los agresivos.

La presencia de una alta tolerancia social a lo largo de toda la temporada de muestreo podría relacionarse con las características ambientales del sitio de muestreo. La variación en la disponibilidad de alimento es uno de los elementos clave en la fluctuación de la tolerancia social (Fichtel y cols. 2017). Se ha descrito un aumento en la frecuencia de comportamientos agresivos cuando los alimentos son escasos o difíciles de obtener (Baird y Sloan 2003). Estos resultados suelen ser claros en regiones con una estacionalidad muy marcada, cómo lo son las regiones desérticas (Carsten 2008). Sin embargo, la disponibilidad de alimento en zonas boscosas no suele variar de forma significativa para forrajeadores activos (aquellos organismos que se mueven a través de su hábitat buscando alimento y que generalmente no lo almacenan), como el ratón de las rocas. En resumen, una disponibilidad de alimento constante podría explicar la baja agresividad entre las hembras.

Alternativamente, en términos de integridad física, los conflictos son costosos para los actores involucrados (Creel 2001). Por lo que, las interacciones agresivas suelen ser poco productivas en especies que no requieren proteger recursos alimenticios vitales (Johnston y Bullock 2001). Este es el caso de especies que no suelen almacenar alimento, como sucede con el ratón de las rocas, para las cuales se ha descrito que es más redituable explotar recursos donde no hay un residente establecido que lo defienda (Maynard y Parker 1976). Esto podría

explicar que las hembras no tengan interacciones agresivas con sus conespecíficas de forma regular.

8.3 Comportamiento agresivo en hembras gestantes y no gestantes

Debido a la baja frecuencia de presentación del comportamiento agresivo dentro de los diferentes grupos comparados, sólo se pudieron hacer comparaciones con la conducta de ataque. Se encontró que no existe una diferencia significativa del número de ataques presentado por las hembras gestantes en comparación con las no gestantes. Trabajos en poblaciones de ratones con presencia de infanticidio han reportado que, es desde la gestación cuando las hembras presentan cambios en los circuitos cerebrales encargados del comportamiento social, reflejándose en un incremento de agresión ante los individuos potencialmente amenazantes (Bosch 2013). El hecho de que en este trabajo la frecuencia de ataques no haya sido mayor en las hembras gestantes con respecto a las no gestantes, aunado a la baja familiaridad interindividual con la que se trabajó, puede sugerir que en el ratón de las rocas el riesgo de infanticidio por parte de las conespecíficas es bajo. (Wolff y Macdonald 2004). Por otra parte, las conductas agresivas directas suelen ser muy costosas, por lo que en las interacciones sociales con frecuencia se usan señales establecidas durante interacciones previas de dominancia y subordinación (de Waal 1986). Esta estrategia social incrementa los beneficios (adquisición de recursos sociales y alimenticios) mientras reduce los costos asociados a los enfrentamientos agresivos (desgaste energético y heridas) (van Schaik 1989).

8.4 Comportamiento afiliativo en hembras gestantes y no gestantes

Dentro de las conductas afiliativas, la duración del acicalamiento no difirió significativamente entre hembras gestantes y no gestantes. En su mayoría, el análisis del acicalamiento se ha dirigido al estudio de diferentes trastornos humanos, utilizando a los roedores como modelos de estudio (Kalueff y cols. 2016). Sin embargo, existe evidencia de que el acicalamiento también funciona como una forma de comunicación social. La duración del acicalamiento en una interacción social suele ser un indicador del nivel de comunicación química entre los organismos (Kondrakiewicz y cols. 2018). En este caso, un mayor tiempo de acicalamiento suele estar relacionado a un mayor nivel de comunicación

entre los individuos y es característico de especies altamente sociables (Kalueff y cols. 2016).

Para el caso de las conductas de investigación social tampoco se encontraron diferencias estadísticas entre las hembras gestantes y no gestantes. La investigación social es considerada una conducta amistosa que generalmente se observa en especies donde las interacciones sociales no son violentas, y es indicador de un alto nivel de sociabilidad (Kondrakiewicz y cols. 2018). Ya que esta conducta se encontró presente a lo largo del estudio y su variación entre hembras gestantes y no gestantes no fue significativa, se puede inferir que la tolerancia intrasexual es alta y constante en las hembras del ratón de las rocas, sin ser afectada por la gestación. Esta idea se ve reforzada con los resultados obtenidos sobre la conducta de exploración al medio, donde se encontró que su duración tampoco difirió de acuerdo al estado reproductivo de las hembras.

En adición, ni el espacio recorrido por las hembras durante el enfrentamiento, ni la proximidad hacia el contrincante presentaron variación relacionada al estado reproductivo. Tomando en cuenta que los roedores tienen la capacidad para reconocer a otros individuos (Halpin 1981) y discriminar entre características como el sexo y el estado reproductivo (Lai y Johnston 2002), estos resultados fortalecen la idea de que la gestación no afecta el nivel de tolerancia social. Esto, porque las hembras no gestantes no reconocieron a las gestantes como una amenaza y mantuvieron una cercanía y movilidad similar estando con una hembra gestantes y una no gestante.

Estos resultados pueden sugerir cierto nivel de cooperación entre hembras, ya que la permanencia de la tolerancia social a lo largo del tiempo coincide con lo registrado en especies con crianza cooperativa (Avital y cols. 2016). Sin embargo, esto resulta muy especulativo, ya que el método implementado no estuvo dirigido a analizar aspectos de cooperación.

8.5 Relación entre los niveles de testosterona y la tolerancia social de las hembras gestantes y no gestantes

No se encontraron diferencias significativas entre los niveles de testosterona de las hembras gestantes y las hembras no gestantes. Anteriormente, se ha reportado que las hembras suelen elevar sus niveles de testosterona durante la etapa reproductiva como un mecanismo de preparación para afrontar las dificultades de la gestación (principalmente las energéticas y

las que conlleva la protección del producto). Sin embargo, esto se ha reportado para especies de zonas desérticas (Carsten 2008). Posiblemente, el que nuestros resultados sean tan contrastantes, esté relacionado con las características de la zona de muestreo. Otra posibilidad es que no se lograran capturar a las hembras gestantes cuando tenían los niveles más altos de testosterona. Sobre esto, en algunos roedores se ha reportado que los niveles más altos de testosterona suelen encontrarse en los últimos días de la gestación (deCatanzaro y cols. 2004). Esto representa una ventana de oportunidad muy pequeña para registrar los picos de testosterona a través de este método de muestreo. Sobre todo, si se considera que existe una disminución en el tiempo y área de actividad de las hembras durante la gestación (De-la-Cruz y cols. 2019).

Los resultados mostraron que las conductas de tolerancia social no se relacionan con los niveles de testosterona, ni para las hembras gestantes ni para las hembras no gestantes. Es probable que estos comportamientos estén respondiendo a otras hormonas, cómo podrían ser los estrógenos. Para los roedores, existe evidencia de que el estradiol también puede mediar diferentes conductas sociales, como los comportamientos afiliativos no sexuales. Esto se ha observado en hembras de roedores del género *Microtus*, donde las conductas afiliativas (como el acurrucamiento) se presentan durante los días más largos, cuando los niveles de estradiol son más altos (Beery y cols. 2008).

Por otra parte, a pesar de que no se encontró una relación entre las conductas analizadas y los niveles de testosterona, se debe señalar que los niveles registrados de esta hormona en las hembras de *P. difficilis* fueron casi del doble en los reportados en hembras de otras especies de roedores que presentan altos niveles de agresión, en los cuales el decremento de la tolerancia si se ha relacionado con incrementos de la testosterona durante la temporada reproductiva (Carsten 2008).

Una posible explicación a este resultado es que, la tolerancia social, más que responder a los niveles de la hormona testosterona, estén respondiendo a la variación en la disponibilidad de receptores y transportadores de la hormona o a la variación en la sensibilidad de los tejidos diana (Rosvall 2013). De ser así, las hembras podrían no reaccionar a niveles elevados de testosterona por una baja sensibilidad en los tejidos diana o por no tener la cantidad suficiente de transportadores o receptores hormonales para generar una respuesta conductual agresiva.

Por otra parte, hay que considerar los aspectos metodológicos que pudieron influir en los resultados obtenidos. Empezando por el método de medición de testosterona, ya que se realizó una medición de testosterona fecal, los resultados podrían diferir de los obtenidos con un método de medición clásico (como la medición de testosterona sérica). Esto, considerando que se ha reportado una diferencia en las vías de excreción hormonal entre sexos y especies, por lo cual, se ha sugerido que es importante la validación de este método para cada especie a través de un inmunoensayo enzimático específico (Auer y cols. 2020). Alternativamente, es posible que el tamaño de muestra no haya sido suficiente para representar la variabilidad que se esperaba encontrar en el comportamiento, así como su relación con los niveles de testosterona. Finalmente, se debe considerar que el diseño experimental implementado no fuera el óptimo para un estudio de estas características y que correcciones puntuales pudieron ampliar la información obtenida. Se debería corroborar si existe agresión asociada al territorio en esta especie para tener una mayor confiabilidad en los resultados. También es recomendable validar el método de cuantificación de testosterona fecal para esta especie y así corroborar que los niveles encontrados sean fiables.

9. CONCLUSIONES

La actividad reproductiva de las hembras de *P. difficilis* tuvo sus picos más altos durante los meses más húmedos del año, coincidiendo con lo reportado para otras poblaciones de esta especie en ecosistemas más áridos.

Existe un nivel alto de tolerancia social entre las hembras de *P. difficilis*, en las poblaciones del Parque Nacional La Malinche y ésta no parece fluctuar de forma significativa dependiendo del estado reproductivo.

En las hembras de *P. difficilis*, los niveles de testosterona no incrementan durante la gestación. Finalmente, independientemente del estado reproductivo, los niveles de testosterona en heces y las conductas agresivas y afiliativas expresadas por las hembras de *P. difficilis* hacia sus conespecíficas no se relacionan. En conclusión, ni el estado reproductivo, ni los niveles de testosterona en heces se relacionan con la conducta de tolerancia social de las hembras del ratón de las rocas.

10. PERSPECTIVAS

Se plantean algunas propuestas para darle continuidad al presente trabajo:

Ya que la variabilidad conductual y hormonal fue muy amplia entre las hembras, se sugiere aumentar el tamaño de muestra tanto para los análisis conductuales, cómo para la medición de la testosterona.

En diversas especies se ha reportado un aumento de agresión cuando los individuos se encuentran dentro de su territorio en comparación a cuando son intrusos en el territorio de alguien más o estando en un ambiente neutral. En caso de suceder algo similar con esta especie, los resultados se verían afectados, ya que estaríamos subestimando la variación de las conductas analizadas al haber desarrollado las confrontaciones en arenas neutrales. Por este motivo se propone realizar confrontaciones sociales bajo el paradigma de intruso-residente para evaluar si el territorio juega un papel importante en el despliegue conductual de las hembras del ratón de las rocas.

Debido al alto nivel de tolerancia social encontrado en las hembras de esta especie, se sugiere ahondar en el análisis de las relaciones sociales de la especie en general. Sobre todo, al considerar la baja familiaridad entre las hembras confrontadas, pues según lo reportado en otras especies de roedores, no es habitual.

Los resultados indican niveles muy altos de testosterona en las hembras, tanto dentro como fuera de la etapa de gestación. Ya que la conducta de tolerancia social parece no estar relacionada con estos niveles hormonales, sería interesante explorar más a fondo el papel que la testosterona está desempeñando en otros comportamientos (como el sexual o en la defensa territorial o de las crías). Adicionalmente, se sugiere un ensayo de validación hormonal midiendo testosterona sérica o en pelo, esto con la finalidad de corroborar la representatividad de la testosterona fecal.

11. REFERENCIAS

- Adkins-Regan E. 2005. Hormones and animal social behavior. Editorial Princeton University Press. New Jersey.
- Aguillera-Miller EF, Lim BK, Murphy, Alvarez-Castañeda ST. 2018. Dominance by extremely high aggressive behaviors in relation to genetic microstructure in matriline. *Mammalian Biology* 89: 1–6.
- Albert D, Jonik R, Walsh M. 1993. Influence of combined estradiol and testosterone implants on the aggressiveness of nonaggressive female rats. *Physiology and Behavior* 53: 709–713.
- Auer KE, Kußmaul M, Möstl E, Hohlbaum K, Rüllicke T, Palme R. 2020. Measurement of fecal testosterone metabolites in mice: replacement of invasive techniques. *Animals* 10:165–182.
- Avital A, Aga-Mizrachi S, Zubedat S. 2016. Evidence for social cooperation in rodents by automated maze. *Scientific Reports* 6: 29517.
- Baird T, Sloan C. 2003. Interpopulation variation in the social organization of female collared lizards, *Crotaphytus collaris*. *Ethology* 109: 879–894.
- Ball GF, Balthazart J. 2008. Individual variation and the endocrine regulation of behaviour and physiology in birds: a cellular/molecular perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 363: 1699–1710.
- Beehner J, Phillips J, Whitten P. 2005. Female testosterone, dominance rank, and aggression in an Ethiopian population of hybrid baboons. *American Journal of Primatology* 67: 101–119.
- Beery AK, Loo TJ, Zucker I. 2008. Day length and estradiol affect same-sex affiliative behavior in the female meadow vole. *Hormones and Behavior* 54: 153–159.
- Bosch OJ. 2013. Maternal aggression in rodents: brain oxytocin and vasopressin mediate pup defence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 368: 20130085.
- Carsten S. 2008. Seasonal changes in testosterone and corticosterone levels in four social classes of a desert dwelling sociable rodent. *Hormones and Behavior* 53: 573–579.

- Chovnik A, Yasukawa N, Monder H, Christian J. 1987. Female behavior in populations of mice in the presence and absence of male hierarchy. *Aggressive Behavior* 13: 367–375.
- Ciani F, Dall’Olio S, Stanyon R, Palagi E. 2012. Social tolerance and adult play in macaque societies: a comparison with different human cultures. *Animal Behaviour* 84:1313–1322.
- Clarke F, Faulkes C. 1997. Dominance and queen succession in captive colonies of the eusocial naked mole-rat, *Heterocephalus glaber*. *Proceedings of the Royal Society B* 264: 993–1000.
- Courtalon P, Dolcemascolo A, Troiano V, Álvarez M, Busch M. 2003. Inter and intraspecific relationships in *Akodon azarae* and *Calomys laucha* (Rodentia, Sigmodontinae) in pampean agroecosystems. *Journal of Neotropical Mammalogy* 10: 27–39.
- Creel S. 2001. Social dominance and stress hormones. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 491–497.
- Crowcroft P, Rowe FP. 1963. Social organization and territorial behaviour in the wild house mouse (*Mus musculus L.*). *Proceedings of the Zoological Society of London* 140: 517–531.
- deCatanzaro D, Muir C, Beaton EA, Jetha M. 2004. Non-invasive repeated measurement of urinary progesterone 17 β -estradiol and testosterone in developing cycling pregnant and postpartum female mice. *Steroids* 69: 687–696.
- De-la-Cruz IM, Castro A, Zavala A, Salame A, Ramírez J. 2019. Differentiation pattern in the use of space by males and females of two species of small mammals (*Peromyscus difficilis* and *P. melanotis*) in a temperate forest. *Therya* 10: 3–10.
- de Waal F. 1986. The integration of dominance and social bonding in primates. *The Quarterly Review of Biology* 61:459–479.
- De Waal F, Luttrell LM. 1989. Toward a comparative socioecology of the genus *Macaca*: different dominance styles in rhesus and stumptail monkeys. *American Journal of Primatology* 19: 83–109.
- Dupree A, Quinn L, Kadlubar G, Hoffman J. 2020. Reproductive notes on *Peromyscus leucopus* and *Peromyscus gossypinus* in Louisiana. *Transactions of the Kansas Academy of Science* 123: 265–268.

- Eisenberg JF. 1962. Studies in the behavior of *Peromyscus maniculatus gambelii* and *Peromyscus californicus parasiticus*. *Behaviour* 19: 177–207.
- Edwards D. 1969. Early androgen stimulation and aggressive behavior in male and female mice. *Physiology and Behavior* 4: 333–338.
- Fernández A, Florencia G, Mark H. 2010. *Peromyscus difficilis* (Rodentia: Cricetidae). *Mammalian Species* 42: 220–229.
- Fichtel C, Schnoell AV, Kappeler PM. 2017. Measuring social tolerance: An experimental approach in two lemurid primates. *Ethology* 124: 65–73.
- French JA, Mustoe AC, Cavanaugh J, Birnie AK. 2013. The influence of androgenic steroid hormones on female aggression in ‘atypical’ mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 368: 20130084.
- Galindo-Leal C, Krebs CJ. 1997. Habitat structure and demographic variability of a habitat specialist: the rock mouse (*Peromyscus difficilis*). *Revista Mexicana de Mastozoología* 2: 72–89.
- Gipps JH. 1984. The behaviour of mature and immature male bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Animal Behaviour* 32: 836–839.
- Halpin ZT. 1981. Adult-young interactions in island and mainland populations of the deermouse *Peromyscus maniculatus*. *Oecologia* 51: 419–425.
- Hau M. 2007. Regulation of male traits by testosterone: implications for the evolution of vertebrate life histories. *BioEssays* 29: 133–144.
- Hernández K. 20018. Evaluación de la relación socio-espacial interespecifica del ratón de los volcanes para detectar efectos de la perturbación ambiental en la Malinche, Tlaxcala. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Heske EJ, Ostfeld RS, Lidicker WZ. 1988. Does social behavior drive vole cycles? An evaluation of competing models as they pertain to California voles. *Canadian Journal of Zoology* 66: 1153–1159.
- Huerta J. 2018. Relación socio-espacial interespecifica de *Peromyscus difficilis* en un ensamble de ratones en el volcán la Malinche, México. Tesis de maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Johnston RE, Bullock TA. 2001. Individual recognition by use of odours in golden hamsters: the nature of individual representations. *Animal Behaviour* 61: 545–557.

- Kalueff AV, Stewart AM, Song C, Beridge KC, Graybiel AM, Fentress JC. 2016. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience* 17: 45–59.
- Ketterson E, Nolan V, Sandell M. 2005. Testosterone in females: mediator of adaptive traits, constraint on sexual dimorphism, or both? *American Naturalist* 166: 585–598.
- Kondrakiewicz K, Kostecki M, Szadzińska W, Knapska E. 2018. Ecological validity of social interaction tests in rats and mice. *Genes, Brain and Behavior* 18: e12525.
- Koren L, Mokady O, Geffen E. 2006. Elevated testosterone levels and social ranks in female rock hyrax. *Hormones and Behavior* 49: 470–477.
- Lai WS, Johnston RE. 2002. Individual recognition after fighting by Golden hamsters: a new method. *Physiology and Behavior* 76: 225–239.
- López J, Acosta R. 2005. Descripción del Parque Nacional Malinche. En: Biodiversidad del Parque Nacional Malinche. Fernández J, López J (eds.) Coordinación General de Ecología del Estado de Tlaxcala. Tlaxcala, México. pp. 24.
- Manning A. 1981. *An introduction to animal behavior* 3. Edward Arno Ids Ltd., London.
- Maynard SJ, Parker G. 1976. The logic of asymmetric contests. *Animal Behavior* 24: 159–175.
- Melis AP, Hare B, Tomasello M. 2006. Engineering cooperation in chimpanzees: tolerance constraints on cooperation. *Animal Behavior* 72: 275–86.
- Newman S. 1999. The medial extended amygdala in male reproductive behavior a node in the mammalian social behavior network. *Annals of the New York Academy of Sciences* 877: 242–257.
- Palanza P, Della D, Ferrari P, Parmigiani S. 2005. Female competition in wild house mice depends upon timing of female/male settlement and kinship between females. *Animal Behaviour* 69: 1259–1271.
- Palanza P, Re L, Mainardi D, Brainand P, Parmigiani S. 1996. Male and female competitive strategies of wild house mice pairs (*Mus musculus domesticus*) confronted with intruders of different sex and age in artificial territories. *Behaviour* 133: 863–882.
- Pinna G, Costa E, Guidotti A. 2005. Changes in brain testosterone and allopregnanolone biosynthesis elicit aggressive behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 2135–2140.

- Raleigh MJ, McGuire MT. 1989. Female influences on male dominance acquisition in captive vervet monkeys, *Cercopithecus aethiops sabaesus*. *Animal Behaviour* 38: 59–67.
- Range F, Ritter C, Virányi Z. 2015. Testing the myth: tolerant dogs and aggressive wolves. *Proceedings of the Royal Society* 282: 201–220.
- Rodel H, Starkloff A, Bautista A, Friedrich A, von Holst D. 2008. Infanticide and maternal offspring defence in european rabbits under natural breeding conditions. *Ethology* 114: 22–31.
- Ross N, French A. 2011. Female marmosets' behavioral and hormonal responses to unfamiliar intruders. *American Journal of Primatology* 73: 1072–1081.
- Rosvall KA. 2011. Intrasexual competition in females: evidence for sexual selection? *Behavioral Ecology* 22: 1131–1140.
- Rosvall KA. 2013. Proximate perspectives on the evolution of female aggression: good for the gander, good for the goose? *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 368: 20130083.
- RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA.
- Ruiz J, Gómez G. 2010. Estudio mastofaunístico del Parque Nacional Malinche. Tlaxcala, México. *Therya* 1: 97–110.
- Shier DM, Randall JA. 2007. Use of different signaling modalities to communicate status by dominant and subordinate Heermann's kangaroo rats (*Dipodomys heermanni*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 61:1023–1032.
- Silva A, Fry W, Sweeney C, Trainor B. 2010. Effects of photoperiod and experience on aggressive behavior in female California mice. *Behavioural Brain Research* 208: 528–534.
- Soria F, Pérez MI, Flores ME, Feria A. 2008. Papel de la serotonina en la conducta agresiva. *Rev Mex Neuro.* 9: 480–489.
- Staub NL, DeBeer M. 1997. The role of androgens in female vertebrates. *General and Comparative Endocrinology* 108: 1–24.
- Stockley P, Bro-Jørgensen J. 2011. Female competition and its evolutionary consequences in mammals. *Biological Reviews* 86: 341–366.

- Taravosh K, Delville Y. 2004. Aggressive behavior in female Golden hamsters: development and the effect of repeated social stress. *Hormones and Behavior* 46: 428–435.
- Vaché M, Ferron J, Gouat P. 2001. The ability of red squirrels (*Tamiasciurus hudsonicus*) to discriminate conspecific olfactory signatures. *Canadian Journal of Zoology* 79: 1296–1300.
- van Schaik C. 1989. The ecology of social relationships amongst female primates. En: *Comparative socioecology: the behavioural ecology of humans and other mammals*. Standen V Foley R (eds.) Editorial: Oxford: Blackwell Scientific Publications. Boston. pp. 195.
- von Engelhardt N, Kappeler PM, Heistermann M. 2000. Androgen levels and female social dominance in *Lemur catta*. *Proceedings Biological sciences* 267: 1533–1539.
- Wingfield, JC, Lynn SE, Soma KK. 2001. Avoiding the ‘costs’ of testosterone: Ecological bases of hormone-behavior interactions. *Brain, Behavior and Evolution* 57: 239–251.
- Wolff JO, Peterson J. 1998. An offspring-defense hypothesis for territoriality in female mammals. *Ethology Ecology & Evolution* 10: 227–239.
- Wolff JO, Macdonald DW. 2004. Promiscuous females protect their offspring. *Trends in Ecology and Evolution* 19: 127–134.
- Wolff JO. 2008. Social biology of rodents. *Integrative Zoology* 2:193–204.
- Zenuto RR. 2010. Dear enemy relationships in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*: the role of memory of familiar odours. *Animal Behaviour* 79: 1247–1255.