



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ecología, Genética y Evolución

Evaluación de métodos alternativos de control de roedores y su influencia en la producción avícola

Tesis presentada para optar por el título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires
en el área Ciencias Biológicas

Licenciada Luciana Beatriz Adduci

Directora: María Busch

Directora Asistente: Jimena Fraschina

Consejera de Estudios: María Busch

Lugar de trabajo: Laboratorio de Ecología de Poblaciones, IEGEBA-UBA, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Argentina

Lugar y fecha de defensa: Buenos Aires, 06 de noviembre 2020

Índice

SECCIÓN	PÁGINA
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
AGRADECIMIENTOS	5
CAPÍTULO 1. Introducción general	6
CAPÍTULO 2. Materiales y Métodos generales	15
CAPÍTULO 3. Evaluación del efecto de olores sobre el éxito reproductivo de hembras de <i>Mus musculus</i> en condiciones de laboratorio	18
PARTE 1. Reposición de olor cada 4 días	26
PARTE 2. Reposición de olor cada 2 días	31
COMPARACIÓN de la Parte 1 y la Parte 2	34
CAPÍTULO 4. Evaluación de la respuesta aversión de individuos de <i>Mus musculus</i> y <i>Rattus norvegicus</i> frente a olores en condiciones de laboratorio	41
CAPÍTULO 5. Discusión y conclusiones generales	59
CAPÍTULO 6. Bibliografía	64
ANEXO	80

Evaluación de métodos alternativos de control de roedores y su influencia en la producción avícola

RESUMEN

En granjas avícolas las especies *Rattus norvegicus*, *R. rattus* y *Mus musculus* son consideradas plaga debido a que ocasionan daños económicos y sanitarios. A pesar de que en ellas se aplican venenos periódicamente, el 90 % de las granjas en la Provincia de Buenos Aires está infestada con roedores, por lo que es necesario repensar las prácticas de control. Los roedores en general utilizan olores como señales químicas y hay olores que pueden alterar la preñez en las hembras o el comportamiento en general si es que sugieren la presencia de un predador. Esto puede ser usado para implementar medidas de control alternativas.

El objetivo general de este trabajo fue evaluar el efecto de olores sobre el éxito reproductivo de hembras de *M. musculus* (CF1) y sobre el comportamiento de aversión de *M. musculus* y *R. norvegicus* (ratas Wistar), a fin de seleccionar un producto que pueda utilizarse en condiciones de campo para el control de estos roedores.

En relación al éxito reproductivo, se encontraron efectos del olor a orina de gato, el olor a un macho extraño y sobre todo del TMT, olor asociado a predadores. En relación al comportamiento, no se hallaron respuestas significativas en *M. musculus*, pero ejemplares de *R. norvegicus* mostraron comportamientos de evitamiento del olor a TMT en primer lugar, y en segundo lugar a piel de gato.

En conclusión, el TMT fue seleccionado para continuar estudios acerca de su potencial efecto en condiciones de campo.

PALABRAS CLAVE: roedores, plaga, olores, TMT, reproducción, comportamiento

Assessment of alternative methods for rodent control in poultry farms

ABSTRACT

In poultry farms rodent species as *Rattus norvegicus*, *R. rattus* y *Mus musculus* are considered pests because they cause economic losses and sanitary risks. In Buenos Aires province, more than 90% of farms are infested by rodents in spite of the application of anticoagulant rodenticides, leading to the need of alternative control methods.

Rodents use chemical signals to assess their environment, and there are odors, as predator odors, that have an effect on reproduction and behavior, and may be used as alternative methods instead of rodenticide application.

The goal of this work was to assess the effect of odors on the reproductive success of female *M. musculus* (CF1) and on the aversive behavior of *M. musculus* (CF1) and *R. norvegicus* (Wistar rats), in order to select a product that may can be used in field conditions to rodent control.

Cat urine, unfamiliar male odor and TMT (associated to predator odor) had a negative effect on *M. musculus* reproduction. With respect to aversive behavior, it was not detected in *M. musculus*, while *R. norvegicus* displayed aversion to TMT and cat fur.

In conclusion, the TMT was selected to continue investigating its effect on rodents in field conditions.

KEY WORDS: rodents, pest, odors, TMT, reproduction, behavior

AGRADECIMIENTOS

A mi directora María Busch. Su ejemplo en lo cotidiano y a la hora de trabajar, su compromiso, su amor por su trabajo, por la ecología y por los que la rodean son una inspiración y su dirección definió mi manera de ser profesional, mejorándola infinitamente. Gracias María por tu solidaridad y por no guardarte nada, todo el laboratorio y yo te debemos mucho.

A mi directora Jimena Fraschina. Siempre empujándome para adelante, desenroscándome y facilitándome el trabajo. Jime aprendí muchísimo trabajando juntas, fuiste un gran ejemplo para mí y un sostén en estos tiempos difíciles, tu fortaleza no sólo te saca adelante a vos, sino a los que te rodean gracias a tu generosidad.

A Vanina León, por su ayuda, colaboración y humanidad en todo momento que la necesité. Gracias Vani, fuiste una parte fundamental del trabajo de todos estos años.

A mis compañeras del laboratorio. Daniela Montes de Oca, Rosario Lovera, Soledad Fernández, Laura Calfayán, Iris Manabella. Mujeres las admiro, las quiero, qué importante fue tenerlas acá o en el allá, cerca mío, la fuerza que me pasaron fue inmensa.

A todos mis compañeros del laboratorio de Ecología de Poblaciones y sus extensiones, gracias, trabajar en un grupo marca la diferencia.

A los jurados, por aceptar ser parte de este trabajo, y sus aportes a la tesis.

A mis biólogos amigos, Agostina, Juanjo, Agustín.

A mis amigos, por ser siempre parte de mi vida, acompañarme y quererme en todo.

A mis abuelos. La piedra fundamental de mi vida y gran parte de este trabajo.

A mi familia y mis suegros, mis cuñados, sobrinos, mi familia también. Gracias a todos por el apoyo constante, el acompañamiento y el amor.

A mis papás y mi hermana, por la vida juntos. Sin ellos y su ayuda no hubiese podido llegar hasta acá, por estar siempre para mí y mi hijo.

A Bernardo, por estar siempre, aunque yo lo niegue, en todo, en los experimentos, en llevarme, traerme, preguntarme, no preguntarme, comprar, asesorarme, y modificar todo para que este doctorado termine. Por hacer que funciones nuestra vida con Vicente y una mamá becaria.

CAPÍTULO 1. Introducción General

Los roedores son los mamíferos más abundantes y diversificados, están distribuidos globalmente, (a excepción de la Antártida), hay más de 1700 especies en el mundo, y ocupan diversos tipos de hábitats terrestres y semiacuáticos, desde selvas a desiertos, latitudes altas y bajas, ambientes cálidos y fríos. Si bien la mayoría de ellos son especies beneficiosas para el medio ambiente ya que actúan como bioingenieras del paisaje, algunas de ellas (menos del 5%) son especies consideradas plaga ya que pueden causar pérdidas significativas en la producción de alimento en muchas partes del mundo (Huchon *et al.*, 2002; Le Quoc Cuong, Le Van Han and Grant, 2003; Singleton *et al.*, 2003) y también están involucrados en la transmisión de diversas enfermedades zoonóticas.

La actividad humana causa cambios en el ambiente que tienen efectos en muchas especies animales. Si bien en muchos casos estos efectos son negativos, algunas especies de roedores se benefician debido a un aumento en las fuentes de alimento o refugios (en áreas agrícolas o urbanas), o debido a una disminución en la densidad de depredadores (Macdonald, Fenn and Gelling, 1994). En muchos sitios su introducción por el hombre ha llevado a que causen la extinción de especies nativas o lleguen a densidades tan altas que afectan los sistemas productivos, tanto extensivos (cultivos de trigo en Australia, cultivos de arroz en Indonesia) como intensivos (granjas de producción avícola en India y Pakistán), (Parshad, Ahmad and Chopra, 1987; Singleton, 2003; Singleton *et al.*, 2003; Hussain and others, 2016). Se estima que en Asia, las pérdidas de arroz antes de la cosecha varían del 5% en Malasia al 17% en Indonesia. Para poner esto en perspectiva, una pérdida del 6% en Asia equivale a suficiente arroz

para alimentar a 220 millones de personas, aproximadamente la población de Indonesia, durante 1 año.

Por otro lado, en ambientes antropizados pueden causar daños a través del consumo de alimentos, deteriorando las estructuras de construcción, reduciendo la distribución de algunas especies en peligro de extinción y transmitiendo enfermedades tanto a humanos como a animales domésticos (Timm, 1987a; Singleton *et al.*, 1999; Stenseth *et al.*, 2003; Miño *et al.*, 2007; León, Fraschina and Busch, 2010; Lovera *et al.*, 2017).

La transmisión de enfermedades al hombre o a animales es uno de los principales problemas asociados a la presencia de roedores. Hay 2 rutas de las que pueden participar los roedores, directa (por mordedura, por contaminar el alimento o el agua con heces/ desechos, o producir aerosoles en suspensión que pueden contener patógenos) o indirecta u horizontal (a través de infectar animales domésticos o de consumo humano) (Figura 1, Meerburg, Singleton, and Kijlstra 2009). Las enfermedades en las que pueden intervenir son virósicas (entre ellas hantavirus, fiebres hemorrágicas, enfermedad de Borne, coriomeningitis linfocitaria, etc), más de 20 bacteriosis (leptospirosis, enfermedad de Lyme, tularemia, listeria, salmonelosis, tifus, etc), y más de 20 parasitosis (toxoplasmosis, triquinosis, leishmaniasis, giardiasis, criptosporidiosis, etc) (Meerburg, Singleton and Kijlstra, 2009).

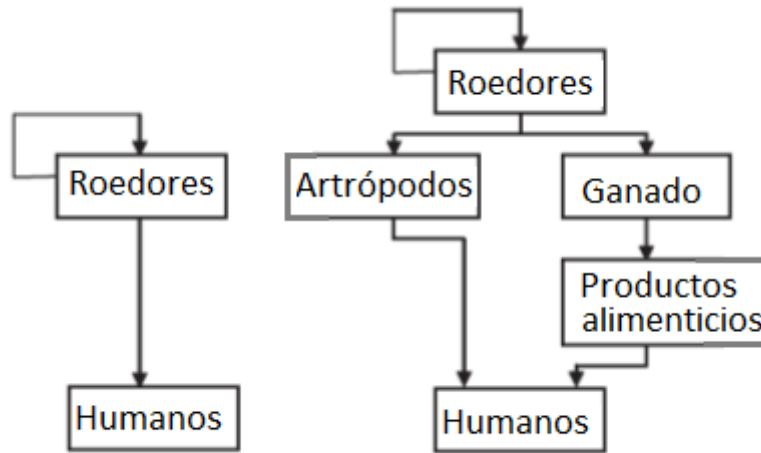


Figura 1. Dos vías de transmisión de patógenos. A la izquierda la ruta directa, a la derecha la ruta indirecta. El patógeno está presente en la flecha del esquema (Meerburg, Singleton and Kijlstra, 2009)

Las principales especies de roedores plaga según datos colectados globalmente son, por mucha diferencia, las ratas y lauchas domésticas, *Rattus norvegicus*, *R. rattus* y *Mus musculus* (Capizzi, Bertolino and Mortelliti, 2014; Ramatla *et al.*, 2019) que son cosmopolitas y alcanzan altas densidades en áreas urbanas, campos de cultivo, sitios de almacenamiento de alimentos y sistemas productivos, como granjas de reproducción y huertos (Buckle and Smith 1994). Hay diversos factores que hacen de las granjas avícolas un lugar apropiado para el desarrollo de las poblaciones de estos roedores, como condiciones favorables de temperatura y alta disponibilidad de alimento, que les permiten reproducirse durante todo el año, por lo que su abundancia no muestra fluctuaciones estacionales como los roedores silvestres que tienen picos de abundancia en otoño, y un mínimo en primavera (Mills *et al.*, 1991; Busch and Kravetz, 1992; Gómez Villafañe, D. Bilenca, *et al.*, 2001; Miño, 2003; Gómez Villafañe and Busch, 2007).

En estas granjas los roedores causan distintos tipos de daño, como matar pollitos, dañar huevos (pueden arruinar un 0,25 % de los huevos), contaminar y consumir alimento balanceado o causar daños a las estructuras de los gallineros (Parshad, Ahmad and Chopra, 1987; Timm, 1987b; Pratt, 1991; Villa and Velasco, 1994).

En una zona de Pakistán se cuantificó el daño producido por roedores en 69 granjas y se estimó que un 0,001% de huevos de aves de corral fueron dañados, fue de un promedio de 31 ± 3.4 huevos por día y fue afectado el 5,9% de bolsas de alimento balanceado (5 ± 0.3 bolsas de alimento por día (Hussain and others, 2016)). En particular, las ratas pueden dañar 5,25 de cada 1000 huevos producidos (Parshad, Ahmad and Chopra, 1987) o según otros registros, dañar un 0,39% de los huevos y matar 0,47% de los pollitos ((Ahmad, Chopra and Sood, 1984). Por otro lado, un estudio de Ifthikar et al (2016) registró consumo de roedores de alimentos para aves en el 76,8% de galpones de almacenamiento de alimentos y daños por roedores en las puertas en el 52,2% de los galpones, valores mayores que los reportados por Corrigan y Williams en 1986 (Corrigan and Williams, 1986). Aunque en porcentaje estos valores parecen bajos, en términos económicos representan pérdidas que afectan a los pequeños productores. Además de que, como se mencionó anteriormente, pueden contagiar diversas enfermedades a las aves y a trabajadores de las granjas, ya sea por consumo de alimentos contaminados o contagio directo.

Las estrategias para prevenir la transmisión de enfermedades dependen de una buena comprensión de la biología y ecología tanto de los hospedadores como de los vectores y reservorios, y en la construcción de modelos epidemiológicos que incluyan factores bióticos y abióticos (Figura 2) como factores ambientales, características de los roedores y de la población humana (Mills and Childs, 1998; Meerburg, 2006). Si bien se

requiere más investigación para descubrir de qué manera es posible interrumpir los ciclos de transmisión, también existe una clara necesidad de integrar las estrategias de prevención.

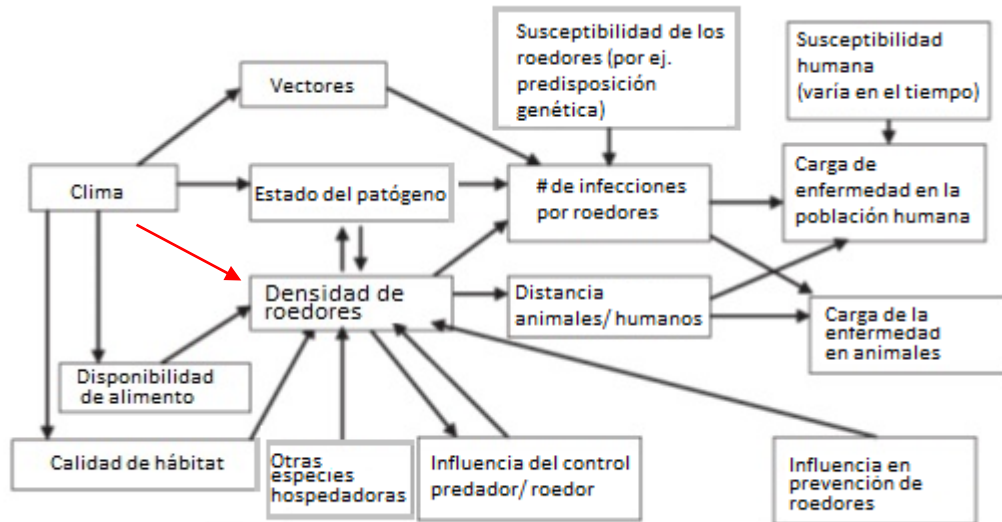


Figura 2. Modelo simplificado de enfermedades asociadas a roedores (modificado de B G Meerburg, Singleton, and Kijlstra 2009). La flecha en color rojo fue añadida según nuestras consideraciones.

En un principio, el principal método para disminuir la densidad de roedores se basó en utilizar venenos de intoxicación aguda como arsénico y fosforo de cinc, pero el consumo por parte de especies no blanco, como las aves, y la acumulación de los mismos en el ambiente, hicieron que no se los considerara una solución viable. El desarrollo de anticoagulantes permitió un control más específico, pero al tener que ser consumidos en varias ingestas para surtir efecto, generaban conductas de evitamiento y la selección de animales resistentes. Estos venenos de primera generación fueron reemplazados por los de segunda generación, efectivos en dosis más pequeñas y en una sola ingesta (Jackson and Ashton, 1992). Sin embargo, aunque el uso generalizado de cebos con anticoagulantes de segunda generación llevó a lograr en muchos casos un control exitoso de roedores plagas, se mantuvieron algunos problemas como la

disminución de su efectividad a lo largo del tiempo porque los roedores pueden desarrollar comportamientos aversivos y resistencia genética (Buckle and Smith, 1994; Hussain and Prescott, 2003; Pelz *et al.*, 2005; Berney *et al.*, 2014; Endepols *et al.*, 2015). Por otra parte, como se encontró para los otros venenos, estudios ecotoxicológicos mostraron efectos de anticoagulantes de segunda generación sobre especies no blanco (vía ingesta primaria o secundaria) (Meerburg *et al.*, 2004; Brakes and Smith, 2005; Geduhn *et al.*, 2015) y estos estudios han impactado en las opiniones públicas e influyeron en la legislación en algunos lugares del mundo (por ejemplo, en Europa la Directiva 98/8/EC y sucesivas enmiendas y correcciones). Además, los efectos de los anticoagulantes se producen luego de unos días de la ingesta, y si bien esto representa una ventaja porque evita que los roedores asocien los síntomas con la ingesta del cebo y luego los eviten, muchas veces mueren en las cuevas, no accesibles para el hombre, y esto puede generar contaminación ambiental con los cadáveres. En muchas ocasiones las medidas orientadas a incrementar la mortalidad de los roedores se aplicaron sin tener en cuenta la biología de las especies, como el efecto de procesos demográficos o mecanismos compensatorios denso dependientes, así como el lugar que ocupan dentro de los ecosistemas. En cambio, el Control Integrado de plagas propone estrategias basadas en el conocimiento de la ecología de las especies involucradas, donde se integran distintos tipos de medidas, como aplicación de rodenticidas, manejo del ambiente y medidas de exclusión de roedores (Singleton *et al.*, 1999; Meerburg *et al.*, 2004).

Nuevas revisiones de estos conceptos proponen que el control de roedores debe enfocarse más en el manejo de la plaga teniendo en cuenta la investigación ecológica y un enfoque de los sistemas (National Research Council 1996). A esto se lo llamó

Manejo de Plagas Basado en Ecología (Ecologically Based Pest Management, EBPM) y sus objetivos son minimizar los efectos adversos sobre las especies no blanco y el medio ambiente; desarrollar un enfoque que sea económico para los usuarios finales, particularmente los agricultores y granjeros; y que sea duradero (Singleton *et al.*, 1999). El EBPM plantea que para que el manejo de las especies sea exitoso, se deben desarrollar estrategias basadas en el conocimiento de la biología reproductiva de la especie, el estudio de las dinámicas poblacionales a largo plazo y simulaciones de crecimiento poblacional (Gosling and Baker, 1989).

Entre las estrategias alternativas aquéllas que reduzcan la natalidad, o que “alejen” mediante alguna señal a las especies plaga sería una solución óptima a los problemas causados por la utilización de venenos que apunten al aumento de la mortalidad.

Entre las medidas que tienden a evitar la colonización por roedores, se han desarrollado nuevos métodos que utilizan señales químicas para crear repelentes efectivos para las especies plagas (Parsons *et al.*, 2018). Este uso potencial de señales químicas se basa en las respuestas fisiológicas y de comportamiento a los olores intraespecíficos o de predadores (Feoktistova *et al.*, 2003; Voznessenskaya *et al.*, 2003; Apfelbach *et al.*, 2005; Voznessenskaya and Malanina, 2013; Brachetta, Schleich and Zenuto, 2015), o frente a metabolitos secundarios de plantas o sustancias tóxicas (Hansen, Stolter and Jacob, 2015; Schlötelburg *et al.*, 2018; Guerisoli *et al.*, 2019). Se utilizan, por ejemplo, como repelentes para alejar a herbívoros de plantaciones forestales o agrícolas, tanto en Argentina como en otras partes del mundo (Sullivan, Nordstrom and Sullivan, 1985; Sullivan *et al.*, 1988; Guerisoli *et al.*, 2019).

A fin de evaluar la utilidad de los olores como método alternativo de control de roedores se exploraron efectos sobre la reproducción (Feoktistova *et al.*, 2003), sobre

la tasa de forrajeo y comportamientos aversivos (Sullivan *et al.*, 1988; Hansen, Stolter and Jacob, 2015). Las respuestas frente a predadores fueron sometidas a una fuerte presión de selección en las presas, y por lo tanto, en muchos casos son innatas, y no dependen del contacto de la presa con los predadores (Fendt 2006, Yin et al. 2011). Experimentos realizados con animales mantenidos durante generaciones en laboratorio, sin contacto con predadores, demostraron que las respuestas se mantenían y en muchos casos se producían frente a un abanico de predadores, no sólo frente a uno específico (Parsons *et al.*, 2018).

La mayoría de los estudios sobre el efecto de los olores se enfocan en lo que ocurre a nivel neurofisiológico mientras que hay menos información sobre el uso de esas respuestas para evitar los daños asociados a roedores, ya sea por sus efectos en la reproducción como por su efecto como repelentes.

De acuerdo al marco general del tema de control de roedores, el objetivo general de esta tesis es evaluar el efecto de olores sobre el éxito reproductivo y el comportamiento de aversión en roedores. Las especies a estudiar fueron seleccionadas por ser las principales plagas en establecimientos avícolas. En particular se evaluará en laboratorio el efecto de olores sobre el éxito reproductivo de hembras de *Mus musculus* y sobre el comportamiento de aversión de *Mus musculus* y *Rattus norvegicus*, a fin de seleccionar un producto que pueda utilizarse en condiciones de campo para el control de estos roedores. La hipótesis general del trabajo es que hay señales químicas derivadas de olores a predadores o de co-específicos que producen efectos negativos sobre el éxito reproductivo de hembras de *Mus musculus* y conductas de aversión tanto en *M. musculus* como en *R. norvegicus*. En esta tesis se utilizaron ejemplares de bioterio como un paso previo al uso de animales silvestres, a

fin de preseleccionar uno o más compuestos, y poder disminuir la cantidad de animales silvestres a utilizar en ensayos posteriores, de acuerdo a la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo (Commission, 2010). Por otro lado, permitió disponer de ejemplares en la cantidad requerida, evitar la exposición a patógenos por parte de los investigadores y disminuir fuentes de variabilidad ajenas al experimento.

La tesis consta de seis capítulos: en el Capítulo 1 (Introducción) se presentan los antecedentes y fundamentos del tema elegido, así como las hipótesis y objetivos generales, en el Capítulo 2 se describen los materiales y métodos generales, en el Capítulo 3 se estudia el efecto de olores sobre el éxito reproductivo de *M. musculus*, en el Capítulo 4 se evalúa el efecto de olores sobre el comportamiento de *M. musculus* y *R. norvegicus*. Finalmente, en el Capítulo 5 se integran y discuten los resultados obtenidos y en el Capítulo 6 se lista la bibliografía citada. Al final hay un anexo donde se presenta información adicional.

Capítulo 2. Materiales y Métodos

Los métodos utilizados para el desarrollo de esta tesis fueron aprobados por la CICUAL de la FCEN, protocolo 88/2019. Los experimentos se realizaron en un bioterio de 35 m² en el predio de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora en el marco de un proyecto de colaboración entre el laboratorio de Ecología de poblaciones de la FCEN y dicha Facultad.

El Dispositivo Experimental constó de 30 cajas plásticas (de 61 x 42 x 33 cm) dentro de las cuales se ubicaron en forma individual las jaulas de roedores (41 x 32 x 17 cm). En las jaulas los animales tenían espacio para permanecer, desplazarse, y con el ambiente enriquecido (para que tenga la complejidad suficiente que les permita expresar una amplia gama de comportamientos normales), cama de aserrín, comida (alimento balanceado extrusado Cooperación rata-ratón) y agua *ad libitum* de acuerdo a las recomendaciones de la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo (Commission, 2010).

Las cajas plásticas se ubicaron sobre estanterías y fueron conectadas a un sistema de ingreso y salida del aire, de manera que los olores percibidos en cada una de ellas durante los experimentos del capítulo 3 fueran independientes (Figura 3).



Figura 3. Dispositivo experimental utilizado para el mantenimiento aislado de los individuos.

Los roedores utilizados para los experimentos provinieron del Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Se trabajó con ejemplares de cepa CF1 de laucha doméstica (*Mus musculus*) y ratas albinas (*Rattus norvegicus*) de cepa Wistar. Se seleccionaron estas cepas debido a que son exocriadas, por lo que aportan variabilidad genética e independencia de las unidades experimentales.

Los ejemplares utilizados fueron adultos de entre 6 y 8 semanas de edad en el caso de la laucha doméstica y de 7 a 8 semanas de edad en el caso de ratas, momento en el cual alcanzan la edad reproductiva, o sea la adultez (Maeda, Ohkura and Tsukamura, 2000; Fuentes Paredes *et al.*, 2010). Los roedores fueron mantenidos hasta el momento de los experimentos en jaulas individuales, asignadas al azar, con fotoperíodo de 12 hs luz/oscuridad y temperatura entre 15 – 20 °C. Animales con

comportamientos anómalos o estereotipados (conductas repetitivas, invariables y sin función inmediata aparente como correr en círculos, limpiarse con las uñas hasta lastimarse, morderse sin parar) fueron retirados del experimento para su sacrificio, según la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo (Commission, 2010) ya que son alteraciones o trastornos del comportamiento normal.

Todos los experimentos se diseñaron y se describieron en esta tesis bajo la guía ARRIVE, realizada por el Centro Nacional para el Reemplazo, Reducción y Refinamiento de Animales en la Investigación (NC3R), una organización científica patrocinada por el gobierno del Reino Unido. Esta guía provee pautas desarrolladas para optimizar la información que se proporciona en las investigaciones con animales acerca del diseño experimental, la realización y el análisis de los experimentos (Kilkenny *et al.*, 2010; Du Sert *et al.*, 2020).

CAPÍTULO 3. Evaluación del efecto de olores sobre el éxito reproductivo de hembras de *Mus musculus* en condiciones de laboratorio

Introducción

Uno de los problemas que se presentan para el control efectivo de roedores plaga es que es muy difícil eliminar a toda la población, problema agravado cuando existen individuos resistentes a los anticoagulantes. Los individuos remanentes suelen tener respuestas compensatorias denso- dependientes que aumentan su tasa reproductiva, y debido a que la tasa de crecimiento poblacional es más sensible a cambios en la tasa de natalidad que en la de mortalidad (Southwood and Henderson, 2000), las poblaciones se recuperan al cabo de un tiempo de aplicado un control con venenos. Este proceso se ve favorecido en los sistemas de producción animal y en particular las granjas avícolas, donde las condiciones ambientales y la disponibilidad de alimento favorecen la rápida reproducción (Gómez Villafañe, D. N. Bilenca, *et al.*, 2001; Gómez Villafañe *et al.*, 2003; Miño *et al.*, 2007).

Por lo tanto, el desarrollo de métodos que reduzcan el éxito reproductivo es de vital importancia para el éxito de las medidas de control. Existen diversos estudios que muestran que existe un efecto de olores sobre el éxito reproductivo de roedores, ya sean señales intra-específicas, o señales de predadores (Parkes and Bruce, 1961). Estas señales pueden tener efecto en distintas etapas del proceso reproductivo, desde la preñez hasta la supervivencia de crías y este efecto está relacionado con respuestas neurofisiológicas asociadas a un estado de estrés que produce la liberación de sustancias que desencadenan fallas en la reproducción y pueden ser producidas

también por sustancias aisladas que se encuentran presentes en la orina o heces de coespecíficos o predadores.

Entre los olores a coespecíficos, es muy conocido el efecto Bruce, por el cual se producen abortos en hembras preñadas que se exponen al olor de un macho distinto a aquel con el que se aparearon (macho extraño), especialmente en los 4 primeros días luego de la fecundación (Bruce 1961). Esto se ha demostrado utilizando como fuentes de olor tanto al individuo como el material de cama (Bruce, 1960, 1961; DeCatanzaro *et al.*, 1995; deCatanzaro, Zacharias and Muir, 1996). Este efecto puede variar en efectividad según la cepa del ratón (Parkes and Bruce, 1961; DeCatanzaro *et al.*, 1995) y se anula si la hembra no puede percibir el olor, remarcando el rol del sistema olfatorio en esos procesos (Bruce and Parrott, 1960; Rajendren and Dominic, 1986).

A nivel hormonal, se encontró que el compuesto responsable de este efecto es el 17 β -estradiol, confirmando el importante rol que cumplen los estrógenos en la reproducción, ya que aplicado de manera aislada es capaz de disminuir la cantidad de crías o puede bloquear la preñez (Dominic, 1965; DeCatanzaro, Baptista and Spironello-Vella, 2001; Beaton and DeCatanzaro, 2005; DeCatanzaro *et al.*, 2006).

Otro efecto de co-específicos es la respuesta al hacinamiento, que genera olores asociados a la digestión de proteínas que pueden ser indicadores de falta de alimento y generan una inhibición en la reproducción (Voznessenskaya *et al.* 2003).

Particularmente en *M. musculus*, en un estudio realizado en granjas avícolas de la Provincia de Buenos Aires, se observó una disminución en la cantidad de crías producidas en hembras en condiciones de hacinamiento (Burrioni, Loetti and Busch, 2014).

En cuanto al efecto de olores a predadores, la mayoría de las especies, especialmente mamíferos, utilizan el sistema del olfato para identificar señales de peligro, y los roedores no son la excepción. La capacidad de percibir el peligro a distancia provee una ventaja adaptativa ya que les da mayor posibilidad de escape. En roedores está registrada la reacción de “miedo” frente a señales de predadores como restos de orina, heces, piel o pelaje, incluso aunque no hayan estado nunca expuestos a un predador (Parsons *et al.*, 2018). Las respuestas están relacionadas con el estrés que produce la liberación de sustancias que desencadenan fallas en la reproducción y pueden ser producidas también por sustancias aisladas presentes en las heces u orina de predadores, como el TMT y la felinina. El TMT es un compuesto derivado del azufre que está presente en heces de zorro, y por su composición volátil puede generar la misma respuesta de miedo que el olor a predador (Vernet-Maury, 1980; Vernet-Maury, Polak and Demael, 1984; Morrow *et al.*, 2000; Staples and McGregor, 2006; Rosen, Asok and Chakraborty, 2015), sin embargo, algunos autores consideran que no es una auténtica señal de riesgo de predación, sino que actúa como irritante (Dielenberg and McGregor, 2001; Buron *et al.*, 2007). Como el olor a predador puede afectar negativamente el éxito reproductivo de roedores de laboratorio o silvestres, ya sea por bloqueo de preñez o por reducción en la cantidad de crías (Vasilieva *et al.*, 2000; Naidenko *et al.*, 2003; Voznessenskaya *et al.*, 2003), podría esperarse que el TMT produzca el mismo efecto.

Como mencioné anteriormente, la mayoría de los estudios sobre estos olores se enfocan en lo que ocurre a nivel fisiológico de los roedores, y pocos a nivel de utilidades ecológicas de estos efectos.

En base a lo anterior, el objetivo general de este capítulo es evaluar el efecto de distintas señales olfativas sobre el éxito reproductivo de hembras de *M. musculus*. Los olores específicos que se evaluaron fueron: (i) orina de un macho extraño, (ii) β -estradiol, (iii) TMT, (iv) orina de predador (gato doméstico) y (v) orina de co-específicos en condiciones de hacinamiento.

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de olor a orina de macho extraño sobre el éxito reproductivo de hembras adultas de *M. musculus* de bioterio.
2. Evaluar el efecto de olor a β -estradiol (compuesto presente en la orina de roedores macho) sobre el éxito reproductivo de hembras adultas de *M. musculus* de bioterio.
3. Evaluar el efecto de olor a orina de co-específico hacinado sobre el éxito reproductivo de hembras adultas de *M. musculus* de bioterio.
4. Evaluar el efecto de olor a 2,5-Dihydro-2,4,5-Trimethylthiazoline (TMT, compuesto presente en la orina de zorro que su puede obtener comercialmente) sobre el éxito reproductivo de hembras adultas de *M. musculus* de bioterio.
5. Evaluar el efecto de olor a orina de gato alimentado con carne sobre el éxito reproductivo de hembras adultas de *M. musculus* de bioterio.
6. Analizar si el efecto de los olores sobre la reproducción se ve afectado por la frecuencia a la cual se exponen a los roedores.

Hipótesis

Para cada uno de estos olores, la hipótesis es que van a afectar negativamente el éxito reproductivo en alguna de las etapas desde la preñez al destete.

Como estimadores del éxito reproductivo de hembras de *M. musculus* se utilizaron las siguientes variables respuesta:

- 1) Preñez (1=presencia de al menos una cicatriz uterina, 0= ausencia de cicatrices uterinas)
- 2) Proporción de abortos por hembra ((Número de cicatrices uterinas- cantidad de crías al nacer)/ número de cicatrices uterinas)
- 3) Éxito de preñez (1= al menos una cría nacida, 0= sin crías nacidas) para las hembras que registraron preñez.
- 4) Cantidad de crías nacidas por hembra, considerando sólo las hembras que tuvieron al menos una cría.
- 5) Cantidad de crías al destete por hembra, considerando sólo las hembras que tuvieron al menos una cría.
- 6) Peso de las crías al nacer (promedio por camada)
- 7) Peso de las crías al destete (promedio por camada)
- 8) Proporción de mortalidad de crías por hembra (Proporción de crías muertas entre el nacimiento y el destete)
- 9) Cantidad de crías nacidas por hembra por tratamiento (considerando los efectos desde el apareamiento hasta el nacimiento, se incluye el efecto de la ausencia de preñez).

10) Cantidad de crías destetadas por hembra por tratamiento (considerando los efectos desde el apareamiento hasta el destete, se incluye el efecto de la ausencia de preñez).

Para todas las hipótesis, las predicciones son que hembras sometidas a los olores desde el apareamiento hasta el destete de crías mostrarán al menos alguno de los siguientes efectos, comparados con individuos controles:

- Menor éxito de preñez
- Menor tamaño de camada
- Mayor proporción de abortos
- Menor peso de las crías al nacer
- Menor supervivencia de crías hasta el nacimiento
- Menor supervivencia de crías hasta el destete
- Menor peso de crías al destete
- Menor producción total de crías (efecto acumulado de los efectos en las distintas etapas desde preñez al destete)

Materiales y métodos

Procedimientos generales. Los ejemplares hembras fueron aclimatados a las condiciones del bioterio durante un periodo de 15 días. Al cabo de 10-15 días se introdujo un macho en cada jaula y se aplicaron los tratamientos: olor a β -estradiol, individuos hacinados, macho extraño, orina de gato, TMT, control (agua destilada). Los olores fueron aplicados en la caja donde estaban alojados los individuos, pero por

fuera de la jaula, de manera de evitar un contacto directo. En una primera parte se realizaron experimentos en los cuales los olores fueron renovados cada 4 días, y en una segunda etapa con mayor frecuencia de aplicación, cada dos días.

En la Tabla 1 se detallan la forma de aplicación de los olores y el número de réplicas de cada tratamiento. Estas variaron dependiendo de la cantidad de animales disponibles. Dado que el bioterio cuenta con 30 cajas, las réplicas de los tratamientos se efectuaron por etapas. Las concentraciones y las formas de aplicación fueron seleccionadas basadas en datos de la bibliografía (Zacharias, de Catanzaro and Muir, 2000; Blanchard *et al.*, 2003; Blanchard, Griebel and Blanchard, 2003; Voznessenskaya *et al.*, 2003), excepto los tratamiento “macho extraño” y “Co-especifico hacinado”, que se decidieron en base al trabajo en el bioterio.

Tabla 1. Numero de réplicas y forma de aplicación de cada tratamiento para cada olor. Aclaraciones: las diferencias de 17 β - estradiol entre etapas se debe al error de manipulación del material. La orina de gato fue colectada de individuos entrenados para orinar en bandejas, luego colocada en tubos eppendorfs y mantenidos a -18 °C hasta su utilización.

Etapa	Tratamiento	Modo de aplicación	Réplicas
1	<i>Control</i>	2 gotas de agua destilada sobre papel tissue	29
	<i>Macho extraño</i>	10 gr de cama de un macho con el que la hembra no fue apareada sobre papel tissue	20
	<i>Co-especifico hacinado</i>	10 gr de cama de 4 individuos alojados de manera individual, pero que comparten un espacio de 1 m ³ sobre un papel tissue	20
	<i>17β- estradiol</i>	0,00028 gr de 17 β - estradiol disueltos en 2 gotas de aceite de maíz colocados sobre un papel tissue	30
	<i>TMT</i>	2 gotas de TMT al 98% (obtenido comercialmente, Merck) sobre un papel tissue	30
	<i>Orina de gato</i>	2 gotas de orina de gato* alimentado con carne, mantenida a -18 °C y descongelada al momento de utilizar, colocada sobre un papel tissue	20

2	<i>Control</i>	2 gotas de agua destilada sobre papel tissue	20
	<i>17β- estradiol</i>	0,00027 gr de 17β- estradiol disueltos en 2 gotas de aceite de maíz colocados sobre un papel tissue	20
	<i>TMT</i>	2 gotas de TMT al 98% (obtenido comercialmente, Merck) sobre un papel tissue	20

Luego de introducir los machos en las jaulas se controló a las hembras diariamente para registrar preñez, en caso positivo se retiraron los machos. De lo contrario, estos fueron retirados a los 15 días de iniciado el experimento.

CAPÍTULO 3. Parte 1

Los resultados de esta parte del fueron publicados en la revista Pest Management

*Science: Adduci, L. B., León, V. A., Busch, M., & Fraschina, J. (2019). Effects of different odours on the reproductive success of *Mus musculus* as an alternative method of control. *Pest Management Science*. 75(7), 1887-1893*

Análisis de resultados

A fin de evaluar los efectos de los tratamientos sobre las variables 1 a 8 se utilizaron modelos lineales generalizados mixtos (GLMMs), utilizando los paquetes GLMM TMB (Brooks et al 2017, Magnusson 2017), Matrix (Bates et al 2016) y lme4 (Bates et al 2015). Los modelos fueron analizados mediante el programa R (versión 3.1.2 año 2016). Para las variables 1, 2, 3, y 8 se asumió una estructura de errores con distribución binomial, para las variables 4 y 5, una estructura de errores con distribución de Poisson alterada en ceros (ZAP). Para las variables 6 y 7 se asumió una distribución normal de errores. En los modelos se incluyó el tiempo como factor aleatorio, debido a que no se realizaron todas las réplicas al mismo tiempo. En los modelos para la respuesta de las variables 2 y 8 (proporción de abortos y proporción de mortalidad de crías entre el nacimiento y el destete) también se incluyó a la hembra como factor aleatorio para corregir la sobre dispersión del modelo. La cantidad de réplicas se informó en la Tabla 1. Debido a que lo que se quería evaluar era la diferencia de los tratamientos con olores respecto al tratamiento control, se forzó a que en los modelos el control quedara incluido en la ordenada al origen.

Se utilizó la corrección de Bonferroni para el p valor dado que se analizaron 8 variables respuesta para el mismo set de datos, quedando un p valor de 0,00625 (0,05/8). La cantidad de crías nacidas por hembra por tratamiento y la cantidad destetada por hembra por tratamiento fueron comparadas con el valor esperado de acuerdo al total de crías producidas por las hembras del tratamiento más las del control y el número de réplicas del tratamiento mediante un test de χ^2 (Zar, 1999): Número esperado de crías del tratamiento = $\frac{((\text{número de crías del tratamiento} + \text{número de crías del control})) \times \text{número de hembras del tratamiento}}{(\text{número de hembras del tratamiento} + \text{número de hembras del control})}$.

A fin de hacer una proyección del efecto de una disminución del éxito reproductivo sobre el crecimiento poblacional se realizó una simulación mediante el programa Excel, asumiendo un crecimiento exponencial discreto con parámetro λ (estimado de acuerdo al número promedio de crías que llegan al destete asumiendo ausencia de mortalidad posterior al destete, o que no difiere entre tratamientos, de manera que la tasa de crecimiento poblacional depende sólo de la tasa de reproducción): $\lambda = \exp(\ln R_0/T)$, donde **T** es el tiempo generacional (1,5 meses en este caso). Si asumimos crecimiento exponencial, $N_{t+1} = N_t * \lambda$, donde N_t es el tamaño poblacional al momento **t** y N_{t+1} es el tamaño poblacional al tiempo **t+1**. Esto se realizó para el tratamiento que tuvo efectos significativos. Se realizaron dos simulaciones, una asumiendo aplicación continua del tratamiento, y la otra con interrupciones a fin de evitar efectos de habituación o respuestas compensatorias. Las tablas nombradas con la letra "A" al principio, corresponden al Anexo.

Resultados

En total se produjeron 1247 crías a partir de un 87% de hembras que quedaron preñadas. La proporción de abortos por hembra varió entre 12% y 35% según el tratamiento (Tabla 2). Las hembras expuestas a olor a orina de gato tuvieron una mayor proporción de abortos por hembra que las sometidas al tratamiento control (Odds ratio=3.91, $p < 0.001$, Tabla A1), y según los GLMMs ésta fue la única variable que fue afectada significativamente por ese tratamiento (Tabla A2, Tabla A3, Tabla A4, Tabla A5, Tabla A6, Tabla A7, Tabla A8).

Las hembras expuestas a TMT tuvieron menor éxito de preñez, menor cantidad de crías nacidas y al destete por hembra, y menor peso de las crías al nacer que el control (Tabla 2). Aunque las diferencias no fueron significativas, el efecto acumulativo de este tratamiento desde la preñez hasta el nacimiento de las crías resultó en un menor número de crías nacidas totales y un menor número de crías al destete totales respecto al control (Tabla 2; $\chi^2 = 9,83$, $p = 0,0017$ para las crías totales nacidas y $\chi^2 = 6,48$, $p = 0,0109$ para la cantidad de crías totales vivas al destete).

Las hembras expuestas a olor a macho extraño tuvieron una menor cantidad de crías al nacer respecto a las esperadas (Tabla 2; $\chi^2 = 4,24$, $p = 0,039$) aunque el número observado de crías vivas al destete no fue diferente al valor esperado (Tabla 2; $\chi^2 = 1,52$, $p = 0,217$). Los otros tratamientos no tuvieron efecto significativo en el éxito reproductivo de hembras de *M. musculus*.

Tabla 2: Éxito reproductivo de hembras de *Mus musculus* según cada tratamiento con reposición de olor cada 4 días (*= p<0.00625 o **p<0.001). Las variables (4) y (5) tienen en cuenta sólo a las hembras que tuvieron crías, en cambio las variables (9) y (10) contemplan a todas las hembras (incluías las que tuvieron 0 crías)

	Preñez (%)	Abortos (%)	Éxito preñez (%)	Crías nacidas por hembra	Crías al destete por hembra	Peso de las crías al nacer (g)	Peso de las crías al destete (g)	Mortalidad (%)	Cantidad de crías totales nacidas	Cantidad de crías totales al destete
Variable	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Macho extraño	75	12	75	9,87	7,93	1,67	10,02	19	7,4 *	5,95
17β-estradiol	93	28	87	9,09	5,82	1,57	8,39	28	9,23	6,33
TMT	77	31	70	10,2	7,85	1,49	9,67	22	6,85*	5,23*
Orina de gato	100	35**	85	9,59	7,65	1,66	9,04	19	8,15	6,5
Co-específico	95	25	85	11,12	7,59	1,6	7,33	27	9,45	6,45
hacinado										
Control	86	15	83	11,04	8,29	1,54	8,75	24	9,14	6,86
Total	87	15	80	10,28	7,67	1,55	8,18	24	8,37	6,20

La proyección del crecimiento poblacional se realizó sólo para los tratamientos TMT y Control. Los valores estimados de R_0 para el grupo control y para el tratado con TMT fueron 3,43 y 2,61, respectivamente. Las tasas finitas de crecimiento poblacional fueron: $\lambda_{\text{Control}} = 2,274$ y $\lambda_{\text{TMT}} = 1,896$. Comenzando con una hembra para cada grupo, después de 6 meses, el número de hembras es 60,8 para el Control *versus* 24,30 para el grupo tratado con TMT; después de 1 año, los números son 8409,45 y 1138,00, respectivamente (una disminución de ~86,5%) (Fig. 4a).

Si en lugar de una aplicación continua de olores, que puede llevar a la habituación, la aplicación es durante 2 meses (durante los cuales el crecimiento se realiza de acuerdo al parámetro mencionado anteriormente, $\lambda_{\text{TMT}} = 1,896$), con una interrupción de 3 meses (en la que el crecimiento es de acuerdo con $\lambda_{\text{Control}} = 2,274$), después de 1 año, la cantidad de hembras en el grupo TMT serían 3387,93, que corresponde a una reducción de 59,7% con respecto al Control (Fig. 4b).

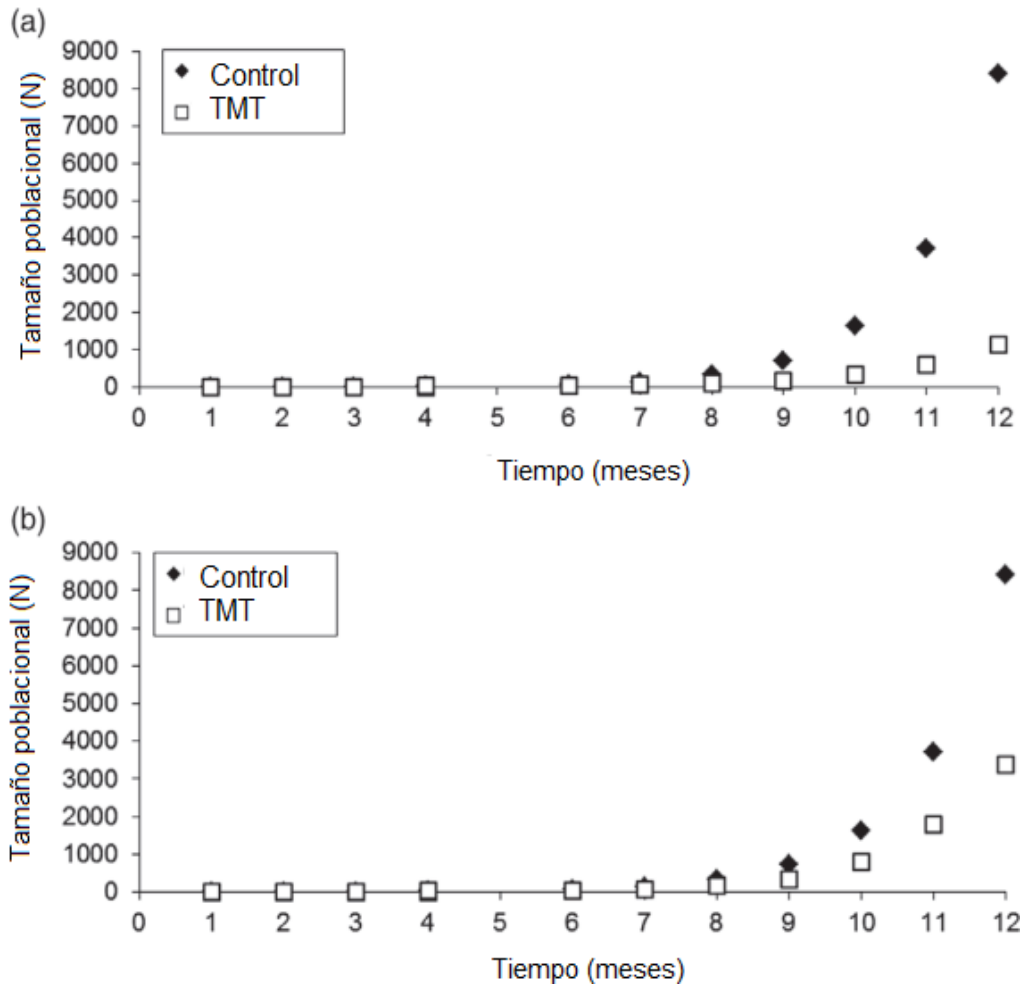


Figura 4. Proyección del crecimiento poblacional para los tratamientos Control y 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT) de acuerdo al modelo de crecimiento exponencial, donde $\lambda_{\text{Control}}=2,274$ y $\lambda_{\text{TMT}}=1,896$. Tiempo generacional (T) =1,5 meses. (a) Aplicación continua del olor, (b) aplicación discontinua del olor.

CAPÍTULO 3. Parte 2

Segunda etapa. Renovación de olores cada 2 días

A fin de evaluar el efecto de la aplicación de olores con mayor frecuencia, se realizó un experimento siguiendo los mismos métodos que en la etapa 1, donde lo único que cambió fue la renovación de olores cada dos días. El experimento fue realizado para los olores TMT y 17β -estradiol, debido a que fueron los olores que en los que se encontró un efecto sobre la cantidad de crías nacidas o destetadas en análisis preliminares (que no resultaron ser los definitivos). El número de réplicas por tratamiento fue de 20 individuos (Tabla 1).

Análisis de resultados

A fin de evaluar los efectos de los tratamientos sobre las variables 1 a 8 se utilizaron modelos lineales generalizados mixtos (GLMMs), utilizando los paquetes GLMM TMB (Brooks et al 2017, Magnusson 2017), Matrix (Bates et al 2016) y lme4 (Bates et al 2015). Los modelos fueron analizados mediante el programa R (versión 3.1.2 año 2016). Para las variables 1, 2, 3, y 8 se asumió una estructura de errores con distribución binomial, para la variable 4 se utilizó una estructura Conway-Maxwell Poisson, para la variable 5 una estructura de errores con distribución de Poisson alterada en ceros (ZAP). Para las variables 6 y 7 se asumió una distribución normal de errores. En los modelos se incluyó el tiempo como factor aleatorio, debido a que no se realizaron todas las réplicas al mismo tiempo. En los modelos para la respuesta de las variables 2 y 8 (proporción de abortos y proporción de mortalidad de crías entre el

nacimiento y el destete) también se incluyó a la hembra como factor aleatorio para corregir la sobre dispersión del modelo. Debido a que lo que se quería evaluar era la diferencia de los tratamientos con olores respecto al tratamiento control, se forzó a que en los modelos el control quedara incluido en la ordenada al origen.

Se utilizó la corrección de Bonferroni para el p valor dado que se analizaron 8 variables respuesta para el mismo set de datos, quedando un p valor de 0,00625 (0,05/8). La cantidad de crías nacidas por tratamiento y la cantidad de crías que llegaron vivas al destete en cada tratamiento fueron comparadas con el valor esperado de acuerdo al total de crías producidas por las hembras del tratamiento más las del control y el número de réplicas del tratamiento mediante un test de χ^2 (Zar, 1999): Número esperado de crías del tratamiento = $((\text{número de crías del tratamiento} + \text{número de crías del control}) / (\text{número de hembras del tratamiento} + \text{número de hembras del control})) \times \text{número de hembras del tratamiento}$. Las tablas nombradas con la letra "A" al principio, corresponden al Anexo.

Resultados

De las 60 hembras, un 92% quedaron preñadas y se produjeron 530 crías. Se obtuvieron camadas de 9,63 crías por hembra, en promedio. Ninguno de los tratamientos aplicados mostró efecto significativo sobre las variables reproductivas (Tablas A9, A10, A11, A12, A13, A14, A15, A16), aunque para el TMT se observó una mayor proporción de abortos, menor éxito de preñez, y menor número de crías nacidas por hembra que el control, el efecto acumulado no fue significativo (Tabla 3).

Tabla 3: Éxito reproductivo de hembras de *Mus musculus* según cada tratamiento con reposición de olor cada 2 días (*= p<0.00625 o **p<0.001). La variable (4) y (5) tiene en cuenta sólo a las hembras que tuvieron crías, en cambio las variables (9) y (10) contempla a todas las hembras (incluía las que tuvieron 0 crías)

	Preñez (%)	Abortos (%)	Éxito preñez (%)	Crías nacidas por hembra	Crías al destete por hembra	Peso de las crías al nacer (g)	Peso de las crías al destete (g)	Mortalidad (%)	Cantidad de crías totales nacidas	Cantidad de crías totales al destete
Variable	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
17β-estradiol	90	22	90	9,39	8,61	1,73	10,73	8	8,45	7,75
TMT	95	21	90	9,44	7,83	1,58	12,57	16	8,50	7,05
Control	95	20	95	10,05	7,05	1,62	12,21	21	9,55	6,7
Total	93	21	92	9,63	7,82	1,63	11,82	15	8,83	7,16

CAPÍTULO 3. COMPARACIÓN de la Parte 1 y la Parte 2

Para analizar en conjunto el efecto de la aplicación de distintos olores y la frecuencia de aplicación del olor, para los olores que se aplicaron con las dos frecuencias se realizaron GLMM con las mismas variables respuesta pero donde las variables explicativas fueron control, TMT con reposición 2 días, TMT con reposición 4 días, 17β -estradiol con reposición cada 2 días y 17β -estradiol con reposición 4 días. En este caso, las réplicas del control fueron la suma de las réplicas realizadas con frecuencia de aplicación cada 2 días (eran 20 réplicas), y con frecuencia de aplicación cada 4 días (29 réplicas). Esta decisión se tomó ya que si bien queda desbalanceado respecto a los demás tratamientos (Tabla 4), preferí sobrerrepresentar la variabilidad natural antes que seleccionar al azar algunas réplicas y perder precisión en el control.

Se utilizaron los paquetes GLMM TMB (Brooks *et al.*, 2017; Magnusson *et al.*, 2017), Matrix (Bates and Maechler, 2016) y lme4 (Bates *et al.*, 2015). Los modelos fueron analizados mediante el programa R (versión 3.1.2 año 2016). Para las variables 1, 2, 3, y 8 se asumió una estructura de errores con distribución binomial, para las variables 4 y 5 se utilizó una estructura de errores con distribución de Poisson alterada en ceros (ZAP). Para las variables 6 y 7 se asumió una distribución normal de errores. En los modelos se incluyó el tiempo como factor aleatorio, debido a que no se realizaron todas las réplicas al mismo tiempo. En los modelos para la respuesta de las variables 2 y 8 (proporción de abortos y proporción de mortalidad de crías entre el nacimiento y el destete) también se incluyó a la hembra como factor aleatorio para corregir la sobre dispersión del modelo. Debido a que lo que se quería evaluar era la diferencia de los

tratamientos con olores respecto al tratamiento control, se forzó a que en los modelos el control quedara incluido en la ordenada al origen.

Se utilizó la corrección de Bonferroni para el p valor dado que se analizaron 8 variables respuesta para el mismo set de datos, quedando un p valor de 0,00625 (0,05/8).

La cantidad de crías nacidas por hembra por tratamiento y la cantidad de crías destetadas por hembra por tratamiento fueron comparadas con el valor esperado de acuerdo al total de crías producidas por las hembras del tratamiento más las del control y el número de réplicas del tratamiento mediante un test de χ^2 (Zar, 1999):
Numero esperado de crías del tratamiento= ((número de crías del tratamiento + número de crías del control)/(número de hembras del tratamiento + número de hembras del control)) x número de hembras del tratamiento. Las tablas nombradas con la letra "A" al principio, corresponden al Anexo.

Resultados

Con una frecuencia de aplicación cada 4 días se observó un menor éxito de preñez, mayor proporción de abortos por hembra, una menor cantidad de crías al destete por hembra, un menor peso de las crías al nacer y al destete, una mayor proporción de mortalidad de crías por hembra (Tabla 4). Si bien no todas estas diferencias fueron significativas, la tendencia se observó en varias de las variables estudiadas (Tablas A17, A18, A19, A20, A21, A22, A23, A24).

Tabla 4. Cantidad de réplicas y resultados del éxito reproductivo de hembras de *Mus musculus* según cada tratamiento, comparando distintas frecuencias de aplicación de los olores (*= p<0.00625 o **p<0.001). Las variables (4) y (5) tiene en cuenta sólo a las hembras que tuvieron crías, en cambio las variables (9) y (10) contempla a todas las hembras (incluías las que tuvieron 0 crías)

Frecuencia	Variable	Réplicas	Preñez (%)	Abortos (%)	Éxito preñez (%)	Crías nacidas por hembra	Crías al destete por hembra	Peso de las crías al nacer	Peso de las crías al destete (g)	Mortalidad (%)	Cantidad de crías totales nacidas	Cantidad de crías totales al destete
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
2 días	Control	49	90	17	88	10,6	7,74	1,54	9,9	23	9,3	6,8
	17β-estradiol	20	90	22	90	9,39	8,61	1,72	10,06	8	8,45	7,75
	TMT	20	95	21	90	9,44	7,83	1,57	11,6	16	8,50	7,05
4 días	17β-estradiol	30	93	19	83	11,08	7,6	1,57	8,39	29	9,23	6,33
	TMT	30	77	22	67	10,2	7,85	1,49	9,67	23	6,8*	5,23*
Total		149	89	19,6	83,2	10,3	7,9	1,57	9,8	21	8,57	6,55

Como lo analizado en la primer parte, las variables de cantidad de crías totales nacidas, y la cantidad de crías totales al destete, demuestran una disminución significativa para el TMT con reposición de olor cada 4 días, respecto al control (Tabla 4, p=0,0053, y p=0,048 respectivamente).

Discusión

Los resultados de los experimentos realizados resaltan la importancia de las condiciones experimentales y dan un alerta sobre la necesidad de interpretar los resultados de acuerdo a éstas. En la primer etapa, con reposición cada 4 días, obtuvimos evidencias de un efecto de dos de los olores relacionados con el riesgo de depredación (la orina del gato y el TMT) sobre el éxito reproductivo de *M. musculus*, mientras que al aumentar la frecuencia de aplicación, contrariamente a lo esperado, en el TMT no se detectó un efecto significativo.

En los experimentos con reposición de olores cada 4 días, el olor a orina de gato aumentó significativamente la proporción de abortos (pérdidas post-implantación) por hembra con respecto al control, como se observó anteriormente en ratas (Voznessenskaya *et al.*, 2003), pero este efecto no se tradujo en un menor tamaño de camada al nacer, lo que sugiere que podría haber un efecto compensatorio que aumente la supervivencia de los embriones después de la implantación. El efecto de la orina de gato sobre la reproducción de roedores ha sido atribuido a la presencia de compuestos de azufre que pueden resultar de la digestión de la carne, y a la presencia de felinina, un aminoácido que contiene azufre y que es un componente importante en la orina de gatos domésticos y otros felinos, y se asocia con marcas territoriales. La orina utilizada en el presente estudio se recolectó de hembras castradas que contienen menor concentración de felinina que los machos, y aún así los resultados fueron significativos. Por otro lado, al ser alimentadas con carne, se asume que en la orina estaban presentes productos con azufre derivados de la digestión de la carne. Una limitación de nuestro estudio en este sentido es que no contamos con un análisis de los componentes de la orina, sino que fueron asumidos de acuerdo a la bibliografía. Por otro lado, el olor de TMT (compuesto de azufre presente en las heces de zorros) tuvo efectos débiles sobre muchas variables individuales, pero que condujeron a un efecto acumulativo desde la preñez hasta el nacimiento y el destete que derivó en un número significativamente menor de crías nacidas y un número más bajo de crías vivas al destete por hembra que en el control. Como se esperaba según el efecto Bruce, el olor de un macho extraño produjo una disminución en el número promedio de hijos nacidos por hembra, probablemente debido a un efecto pre-implantación, porque este tratamiento no causó un aumento en la proporción de abortos.

En un estudio anterior con *M. musculus* silvestres, se encontró que el olor de co-específicos hacinados produjo una disminución en el éxito reproductivo de las hembras, un efecto no detectado en el presente estudio. Esta diferencia podría estar relacionada con el origen de los animales, ya que los animales de laboratorio se crían en habitaciones con olores a co-específicos y con frecuencia se mantienen varios individuos en una sola jaula, mientras que en condiciones naturales los animales silvestres no están habituados al hacinamiento.

Las simulaciones fueron simplificaciones en las que no se incorporaron factores ambientales o poblacionales que pueden cambiar los resultados, tales como respuestas dependientes de la densidad que pueden compensar la disminución en el número de descendientes producidos, pero muestran el potencial efecto de la disminución de la tasa de natalidad sobre el crecimiento de la población. Según Southwood (Southwood and Henderson, 2009) los efectos de la disminución en la tasa de natalidad sobre la tasa de crecimiento poblacional son mayores que los efectos de un aumento en la tasa de mortalidad, por lo que un método de control basado en la disminución de la reproducción sería más exitoso que uno basado en la mortalidad, como la aplicación de tóxicos. Además, se podrían evitar algunos efectos no deseados de la aplicación de rodenticidas, como mortalidad de especies no blanco.

Con respecto a la segunda parte en que los olores se repusieron cada dos días, si bien la tendencia en el efecto del TMT se mantiene, el efecto acumulado sobre la producción de crías por hembra no es significativo.

Hay pocos estudios en roedores en que se comparen los efectos de distintas frecuencias de aplicación o distintas dosis de olores. En insectos se ha observado que la estimulación de los receptores olfatorios (que son específicos, dependiendo de la

relevancia del olor para la especie) puede provocar el aumento o disminución de los impulsos nerviosos, y el decremento de los mismos puede corresponderse con niveles altos de exposición a estímulos o con aplicación de estímulos fuertes, como lo fue en este caso (Visser 1986). De hecho, en mamíferos el aumento de la concentración del estímulo olfatorio puede revertir el efecto del mismo estímulo a menor frecuencia (Buck, 2004).

En mamíferos, el bulbo olfatorio tiene gran plasticidad y puede modificarse según los estímulos recibidos y los patrones de respuesta efectuados, por lo tanto el ratón puede cambiar su respuesta si percibe la amenaza de predador anticipada por el olor, pero éste nunca aparece (Mandairon and Linster, 2009). En nuestro caso, se revirtió la relación entre los olores y el tratamiento control respecto a las crías nacidas y destetadas. Si bien en el caso de nuestro trabajo lo que cambió no fue la concentración, sino la frecuencia, aumentar la frecuencia de reposición del olor genera un aumento de concentración del olor en el ambiente. Otra alternativa es que el menor tamaño de camada haya aumentado la probabilidad de supervivencia de las crías en el tratamiento de TMT.

Una explicación alternativa es que los animales de la segunda serie, no mostraran efectos de los olores, independientemente de la frecuencia de aplicación del olor. De acuerdo con esto, para obtener resultados más concluyentes se debería aumentar el número de animales estudiados para las dos frecuencias de aplicación, ya que las diferencias no se observan sólo para el efecto de los olores sino que también los valores de los controles son diferentes.

Conclusión

De acuerdo a los resultados consideramos que conviene profundizar sobre los efectos de olores a orina de gato o felinina, TMT y macho extraño, sobre todo para el TMT, probando directamente en los galpones de cría con distintas dosis y frecuencias de aplicación.

En conclusión, para evaluar el potencial del uso de olores para el control de roedores, debe tenerse en cuenta que nuestros resultados dependieron de la concentración y formulación de los productos utilizados como fuente de olores, así como de la frecuencia de renovación. Debido a que los valores umbrales en que se manifieste un efecto dependen de las condiciones del contexto en que se aplique el olor (Morrow, Elsworth and Roth, 2002), para seleccionar un compuesto para aplicar en las granjas, donde hay olores externos, sobre todo dentro de los galpones de cría, que pueden interferir con la percepción de los olores aplicados, es necesario realizar experimentos adicionales con animales silvestres en condiciones de campo, utilizando distintas concentraciones y formas de aplicación.

CAPÍTULO 4. Evaluación de la respuesta de aversión de individuos de *Mus musculus* y *Rattus norvegicus*

Los resultados de este capítulo fueron enviados a la revista PLOS ONE

Introducción

En el capítulo anterior se evaluó el efecto de olores sobre la reproducción de *M. musculus*, mientras que en este capítulo se evaluará su efecto sobre conductas de evitamiento en *M. musculus* y *R. norvegicus*.

La predación conlleva riesgos importantes para las presas sea porque el desenlace puede ser fatal o porque puede ocasionar pérdida temporal de alimentos, agua, refugio. Se espera entonces que las presas desarrollen conductas para evitar a los predadores o a señales de su presencia (Apfelbach *et al.*, 2005).

Los avances recientes en la investigación ecológica y la tecnología analítica están dando lugar a formas novedosas de utilizar esta información química para crear atrayentes y repelentes. Sin embargo, existe una gran variación en el diseño, los resultados y la interpretación de los estudios de discriminación de riesgo basada en el olfato (Parsons *et al.*, 2018).

Hay mucha evidencia de que los olores además de afectar la reproducción, producen cambios en el comportamiento de las especies, ya sea porque evitan un olor o porque se sienten atraídos por él (Dielenberg and McGregor, 2001; Apfelbach *et al.*, 2005; Osada *et al.*, 2013; Hansen, Stolter and Jacob, 2015; Parsons *et al.*, 2018). Esta estrategia puede ser útil cuando se necesita hacer un manejo de las especies, capturándolos o generándoles rechazo al olor para alejarlo de cultivos o sitios productivos (Sullivan *et al.*, 1988; Schlötelburg *et al.*, 2018), por ejemplo, se ha utilizado para mantener a herbívoros alejados de predios forestales (Swihart,

Bryant and Newton, 1994; Wagner and Nolte, 2000), sin embargo, no todos los intentos han tenido éxito. El fracaso de algunos estudios para obtener efectos repelentes con los olores de los depredadores puede estar relacionado con desajustes entre los olores de los depredadores y las especies de presas empleadas, diferencias individuales o entre cepas en la sensibilidad a los olores de los depredadores, o a que el uso de olores de los depredadores tienen baja eficacia (Apfelbach *et al.*, 2005).

Distintos trabajos mostraron que olores a depredadores, como orina de gato, el TMT (olor presente en heces de *Vulpes vulpes* (zorro rojo), descrito en el capítulo 3), telas frotadas sobre piel de gato, y collares de tela utilizados por gatos, producen conductas de aversión asociadas a la percepción del riesgo de depredación en roedores (Dielenberg and McGregor, 2001; Staples *et al.*, 2008).

Entre estos comportamientos se describió el evitamiento de la fuente de olor, la permanencia corta en la proximidad de la fuente de olor y respuestas de alerta y miedo como inmovilidad (freezing), olfateo, intentos de escape, exploración y acicalamiento (Bolbroe, Jeppesen and Leirs, 2000; Apfelbach *et al.*, 2005; Staples *et al.*, 2008; Horii *et al.*, 2010; Osada *et al.*, 2013). Algunos autores consideran que el acicalamiento es un comportamiento no defensivo (Blanchard, Griebel and Blanchard, 2001; Dielenberg and McGregor, 2001), mientras que otros suponen que es una respuesta que se produce cuando finaliza una situación de estrés, por lo que estaría incluido entre las respuestas a una percepción de riesgo (Bindra and Spinner, 1958; Spruijt, Van Hooff and Gispen, 1992).

Si bien los olores mencionados generan aversión de los roedores hacia la fuente de olor, hay diferencias entre ellos. Frente a los olores a piel de gato los roedores despliegan comportamientos de inmovilidad y reducen el acicalamiento, pudiendo

además desarrollar una respuesta condicionada; sin embargo, esto no ocurre con el TMT. Algunos autores consideran que este último producto produce un efecto irritante y por lo tanto la respuesta no estaría asociada a la percepción de un riesgo de predación (McGregor *et al.*, 2002; Blanchard, Griebel and Blanchard, 2003; Fendt and Endres, 2008; Staples *et al.*, 2008).

Para continuar con la evaluación de los olores para el manejo de roedores plaga en granjas, pero ahora observando el comportamiento, en este capítulo se plantea el objetivo general de evaluar el efecto de distintos olores sobre el comportamiento de aversión de individuos adultos de *Mus musculus* (laucha común, CF1) y ratas Wistar (*Rattus norvegicus*).

Objetivos específicos

Evaluar el efecto aversivo del TMT, orina de gato y piel de gato en individuos de *M. musculus* y *R. norvegicus* en condiciones de bioterio.

Hipótesis

Los individuos de ambas especies van a evitar el TMT, orina de gato y piel de gato y/o van a realizar comportamientos de alerta frente a estos olores.

Materiales y métodos

Los procedimientos realizados en este capítulo fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL, FCEN, Universidad de Buenos Aires), protocolo número 88.

Sujetos: los sujetos experimentales fueron 32 machos y 32 hembras de cada especie criados en bioterio que fueron mantenidos en un bioterio experimental (ver capítulos 2 y 3) durante 8 días para su ambientación. Durante ese período cada individuo fue ubicado en una jaula individual (41 x 36 x 17 cm) con agua y comida (alimento balanceado para roedor extrusado Cooperación) *ad libitum* y un tubo de cartón y algodón como material de anidamiento. El fotoperíodo fue 12:12 horas luz/oscuridad, y la temperatura entre 20-22°C.

Fuentes de olor: Los olores evaluados fueron TMT, orina de gato, piel de gato y agua destilada como control. El TMT (97,5%) fue comprado en SIGMA ALDRICH® (actualmente Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). La orina de gato, como en el Capítulo 3, fue obtenida de una hembra de gato doméstico castrada que fue alimentada con carne. Para obtener olor a piel de gato, una pieza de tela (5 x 5 cm) fue frotada contra la piel de gatos machos y hembras (n= 4) durante 5 minutos. Las muestras de orina y las piezas de tela fueron congeladas (-18 °C) hasta 30 minutos previos al inicio de los experimentos. Para las fuentes de olor líquidas y para el agua destilada se aplicó 1 ml sobre un papel tissue. El uso de agua destilada como control se decidió de acuerdo a Fendt et al. (Fendt *et al.*, 2005) y Horii et al. (Horii *et al.*, 2010).

Dispositivo experimental. Este constó de 3 cajas transparentes de 19 x 23 x 30 cm, conectadas en forma lineal a través de caños plásticos de PVC blanco de 50 cm de largo y 7 cm de diámetro (Figura 5). En las cajas A y C se colocó una caja de Petri en las cuales se puso el olor correspondiente (papel tissue o pedazo de tela) o agua destilada. Ambas cajas de Petri fueron protegidas con una malla metálica para evitar que el roedor entre en contacto directo con la fuente de olor.

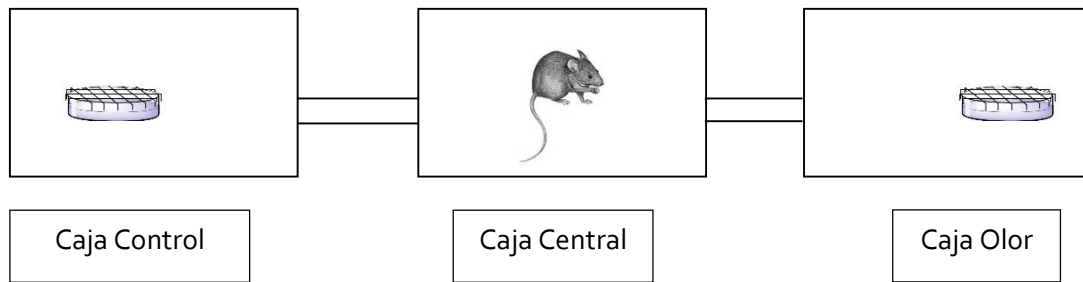


Figura 5. Dispositivo experimental para experimentos de comportamiento.

Procedimiento: Cada individuo fue trasladado desde su jaula hasta la caja Central del dispositivo experimental. Durante los primeros 4 días se los dejó durante 10 minutos sin aplicar ningún tratamiento, a fin de que se habitúen al dispositivo experimental. El Día 5 (día de exposición) se colocó 1 ml de agua destilada en un papel tissue dentro de la caja de Petri de la caja Control, y el tratamiento correspondiente (Tabla 5) en la caja de Petri de la caja Olor. Los tratamientos están indicados de acuerdo a lo que se aplicó en las dos cajas laterales: TMT- Control (TMT), Orina de gato -Control (Orina), Piel de gato- Control (Piel) y Control- Control (Control). En el caso del tratamiento Control en ambas cajas se aplicó agua destilada. Los papeles tissue se renovaron cada tres ensayos, mientras que la tela con olor a piel de gato se renovó después de cada ensayo. Aunque el dispositivo fue limpiado luego de cada ensayo con una solución de etanol al 70%, se decidió mantener la caja con el tratamiento olor a lo largo de los ensayos (la caja Olor siempre fue la caja de la derecha) para prevenir el efecto de posibles olores remanentes. De ahora en adelante nos referiremos a la caja control como aquella donde se aplicó siempre agua destilada y caja olor a aquella donde se aplicaron olores o agua destilada, según el caso. Los efectos de distintos tipos de olores fueron evaluados en diferentes días y luego de las sesiones de un día, el dispositivo fue limpiado exhaustivamente.

Los animales fueron asignados al azar al tipo de tratamiento. Cada olor fue evaluado en 16 *M. musculus* (8 hembras y 8 machos) y 16 *R. norvegicus* (8 hembras y 8 machos). Todas las sesiones se iniciaron con el roedor ubicado en la Caja Central del dispositivo. Las respuestas comportamentales fueron registradas durante 10 minutos por dos observadores ubicados a dos metros del aparato experimental. No se observaron evidencias de que los roedores mostraran comportamientos que parecieran afectados por la presencia de los observadores. Se registró en intervalos de un segundo la ubicación del animal: caja Central, caja Control, caja Olor, o en los tubos. También se registraron las frecuencias de comportamientos de inmovilidad (también llamado freezing, el roedor se sienta rígidamente inmóvil o ligeramente tembloroso, encorvado o boca abajo, con los ojos abiertos; a veces acompañado de castañeteo de dientes), olfateo (movimiento rápido de los bigotes, contracciones de la nariz, sonido de olfateo; generalmente acompañado de estiramiento del cuello, levantamiento o caminata) y acicalamiento (se lame, rasca o "limpia" cualquier parte de su cuerpo).

Tabla 5. Tratamientos y su aplicación

<i>Tratamiento</i>	<i>Aplicación</i>
Control	1 ml de agua destilada en tissue
Orina de gato	1 ml de orina de gato alimentado con carne, conservada congelada a -18 °C, en tissue
Piel de gato	Pedazo de tela de 50 x 50 mm el cual se frotó durante 5 minutos sobre piel de un gato adulto
TMT	1 ml en tissue

Análisis de datos

Se realizaron análisis por separado para cada especie utilizando el programa estadístico R (versión 3.5.1, RCoreTeam 2018). Se comparó la proporción de individuos

que visitaron la caja de olor al menos una vez para los tratamientos con algún olor con respecto al control mediante una prueba unilateral de diferencia entre proporciones (Zar, 1999). Se construyeron modelos en los que se consideró como variable respuesta el número total de visitas a la caja con olores (Visitas) y el número de segundos (sobre un total de 600) en que el animal permaneció en la caja con olores (Duración), considerando el tiempo total como la suma de la cantidad de segundos de cada visita. El efecto de los olores sobre los "comportamientos de alerta" se evaluó por la frecuencia de olfateo y de acicalamiento. No se realizaron modelos para el comportamiento de inmovilidad o "freezing" porque fue registrado en pocos individuos. Examinamos el efecto de las variables explicativas sobre los comportamientos utilizando modelos lineales mixtos generalizados (GLMM) con el paquete R "lme4" (Bates *et al.*, 2015), Matrix (Bates and Maechler, 2018) y GLMM TMB (Brooks *et al.*, 2017). Los modelos se ajustaron por máxima verosimilitud (aproximación de Laplace) y se seleccionaron de acuerdo a los valores AIC. Para evaluar el efecto sobre visitas, los modelos incluyeron el sexo, el tratamiento y sus interacciones como variables explicativas fijas. El número de experimento se incluyó como un factor aleatorio debido a que no se pudieron realizar todas las réplicas al mismo tiempo (dado que el bioterio cuenta con 30 jaulas). Para ambas especies, se encontró una interacción significativa entre el efecto del tratamiento y el sexo y, en consecuencia, se desarrollaron modelos separados para cada sexo. Los mejores modelos para ambos sexos de *M. musculus* fueron los modelos de ZAP Poisson. Para las ratas hembras, se utilizó un GLMM con una distribución de errores Poisson, mientras que para las ratas macho se realizó un GLMM con una distribución

normal de errores, y comparaciones múltiples de Tukey (Zar, 1999) a posteriori para evaluar las diferencias entre tratamientos.

Para la variable Duración, para cada especie se ajustó un GLMM con una distribución binomial de errores. El primer modelo incluyó el sexo, el tratamiento y sus interacciones como variables explicativas fijas y el número del experimento y el individuo (para evitar la sobredispersión) como factores aleatorios. Para las ratas, realizamos análisis separados para cada sexo debido a la interacción significativa entre el sexo y el tratamiento.

Para las variables Olfateo y Acicalamiento, se llevaron a cabo GLMMs incluyendo sexo, tratamiento (TMT, orina, piel y control), caja (control, central u olor), y la interacción entre tratamiento y caja como factores fijos, y el individuo como factor aleatorio. Se asumió una distribución de errores de Poisson. En el caso de encontrar efectos significativos, se realizaron comparaciones a posteriori (prueba de Tukey).

Las tablas nombradas con la letra "A" al principio, corresponden al Anexo.

Resultados

Visitas

El número de lauchas domésticas que visitaron al menos una vez la caja donde se aplica el olor, no mostró diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0,050$ en todos los casos), aunque el número de animales que visitó esta caja fue mayor en el tratamiento Control que en todos los otros tratamientos. Un número significativamente menor de ratas visitó la caja con olor en el tratamiento Piel ($p = 0,039$), mientras que para el TMT este efecto fue marginal ($p = 0,074$, Tabla 6).

Tabla 6. Número de animales de cada especie que visitaron la caja donde se aplica el olor al menos una vez de acuerdo con el tratamiento (* indica un valor de $p < 0,05$).

	Tratamiento			
	TMT	Orina de gato	Piel de gato	Control
<i>Mus musculus</i>	7	8	7	10
<i>Rattus norvegicus</i>	12	16	11*	15

Los modelos para la cantidad total de visitas a la caja olor mostraron un efecto del sexo, por lo que se analizaron por separado para machos y hembras. Para hembras de *M. musculus* ningún modelo que incluyera olores fue mejor que el modelo nulo (menor AIC) lo que sugiere la ausencia de efectos de los olores sobre esta variable (Figura 6.a, Tabla A25). Para los *M. musculus* machos, el número de Visitas a la caja con olor fue mayor para el TMT que para el tratamiento Control (Figura 6.b, Tabla A26, $p = 0,015$). En el caso de las ratas, también hubo diferencias entre sexos, mientras que las hembras visitaron la caja con olor con menor frecuencia en los tratamientos Piel y TMT que en el tratamiento Control (Figura 6.c, Tabla A27; $p = 0,002$ y $p < 0,001$, respectivamente), las ratas macho sólo visitaron la caja con olores con menor frecuencia en el tratamiento Piel que en el tratamiento Control (Figura 6.d, $p = 0,007$, prueba de Tukey).

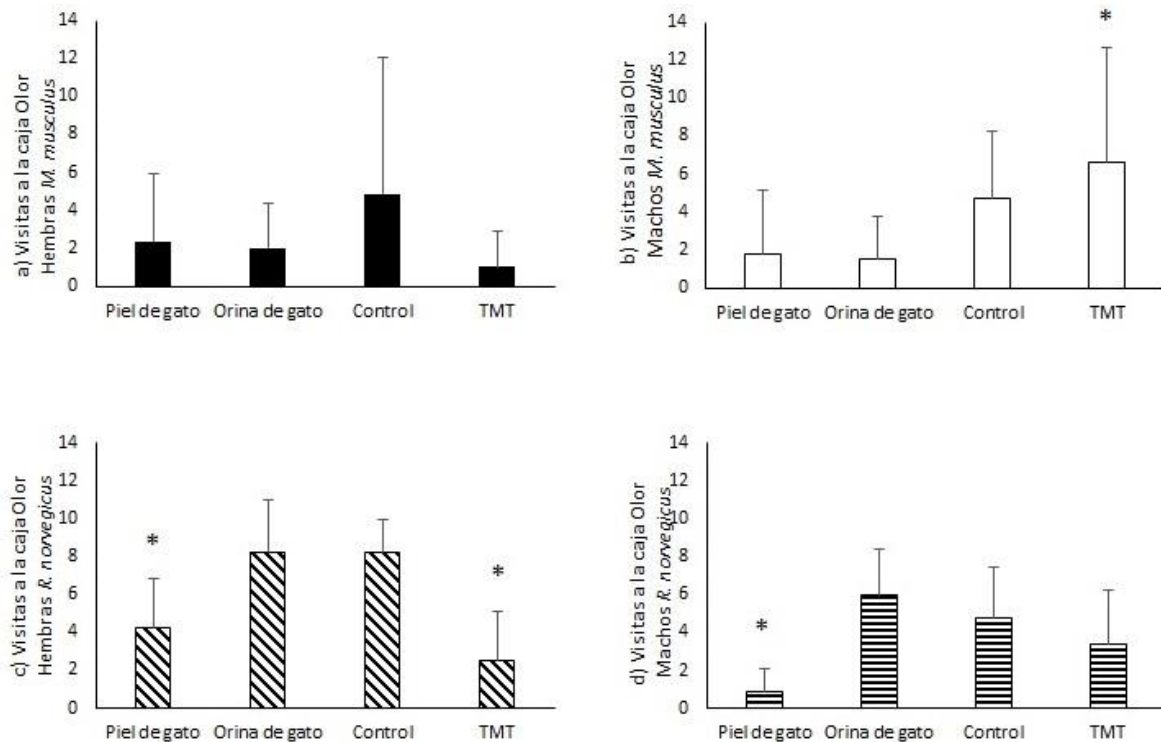


Figura 6. Número de visitas a la caja con olor según especie y sexo para cada tratamiento, a) para hembras *Mus musculus*, b) para machos *M. musculus*, c) para hembras *Rattus norvegicus*, d) para machos *R. norvegicus* (* indica un valor de $p < 0,05$).

Duración

En general, los individuos de *M. musculus* permanecieron más tiempo en los tubos de PVC que conectaban las cajas que las ratas, mientras éstas pasaron más tiempo en la caja central y en promedio, las ratas permanecieron más tiempo en la caja con olor, independientemente del tratamiento, que las lauchas domésticas. Los individuos de *M. musculus* pasaron menos tiempo en la caja con olor en los tratamientos Piel y TMT que en los otros tratamientos, mientras que permanecieron más tiempo en la caja con olor en el tratamiento Orina. Sin embargo, el mejor modelo para la variable Duración no incluyó un efecto del tratamiento ni un efecto sexo, por lo que se realizó el análisis en conjunto para hembras y machos (Tabla A28).

Para las ratas se detectó un comportamiento diferencial según el sexo. Para los machos no hubo efectos significativos de los tratamientos (los valores de AIC de los modelos que incluían los efectos del tratamiento fueron más altos que el AIC del modelo nulo, Tabla A29), por lo que se descarta un efecto de olores sobre la permanencia de los individuos en las distintas cajas del dispositivo (sin incluir a los tubos de PVC). Las ratas hembra pasaron más tiempo en la caja con olor en el tratamiento Orina que en el Control (Figura 7, $p = 0,002$, Tabla A30) y pasaron menos tiempo en la caja con olor en los tratamientos Piel y TMT que en el Control, pero la diferencia fue sólo marginalmente significativa en el tratamiento TMT (Figura 7, Tabla A30, $p = 0,092$).

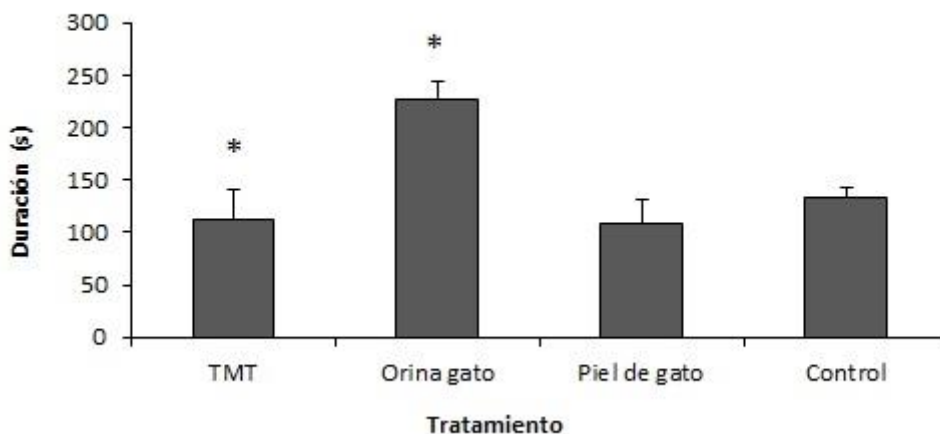


Figura 7. Duración de la estadía de hembras *R. norvegicus* en la caja Olor del dispositivo experimental según el tratamiento.

Comportamientos

De todas las posibles respuestas de comportamiento, sólo observamos Inmovilidad o “freezing”, olfateo y acicalamiento, debido probablemente a las condiciones de confinamiento dentro de la cámara de prueba (Staples *et al.*, 2008), especialmente para las ratas. La inmovilidad sólo se observó en ratas, en el tratamiento TMT; una hembra en la caja control, y una hembra y un macho en la caja inicial.

- Olfateo

Las lauchas domésticas mostraron una frecuencia de olfateo más baja que las ratas (media = $4,540 \pm 0,577$ para ratones y media = $12,344 \pm 1,543$ para ratas, $p = 0,000$), y en esta especie la frecuencia de olfateo dependió de la interacción entre el tratamiento y la caja (con o sin olor). En consecuencia, se ejecutaron modelos separados por tipo de caja y de tratamiento. Para cada tipo de caja se compararon los diferentes tratamientos con respecto al Control, mientras que para el efecto de las cajas en cada tratamiento se realizaron comparaciones múltiples (prueba de Tukey). No hubo diferencias entre los tratamientos en la caja central y en la caja control, mientras que la frecuencia de olfateo fue mayor para el tratamiento Orina que para el Control en la caja con olor, aunque este efecto sólo fue marginalmente significativo ($p = 0,078$, Figura 8). En todos los tratamientos, las lauchas domésticas olfatearon con mayor frecuencia en la caja central que en la caja control, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas para ningún tratamiento (Figura 9, $p = 0,23$, $p = 0,06$, $p = 0,021$ y $p = 0,133$ para TMT, Orina, Piel y Control, respectivamente). En el tratamiento Control, olfatearon más en la caja central con respecto a la caja con olor

($p = 0,046$, Figura 9), y en el tratamiento Orina, olieron más en la caja con olor que en la caja control ($p < 0,001$, Figura 9).

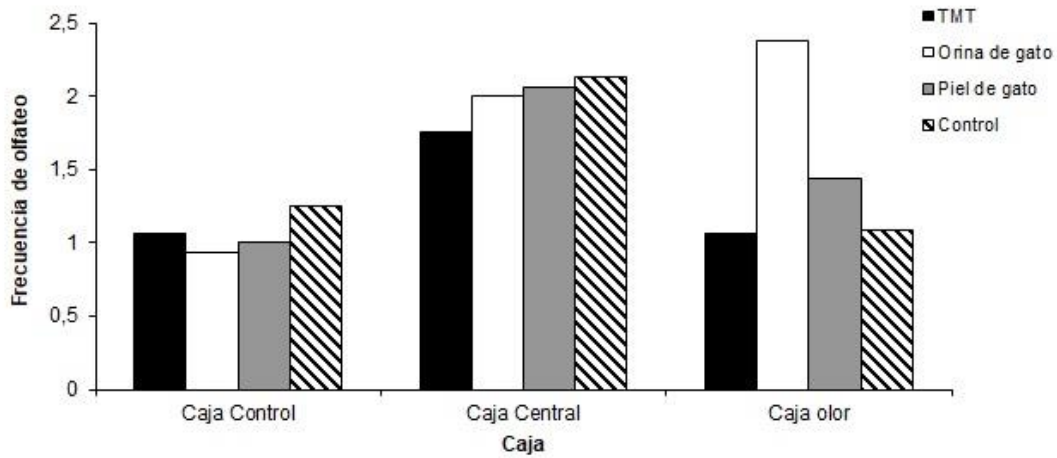


Figura 8. Frecuencia de olfateo promedio en los diferentes tratamientos según la caja para *M. musculus*.

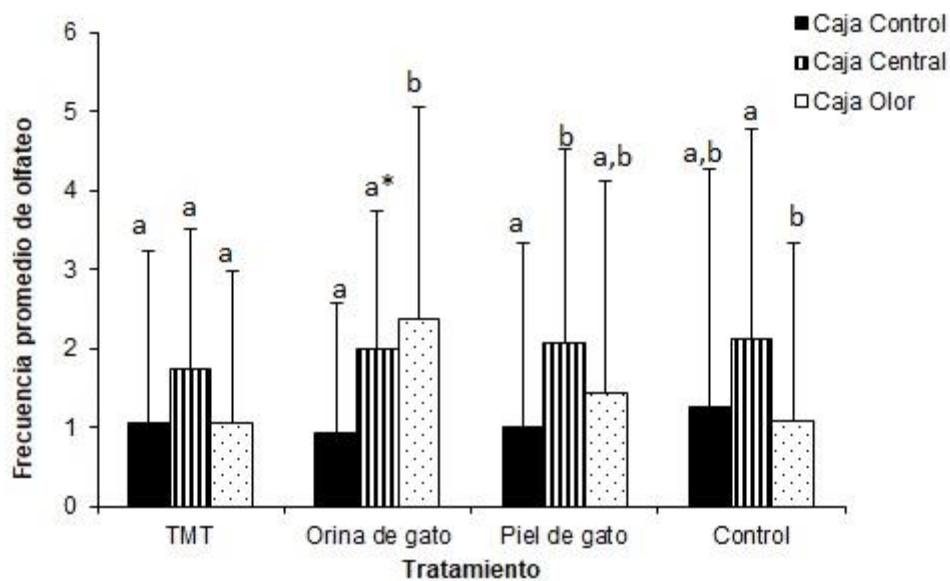


Figura 9. Frecuencia media (+ SE) de olfateo en las cajas control, central y con olor según el tratamiento para *M. musculus*. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada tratamiento. $a^* = p = 0,06$ con respecto a a (caja control)

Las ratas macho olfatearon con menor frecuencia que las hembras ($p = 0,002$). Como en el caso de *M. musculus*, hubo una interacción significativa entre el tratamiento y la

caja ($p < 0,001$), y en consecuencia, se ejecutaron modelos separados para los tipos de caja y tratamiento. Para la caja control, las ratas olfatearon más en los tratamientos con TMT y Orina de gato ($p = 0,009$ y $p < 0,001$, respectivamente), y la frecuencia de olfateo en la caja central fue mayor aunque no significativa para el tratamiento TMT con respecto al Control ($p = 0,062$), mientras que en la caja con olor, la frecuencia de olfateo fue mayor en el tratamiento Orina ($p < 0,0001$, Figura 10). Las ratas olfatearon con mayor frecuencia en la caja central que en la caja control en los tratamientos Control y TMT ($p < 0,001$ y $p = 0,009$, respectivamente). Para estos tratamientos, olfatearon menos en la caja con olor que en la caja central ($p < 0,001$ en ambos casos, Figura 11). No hubo diferencias entre las cajas en la frecuencia de olfateo para el tratamiento Piel ($p > 0,05$ para todas las comparaciones, Figura 11), mientras que para la Orina, las ratas olfatearon más en la caja con olor que en las cajas central y control ($p = 0,007$ para ambos casos).

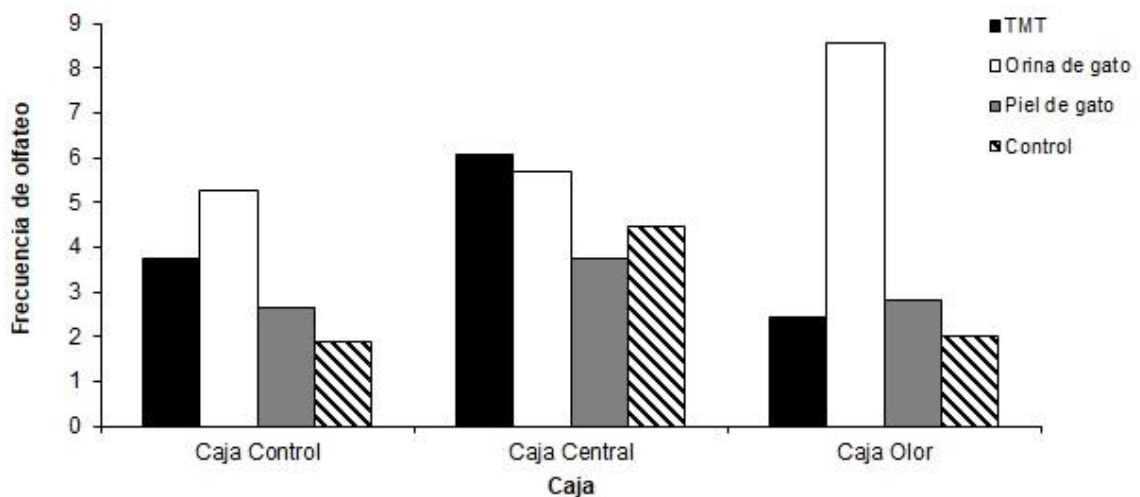


Figura 10. Frecuencia de Olfateo media en los diferentes tratamientos según la caja para ratas.

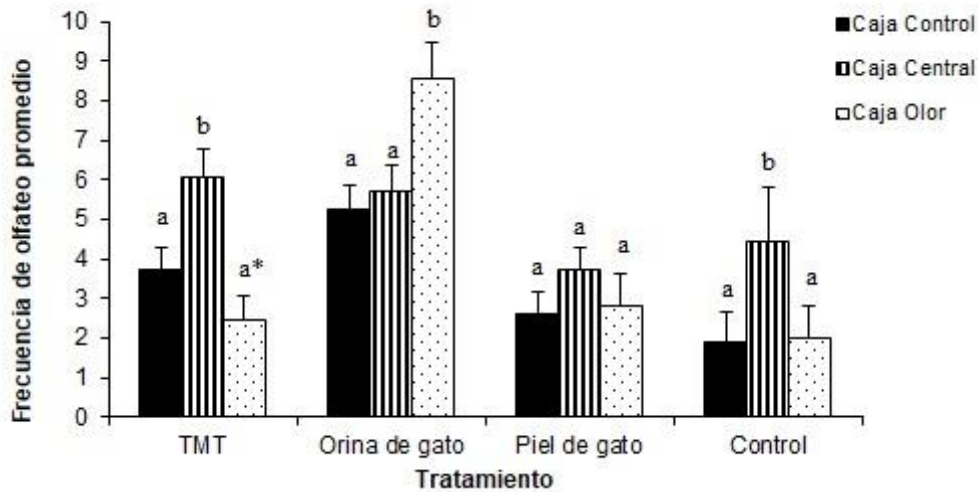


Figura 11. Frecuencia media (+ SE) de Olfateo en las cajas Control, Central y Olor según el tratamiento para ratas. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada tratamiento. a* = p = 0,071 con respecto a a.

- Acicalamiento

Ambas especies mostraron una frecuencia de acicalamiento más baja que la de olfateo (media = $0,734 \pm 0,167$ y $0,703 \pm 0,115$; media = $4,54 \pm 0,577$ y $12,344 \pm 1,543$, para lauchas y ratas, respectivamente). Para ambas especies, los mejores modelos para la frecuencia de acicalamiento incluyeron la caja y el factor aleatorio individuo, pero no un efecto de tratamiento. Independientemente del tratamiento, las lauchas realizaron acicalamiento con mayor frecuencia en la caja con olor con respecto a la central y la caja control (p = 0,059 en ambos casos), mientras que las ratas mostraron una frecuencia significativamente mayor de acicalamiento en la caja central respecto a la caja control (p = 0,048), mientras que no hubo diferencias en la frecuencia de acicalamiento entre las cajas central y con olor (p = 0,593) ni entre la caja control y con olor (p = 0,238).

Discusión

En este capítulo se investigó si la orina de gato, la piel de gato y el TMT generaban respuestas de aversión y comportamientos de alerta en lauchas domésticas y ratas pardas de laboratorio. Se consideraron el número de individuos, el número de visitas totales y la duración de las visitas a cajas con olor en relación a cajas controles con agua destilada y comportamientos de alerta como olfateo, acicalamiento e inmovilidad como evidencias de aversión hacia una fuente de olor.

Se encontraron evidencias de comportamiento de aversión en ratas frente al TMT, que fue el único olor que provocó inmovilidad en esta especie. La proporción de individuos machos que visitó la caja con olor fue menor para el olor a piel de gato respecto al tratamiento control, y las ratas hembra visitaron y estuvieron menos tiempo en las cajas con olor en el tratamiento con TMT y en el tratamiento con piel de gato respecto al Control. Las ratas desplegaron con mayor frecuencia un comportamiento de alerta (olfateo) en el tratamiento de Orina de gato y de TMT que en el Control. Para el TMT, este comportamiento se observó principalmente en la caja central (inicio) y no en la caja olor, en coincidencia con la hipótesis de que el TMT produce respuestas de alerta frente a una situación de stress, o que es una sustancia irritante (Dielenberg, Hunt and McGregor, 2001; McGregor *et al.*, 2002). La piel de gato también fue evitada por ambos sexos de rata, que visitaron con menor frecuencia la caja con olor en este tratamiento respecto al Control.

La diferencia en el efecto del TMT y el olor a piel de gato sobre la permanencia de las ratas hembra en las cajas con olor se puede deber a las características de los olores, ya que el TMT es un producto sintético, y si bien está presente en las heces de zorro, muchos autores lo consideran un producto nocivo e irritante más que una evidencia de

la presencia de un predador (Dielenberg, Hunt and McGregor, 2001; McGregor *et al.*, 2002; Staples *et al.*, 2008). En consecuencia, su efecto se mantiene sin la presencia real del predador, como fue observado para otras sustancias irritantes (Staples *et al.*, 2008). Por el contrario, la piel de gato es una señal genuina de la presencia del predador, y una vez que el roedor corrobora su ausencia, puede ignorar el olor. Puede ser tomado como señal de que el predador “estuvo”, y que por lo tanto es seguro, ya que no es probable que cace en el mismo lugar que orina o defeca (Staples, 2010). Las lauchas mostraron un comportamiento distinto que las ratas, mientras que las hembras no respondieron a los tratamientos, los machos fueron atraídos por el olor a TMT, sugiriendo la ausencia de aversión. Este resultado puede deberse, sin embargo, a una respuesta de “evaluación del riesgo” en respuesta a un estímulo parcial de presencia del predador, que genera incertidumbre y la necesidad de la obtención de mayor información a través del comportamiento exploratorio (Dielenberg and McGregor, 2001; Staples *et al.*, 2008; Parsons *et al.*, 2018). Diferencias en el comportamiento de evaluación del riesgo entre lauchas y ratas ya ha sido descrito por Blanchard *et al.* (Blanchard, Griebel and Blanchard, 2001).

En conclusión, se encontró un efecto de aversión al TMT en ratas, expresado en el número y duración de visitas y en el comportamiento de inmovilidad, solo observado con este olor. La piel de gato también fue evitada por las ratas macho, pero su efecto puede ser limitado por ser una sustancia de poco alcance (Dielenberg, Hunt and McGregor, 2001).

Pese a que el TMT parece carecer de algunas propiedades que sí tienen la piel o el pelo de gato, esto no impide que pueda ser útil para el control de roedores ya que, como se

vio en el capítulo 3, también puede tener un efecto negativo sobre la reproducción de *M. musculus* (Adduci *et al.*, 2019).

Al considerar el uso de olores como repelentes para roedores debe tenerse en cuenta, como en el caso de la reproducción, que los efectos sobre el comportamiento pueden ser contexto dependientes (Endres and Fendt, 2007; Rosen *et al.*, 2008), y por otro lado nuestros resultados fueron obtenidos en condiciones de laboratorio, con un diseño en particular y en condiciones de confinamiento donde el espacio pequeño permitía que los roedores exploraran y descartaran la presencia del predador. En condiciones de campo, la incertidumbre puede durar más tiempo, pero, por otro lado, los olores difunden más rápidamente que en laboratorio.

CAPÍTULO 5. Discusión y conclusiones generales

Discusión

El estudio de los efectos de señales químicas, y en particular, olores asociados a predadores o co-específicos mostraron que estos pueden producir estrés que conduce a fallas reproductivas y/o respuestas comportamentales tendientes a evitar el olor (Apfelbach *et al.*, 2005; Voznessenskaya, 2014; Adduci *et al.*, 2019). En lauchas y ratas domésticas se estudiaron los efectos a nivel neurofisiológico, reproductivo y comportamental. En esta tesis evaluamos dos efectos que podrían tener consecuencias sobre el papel de estos roedores como plaga: disminución del éxito reproductivo (que limitaría los números poblacionales) y comportamiento de aversión, que limitaría los daños al evitar que los roedores se acerquen a depósitos de alimento o a galpones de cría. En esta etapa, y a fin de preseleccionar potenciales productos, trabajamos con animales de bioterio, que presentan las ventajas de ser más homogéneos que los silvestres, de poder trabajar con un mayor número de animales, que estén habituados a condiciones de laboratorio, como el confinamiento y el alimento, y que estén libres de patógenos. Respecto a las condiciones de laboratorio, en un experimento previo realizado con *M. musculus* silvestres para evaluar el efecto del hacinamiento sobre la reproducción (Burroni *et al.* 2014) se observaron fallas en la preñez tanto en los controles como en los tratamientos y en un ensayo previo con animales silvestres también observamos fracasos en las preñeces. Estas fallas podrían deberse a las condiciones de confinamiento o a la alimentación, por lo que ensayos con animales silvestres deberían realizarse en condiciones más similares a las

naturales. Por otro lado, si bien varios autores consideran que las respuestas a los olores son innatas, y se mantienen pese a que los roedores no hayan estado en contacto con predadores durante varias generaciones, en animales de laboratorio podría haber respuestas distintas que en el caso de animales silvestres.

En cuanto al contexto en que quisiéramos aplicar los olores, las granjas avícolas se caracterizan por presentar en algunos momentos alta densidad de *M. musculus*, por lo que resultan de utilidad medidas que tiendan tanto a disminuir su reproducción como su ingreso a los galpones. Las ratas, por otro lado, no son abundantes, pero un solo ejemplar puede matar más de 100 pollitos en una noche, por lo que las sustancias repelentes son vitales para evitar el ingreso en los galpones de cría y los daños que pueden causar aún en bajas densidades. Por este motivo es que en esta tesis se analizaron efectos de olores sobre la reproducción de *M. musculus* y de aversión para ambas especies.

En cuanto al efecto reproductivo, encontramos evidencias de que la orina de gato, el β estradiol y el TMT pueden afectar negativamente el éxito reproductivo en alguna de las etapas, desde el éxito de preñez hasta la supervivencia al destete. El TMT fue el único que, por una suma de efectos pequeños en las distintas etapas, produjo una disminución del número de crías destetadas. Los resultados en cada una de las etapas no fueron independientes, porque, por ejemplo, menor tamaño de camada puede conducir a mayor supervivencia, y por lo tanto las respuestas densamente dependientes pueden compensar efectos tempranos. Un resultado inesperado fue la desaparición de los efectos al aumentar la frecuencia de aplicación, y es un llamado de atención a la necesidad de ensayar distintas frecuencias y concentraciones y de realizar ensayos a

campo, donde los olores pueden difundir más y mezclarse con otros olores presentes en los galpones, como los productos de desechos de las aves.

En cuanto a las respuestas de aversión, los *M. musculus* no mostraron respuestas de evitamiento de olores y, por el contrario, parecieron atraídos hacia la orina de gato.

Este resultado fue observado también en experimentos en semi cautividad con animales silvestres (Busch et al 2015), y se planteó como explicación que los roedores podían estar infectados con *Toxoplasma gondii*, que produce respuestas de acercamiento al huésped definitivo del parásito, los felinos. Sin embargo, esta alternativa no es válida para los roedores de bioterio. Nuestros experimentos se realizaron utilizando como fuente de olor la orina de un único ejemplar hembra de gato, y eso puede haber influido en el resultado. Sin embargo, esta gata fue alimentada con carne, de manera de garantizar que su orina contuviera productos del catabolismo de ésta, sustancias a las que se atribuye el efecto sobre los roedores (Voznessenskaya et al., 2003). Para obtener resultados más concluyentes, se sugiere realizar ensayos con felinina, compuesto presente en la orina de felinos (Westall, 1953; Hendriks et al., 1995; Hendriks, Tarttelin and Moughan, 1995).

Los resultados de los experimentos de comportamiento mostraron importantes diferencias entre especies, lo cual es importante a la hora de tener en cuenta el método a utilizar según la especie en cuestión. Las ratas mostraron evitamiento frente a los olores a predadores, especialmente frente al TMT ya que provocó un menor número y menor duración de visitas y a la fuente de olor, a diferencia del olor a piel de gato, que sólo generó menos visitas. Estas diferencias contrastan con resultados de otros autores donde consideran que el olor a piel es una señal genuina de presencia del predador, mientras que los olores a orina y/o heces indicarían que el predador

estuvo presente, pero no necesariamente permanece en el lugar. Sin embargo, el evitamiento al TMT puede haberse debido a su efecto irritante, más que a su asociación con un riesgo de predación.

De acuerdo con estos resultados, se está trabajando en evaluar los efectos del TMT, que fue el olor que mostró efectos en variables reproductivas y en conductas de aversión en ratas, en granjas avícolas del partido de Exaltación de la Cruz, y en diseñar y preparar un soporte que sea un dispositivo de liberación del olor, como los que se usan para repeler insectos (Juan *et al.*, 2010, 2013).

La utilización de olores como método de control se proponen en el marco del manejo de plagas basado en la ecología, por lo que al diseñar su correcta y óptima aplicación, debería ser acompañado de otras medidas que tiendan a evitar la presencia de roedores en las granjas, teniendo en cuenta sus usos de hábitat, y las condiciones que favorecen la colonización de las granjas y galpones avícolas, como la acumulación de desechos y la presencia de alta cobertura vegetal en los alrededores de los galpones y en el perímetro de la granja (Gómez Villafañe, D. N. Bilenca, *et al.*, 2001). Junto con estas medidas, debería lograrse el correcto aislamiento de los galpones, con barreras físicas que impidan la colonización o recolonización de roedores (León *et al.*, datos no publicados), ya que puede haber invasiones entre granjas cercanas (Gómez Villafañe *et al.*, 2019). En conclusión, si bien los resultados fueron dependientes de la frecuencia de aplicación, de la especie y el sexo de los animales, la detección de distintos tipos de efectos al aplicar TMT, especialmente sobre la reproducción en *M. musculus* y la conducta de aversión en *R. norvegicus*, nos llevaron a plantear la continuación de ensayos con este producto en condiciones de campo, en las granjas avícolas. Además de haber obtenido evidencias de su potencial utilidad, presenta la ventaja de poderse

adquirir comercialmente, lo que favorece la factibilidad de su uso para elaborar soportes de liberación que se usen para el control en condiciones de campo.

CAPÍTULO 6. BIBLIOGRAFÍA

Adduci, L. B. *et al.* (2019) 'Effects of different odours on the reproductive success of *Mus musculus* as an alternative method of control', *Pest Management Science*, 75(7). doi: 10.1002/ps.5359.

Ahmad, N., Chopra, G. and Sood, M. L. (1984) 'Assessment of rodent damage in poultry farms', *Poultry Guide*, pp. 57–60.

Apfelbach, R. *et al.* (2005) 'The effects of predator odors in mammalian prey species: a review of field and laboratory studies', *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(8), pp. 1123–1144.

Bates, D. *et al.* (2015) 'Fitting linear mixed-effects models using lme4. 67: 48', *arXiv preprint arXiv:1406.5823*.

Bates, D. and Maechler, M. (2016) 'Matrix: Sparse and Dense Matrix Classes and Methods [Software]'

Bates, D. and Maechler, M. (2018) 'Matrix: Sparse and Dense Matrix Classes and Methods. R package version 1.2-14'

Beaton, E. A. and DeCatanzaro, D. (2005) 'Novel males' capacity to disrupt early pregnancy in mice (*Mus musculus*) is attenuated via a chronic reduction of males' urinary 17 β -estradiol', *Psychoneuroendocrinology*, 30(7), pp. 688–697.

Berney, P. *et al.* (2014) 'Risk mitigation measures for anticoagulant rodenticides as biocidal products'. European Union.

Bindra, D. and Spinner, N. (1958) 'Response to different degrees of novelty: The

incidence of various activities', *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 1(4), p. 341.

Blanchard, D. C. *et al.* (2003) 'Failure to produce conditioning with low-dose trimethylthiazoline or cat feces as unconditioned stimuli.', *Behavioral neuroscience*, 117(2), p. 360.

Blanchard, D. C., Griebel, G. and Blanchard, R. J. (2001) 'Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic', *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25(3), pp. 205–218.

Blanchard, D. C., Griebel, G. and Blanchard, R. J. (2003) 'Conditioning and residual emotionality effects of predator stimuli: some reflections on stress and emotion', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 27(8), pp. 1177–1185.

Bolbroe, T., Jeppesen, L. L. and Leirs, H. (2000) 'Behavioural response of field voles under mustelid predation risk in the laboratory: more than neophobia', in *Annales Zoologici Fennici*, pp. 169–178.

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

Brakes, C. R. and Smith, R. H. (2005) 'Exposure of non-target small mammals to rodenticides: short-term effects, recovery and implications for secondary poisoning', *Journal of Applied Ecology*, 42(1), pp. 118–128.

Brooks, M. E. *et al.* (2017) 'Modeling zero-inflated count data with glmmTMB', *BioRxiv*,

p. 132753.

Bruce, H. M. (1960) 'A block to pregnancy in the mouse caused by proximity of strange males', *Reproduction*, 1(1), pp. 96–103.

Bruce, H. M. (1961) 'Time relations in the pregnancy-block induced in mice by strange males', *Reproduction*, 2(2), pp. 138–142.

Bruce, H. M. and Parrott, D. M. V (1960) 'Role of olfactory sense in pregnancy block by strange males', *Science*, 131(3412), p. 1526.

Buck, L. B. (2004) 'Olfactory receptors and odor coding in mammals', *Nutrition reviews*, 62(suppl_3), pp. S184--S188.

Buckle, A. P. and Smith, R. H. (1994) *Rodent pests and their control*. Cab International Wallingford, UK.

Buron, G. *et al.* (2007) 'Comparative behavioral effects between synthetic 2, 4, 5-trimethylthiazoline (TMT) and the odor of natural fox (*Vulpes vulpes*) feces in mice.', *Behavioral neuroscience*, 121(5), p. 1063.

Burroni, N., Loetti, M. V and Busch, M. (2014) 'REPRODUCTIVE SUCCESS IN *Mus musculus* (RODENTIA) EXPOSED TO CONSPECIFIC'S ODORS AND OVERCROWDING IN LABORATORY CONDITIONS', *Mastozoologia neotropical*, 21(1), pp. 115–120.

Busch, M. and Kravetz, F. O. (1992) 'Competitive interactions among rodents (*Akodon azarae*, *Calomys laucha*, *C. musculinus* and *Oligoryzomys flavescens*) in a two-habitat system. I. Spatial and numerical relationships', *Mammalia*, 56, pp. 45–56.

Capizzi, D., Bertolino, S. and Mortelliti, A. (2014) 'Rating the rat: global patterns and

research priorities in impacts and management of rodent pests', *Mammal Review*.
Wiley Online Library, pp. 148–162.

Commission, [EC] European (2010) 'Directive of the European parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. 2010/63/EU', *Off J Eur Union*, 276, pp. 33–79.

Corrigan, R. M. and Williams, R. E. (1986) 'The house mouse in poultry operations: pest significance and a novel baiting strategy for its control', in *Proceedings of the Vertebrate Pest Conference*.

DeCatanzaro, D. *et al.* (1995) 'Interactions of contact, odor cues, and androgens in strange-male-induced early pregnancy disruptions in mice (*Mus musculus*).', *Journal of Comparative Psychology*, 109(2), p. 115.

DeCatanzaro, D. *et al.* (2006) 'Urinary oestradiol and testosterone levels from novel male mice approach values sufficient to disrupt early pregnancy in nearby inseminated females', *Reproduction*, 132(2), pp. 309–317.

DeCatanzaro, D., Baptista, M. A. S. and Spironello-Vella, E. (2001) 'Administration of minute quantities of 17 β -estradiol on the nasal area terminates early pregnancy in inseminated female mice', *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 69(3–4), pp. 503–509.

deCatanzaro, D., Zacharias, R. and Muir, C. (1996) 'Disruption of early pregnancy by direct and indirect exposure to novel males in mice: comparison of influences of preputialectomized and intact males', *Reproduction*, 106(2), pp. 269–274.

Dielenberg, R. A., Hunt, G. E. and McGregor, I. S. (2001) "'When a rat smells a cat": the

distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor', *Neuroscience*, 104(4), pp. 1085–1097.

Dielenberg, R. A. and McGregor, I. S. (2001) 'Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review', *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25(7–8), pp. 597–609.

Dominic, C. J. (1965) 'The origin of the pheromones causing pregnancy block in mice', *Reproduction*, 10(3), pp. 469–472.

Endepols, S. *et al.* (2015) 'RRAC guidelines on anticoagulant rodenticide resistance management'. Croplife International.

Endres, T. and Fendt, M. (2007) 'Conditioned behavioral responses to a context paired with the predator odor trimethylthiazoline.', *Behavioral neuroscience*, 121(3), p. 594.

Fendt, M. *et al.* (2005) 'TMT-induced autonomic and behavioral changes and the neural basis of its processing', *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(8), pp. 1145–1156.

Fendt, M. (2006) 'Exposure to urine of canids and felids, but not of herbivores, induces defensive behavior in laboratory rats', *Journal of chemical ecology*. Springer, p. 2617.

Fendt, M. and Endres, T. (2008) '2, 3, 5-Trimethyl-3-thiazoline (TMT), a component of fox odor--just repugnant or really fear-inducing?', *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(7), pp. 1259–1266.

Feoktistova, N. Y. *et al.* (2003) 'The influence of predator odours and overcrowded mouse odours on regulation of oestrous cycles in house mice (*Mus musculus*)', in

Singleton, G. R. et al. (eds) *Rats, mice and people: Rodent biology and management*.

AUSTRALIAN CENTRE FOR INTERNATIONAL AGRICULTURAL, pp. 173–175.

Fuentes Paredes, F. de M. et al. (2010) 'Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón'.

Geduhn, A. et al. (2015) 'Relation between intensity of biocide practice and residues of anticoagulant rodenticides in red foxes (*Vulpes vulpes*)', *PLoS One*, 10(9).

Gómez Villafañe, I. E., Bilenca, D. N., et al. (2001) 'Environmental factors associated with rodent infestation in Argentine poultry farms', *British Poultry Science*, 42, pp. 300–307.

Gómez Villafañe, I. E., Bilenca, D., et al. (2001) 'Environmental factors associated with rodent infestations in Argentine poultry farms.', *British Poultry Science*, 42(3), pp. 300–307.

Gómez Villafañe, I. E. et al. (2003) 'Intra-farm variation of rodent infestations on poultry farms of central Argentina', *British Poultry Science*, 44(5), pp. 669–673.

Gómez Villafañe, I. E. et al. (2019) 'CONNECTIVITY AMONG NORWAY RAT SUB POPULATIONS (*Rattus norvegicus*) AT POULTRY FARMS IN EXALTACIÓN DE LA CRUZ, BUENOS AIRES, ARGENTINA.', *Mastozoología Neotropical*, 26(2).

Gómez Villafañe, I. E. and Busch, M. (2007) 'Spatial and temporal patterns of brown rat (*Rattus norvegicus*) abundance in poultry farms', *Mammalian Biology*, 72(6), pp. 364–371.

Gosling, L. M. and Baker, S. J. (1989) 'The eradication of muskrats and coypus from

Britain', *Biological Journal of the Linnean Society*, 38(1), pp. 39–51.

Guerisoli, M. M. *et al.* (2019) 'Evitando conflictos socioambientales: ensayos de repelencia para minimizar/evitar el daño por el ciervo de los pantanos bajo un contexto productivo', in *XXXII Jornadas Argentinas de Mastozoología*, p. 132.

Hansen, S. C., Stolter, C. and Jacob, J. (2015) 'The smell to repel: the effect of odors on the feeding behavior of female rodents', *Crop Protection*, 78, pp. 270–276.

Hendriks, W. H. *et al.* (1995) 'Felinine: a urinary amino acid of Felidae', *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 112(4), pp. 581–588.

Hendriks, W. H., Tarttelin, M. F. and Moughan, P. J. (1995) 'Twenty-four hour feline excretion patterns in entire and castrated cats', *Physiology & behavior*, 58(3), pp. 467–469.

Horii, Y. *et al.* (2010) 'Exposure to TMT odor affects adrenal sympathetic nerve activity and behavioral consequences in rats', *Behavioural brain research*, 214(2), pp. 317–322.

Huchon, D. *et al.* (2002) 'Rodent phylogeny and a timescale for the evolution of Glires: evidence from an extensive taxon sampling using three nuclear genes', *Molecular Biology and Evolution*, 19(7), pp. 1053–1065.

Hussain, I. and others (2016) 'The level of rodent problems in poultry farms of Rawalpindi-Islamabad, Pakistan', *Mammalia*. De Gruyter, pp. 193–204.

Hussain, I. and Prescott, C. V (2003) 'Warfarin susceptibility in the lesser bandicoot rat (*Bandicota bengalensis*)', in Singleton, G. *et al.* (eds) *Rats, mice and people: Rodent*

biology and management. AUSTRALIAN CENTRE FOR INTERNATIONAL AGRICULTURAL, pp. 465–468.

Jackson, W. B. and Ashton, A. D. (1992) 'A review of available anticoagulants and their use in the United States'.

Juan, L. *et al.* (2013) 'A new ovitrap made of slow release natural materials containing pyriproxyfen for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) control', *Journal of medical entomology*, 50(4), pp. 916–919.

Juan, L. W. *et al.* (2010) 'New spot-on formulation containing chlorpyrifos for controlling horn flies on cattle: laboratory model of insecticide release and field trial', *Parasitology research*, 107(4), pp. 967–974.

Kilkenny, C. *et al.* (2010) 'Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines', *British journal of pharmacology*, 160(7), p. 1577.

León, V. A., Fraschina, J. and Busch, M. (2010) 'Population subdivision of house mice (*Mus musculus*) in an agrarian landscape: consequences for control', *Canadian Journal of Zoology*, 88(5), pp. 427–435.

Lovera, R. *et al.* (2017) 'Intrinsic and extrinsic factors related to pathogen infection in wild small mammals in intensive milk cattle and swine production systems', *PLoS neglected tropical diseases*, 11(6), p. e0005722.

Macdonald, D. W., Fenn, M. G. P. and Gelling, M. (1994) 'The natural history of rodents: preadaptations to pestilence', in *Rodent pests and their control*. CAB International Oxon, UK, pp. 1–21.

Maeda, K.-I., Ohkura, S. and Tsukamura, H. (2000) 'Physiology of reproduction', in *The laboratory rat*. Elsevier, pp. 145–176.

Magnusson, A. *et al.* (2017) 'glmmTMB: generalized linear mixed models using template model builder. R package version 0.1. 3'.

Mandairon, N. and Linster, C. (2009) 'Odor perception and olfactory bulb plasticity in adult mammals', *Journal of neurophysiology*, 101(5), pp. 2204–2209.

Martella, M. B. and Navarro, J. L. (2006) 'Proyecto Ñandú. Manejo de *Rhea americana* y *R. pennata* en la Argentina', in Bolkovic, M. L. and Ramadoris, D. (eds) *Manejo de Fauna Silvestre en la Argentina. Programas de uso sustentable*. Buenos Aires: Dirección de Fauna Silvestre, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable.

McGregor, I. S. *et al.* (2002) 'Not all "predator odours" are equal: cat odour but not 2, 4, 5 trimethylthiazoline (TMT; fox odour) elicits specific defensive behaviours in rats', *Behavioural brain research*, 129(1–2), pp. 1–16.

Meerburg, B. G. *et al.* (2004) 'Towards sustainable management of rodents in organic animal husbandry', *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences*, 52(2), pp. 195–205.

Meerburg, B. G. (2006) *Zoonotic risks of rodents in livestock production*. Muisketier, Wageningen.

Meerburg, B. G., Singleton, G. R. and Kijlstra, A. (2009) 'Rodent-borne diseases and their risks for public health', *Critical reviews in microbiology*, 35(3), pp. 221–270.

Mills, J. N. *et al.* (1991) 'Habitat associations and relative densities of rodent populations in cultivated areas of central Argentina', *Journal of Mammalogy*, 72(3), pp.

470–479.

Mills, J. N. and Childs, J. E. (1998) 'Ecologic studies of rodent reservoirs: Their relevance for human health', *Emerging Infectious Diseases*, 4, p. 537.

Miño, M. H. (2003) *Caracterización de las comunidades de pequeños roedores en granjas avícolas del partido de Exaltación de la Cruz (provincia de Buenos Aires)*. PhD thesis, Universidad de Buenos Aires.

Miño, M. H. *et al.* (2007) 'Seasonal abundance and distribution among habitats of small rodents on poultry farms. A contribution for their control', *International Journal of Pest Management*, 12, pp. 1–6.

Morrow, B. A. *et al.* (2000) 'The predator odor, TMT, displays a unique, stress-like pattern of dopaminergic and endocrinological activation in the rat', *Brain research*, 864(1), pp. 146–151.

Morrow, B. A., Elsworth, J. D. and Roth, R. H. (2002) 'Fear-like biochemical and behavioral responses in rats to the predator odor, TMT, are dependent on the exposure environment', *Synapse*, 46(1), pp. 11–18.

Naidenko, Sergey V *et al.* (2003) 'Predator presence affects the reproductive success of prey in outdoor conditions'.

Osada, K. *et al.* (2013) 'Pyrazine analogues are active components of wolf urine that induce avoidance and freezing behaviours in mice', *PLoS One*, 8(4), p. e61753.

Parkes, A. S. and Bruce, H. M. (1961) 'Olfactory stimuli in mammalian reproduction', *Science*, 134(3485), pp. 1049–1054.

Parshad, V. R., Ahmad, N. and Chopra, G. (1987) 'Deterioration of poultry farm environment by commensal rodents and their control', *International Biodeterioration*, 23(1), pp. 29–46.

Parsons, M. H. *et al.* (2018) 'Biologically meaningful scents: a framework for understanding predator--prey research across disciplines', *Biological Reviews*, 93(1), pp. 98–114.

Pelz, H.-J. *et al.* (2005) 'The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents', *Genetics*, 170(4), pp. 1839–1847.

Pratt, H. D. (1991) 'Control of commensal rats and mice. Self study course 3013-G, Vector-Borne disease control. CDC Manual', *Public Health Service, Atlanta*.

Le Quoc Cuong, H. V. C., Le Van Han, V. H. D. and Grant, R. (2003) 'Relationship between rodent damage and yield loss in rice in the Mekong Delta, Vietnam', *Rats, mice and people*, p. 297.

Rajendren, G. and Dominic, C. J. (1986) 'Effect of bilateral transection of the lateral olfactory tract on the male-induced implantation failure (the Bruce effect) in mice', *Physiology & behavior*, 36(4), pp. 587–590.

Ramatla, T. *et al.* (2019) 'Identification of Rodent Species That Infest Poultry Houses in Mafikeng, North West Province, South Africa', *International Journal of Zoology*, 2019.

Rosen, J. B. *et al.* (2008) 'Analysis of behavioral constraints and the neuroanatomy of fear to the predator odor trimethylthiazoline: a model for animal phobias', *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(7), pp. 1267–1276.

Rosen, J. B., Asok, A. and Chakraborty, T. (2015) 'The smell of fear: innate threat of 2, 5-dihydro-2, 4, 5-trimethylthiazoline, a single molecule component of a predator odor', *Frontiers in neuroscience*, 9, p. 292.

Schlötterburg, A. *et al.* (2018) 'Natural bait additives improve trapping success of common voles, *Microtus arvalis*', *Applied animal behaviour science*. Elsevier, pp. 75–81.

Du Sert, N. P. *et al.* (2020) 'The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research', *BMC Veterinary Research*, 16(1), pp. 1–7.

Singleton, G. R. *et al.* (1999) 'Ecologically-based management of rodent pests - Re-evaluating our approach to an old problem', in Singleton, G. R. *et al.* (eds) *Ecologically-based rodent management*. Canberra: Australian Center for International Agricultural Research, pp. 17–29.

Singleton, G. R. (2003) *Impacts of rodents on rice production in Asia*. IRRI discussion paper series.

Singleton, G. R. *et al.* (2003) *Rats, mice and people: Rodent biology and management*. Canberra: ACIAR Monograph No. 96.

Southwood, T. R. E. and Henderson, P. A. (2000) *Ecological methods*. Third. Oxford: Blackwell Science Ltd.

Southwood, T. R. E. and Henderson, P. A. (2009) *Ecological methods*. John Wiley & Sons.

Spruijt, B. M., Van Hooff, J. A. and Gispen, W. H. (1992) 'Ethology and neurobiology of

grooming behavior', *Physiological reviews*, 72(3), pp. 825–852.

Staples, L. G. *et al.* (2008) 'Cat odor, but not trimethylthiazoline (fox odor), activates accessory olfactory and defense-related brain regions in rats', *Neuroscience*, 151(4), pp. 937–947.

Staples, L. G. (2010) 'Predator odor avoidance as a rodent model of anxiety: learning-mediated consequences beyond the initial exposure', *Neurobiology of learning and memory*, 94(4), pp. 435–445.

Staples, L. G. and McGregor, I. S. (2006) 'Defensive responses of Wistar and Sprague-Dawley rats to cat odour and TMT', *Behavioural brain research*, 172(2), pp. 351–354.

Stenseth, N. C. *et al.* (2003) 'Mice, rats and people: the bio-economics of agricultural rodent pests', *Frontiers in Ecology and the Environment*, 1, pp. 367–375.

Sullivan, T. P. *et al.* (1988) 'Predator odors and their potential role in managing pest rodents and rabbits', in *Proceedings of the Vertebrate Pest Conference*.

Sullivan, T. P., Nordstrom, L. O. and Sullivan, D. S. (1985) 'Use of predator odors as repellents to reduce feeding damage by herbivores', *Journal of Chemical Ecology*, 11(7), pp. 903–919.

Swihart, R. K., Bryant, J. P. and Newton, L. (1994) 'Latitudinal patterns in consumption of woody plants by snowshoe hares in the eastern United States', *Oikos*, pp. 427–434.

Timm, R. M. (1987a) 'Commensal rodents in insulated livestock buildings', *Control of mammal pests/edited by CGJ Richards and TY Ku*.

Timm, R. M. (1987b) 'Commensal rodents in insulated livestock buildings', in Richards, C.

- G. J. and Ku, T. Y. (eds) *Control of mammal pests*. London: Taylor & Francis.
- Vasilieva, N. Y. *et al.* (2000) 'Predator odour and its impact on male fertility and reproduction in *Phodopus campbelli* hamsters', *Naturwissenschaften*, 87(7), pp. 312–314.
- Vernet-Maury, E. (1980) 'Trimethyl-thiazoline in fox feces: a natural alarming substance for the rat', *Olfaction taste*, 7, p. 407.
- Vernet-Maury, E., Polak, E. H. and Demael, A. (1984) 'Structure-activity relationship of stress-inducing odorants in the rat', *Journal of Chemical Ecology*, 10(7), pp. 1007–1018.
- Villa, B. and Velasco, A. (1994) 'Integrated pest management of the rat *Rattus norvegicus* in poultry farms', *Veterinaria-México*, 25, pp. 247–249.
- Voznessenskaya, V. V *et al.* (2003) 'Predator odours as reproductive inhibitors for Norway rats', *USDA National Wildlife Research Center-Staff Publications*, p. 251.
- Voznessenskaya, V. V (2014) 'Influence of cat odor on reproductive behavior and physiology in the house mouse (*Mus musculus*)', *Neurobiology of chemical communication*, pp. 389–406.
- Voznessenskaya, V. V and Malanina, T. V (2013) 'Effect of chemical signals from a predator (*Felis catus*) on the reproduction of *Mus musculus*', *Doklady Biological Sciences*, 453(1), p. 362.
- Wagner, K. K. and Nolte, D. L. (2000) 'Evaluation of Hot Sauce® as a repellent for forest mammals', *Wildlife Society Bulletin*, pp. 76–83.
- Westall, R. G. (1953) 'The amino acids and other ampholytes of urine. 2. The isolation

of a new sulphur-containing amino acid from cat urine', *Biochemical Journal*, 55(2), pp. 244–248.

Yin, B. *et al.* (2011) 'Behavioral response of Norway rats (*Rattus norvegicus*) to odors of different mammalian species', *Journal of pest science*, 84(3), p. 265. Available at: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s10340-011-0351-8.pdf>.

Zacharias, R., de Catanzaro, D. and Muir, C. (2000) 'Novel male mice disrupt pregnancy despite removal of vesicular-coagulating and preputial glands', *Physiology & behavior*, 68(3), pp. 285–290.

Zar, J. H. (1999) *Biostatistical analysis*. Pearson Education India.

ANEXO

Capítulo 3 – Parte 1

Tabla A1. Resultados del Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) para la variable “Proporción de abortos por hembra” por tratamiento, considerando el momento del experimento y el individuo como un factor aleatorio, con distribución Binomial, valores de significancia: * $p < 0,00625$ o ** $p < 0,001$.

Variable explicativa	Estimador	SE	Z	p
Ordenada al origen (Control)	-2,376	0,298	-7,998	1,26e-15 ***
17 β -estradiol	0,130	0,402	0,323	0,747
Co-específico hacinado	0,523	0,430	1,216	0,224
Macho extraño	0,021	0,476	0,043	0,965
Orina de gato	1,364	0,410	3,327	0,0009 **
TMT	0,326	0,420	0,775	0,438

* $p < 0,00625$, ** $p < 0,001$. SE = Error estándar. Z= parámetro estimado. Número total de observaciones: 130, porque datos no analizables fueron eliminados

Tabla A2. Resultados del Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) para la variable “Preñez” por tratamiento, considerando el momento del experimento como un factor aleatorio, con distribución Binomial, valores de significancia: * $p < 0,00625$ o ** $p < 0,001$.

Variable explicativa	Estimador	SE	Z	p
Ordenada al origen (Control)	1,833 e ⁺⁰⁰	5,385 e ⁻⁰¹	3,403	0,000 **
17 β -estradiol	8,065 e ⁻⁰¹	9,087 e ⁻⁰¹	0,888	0,375
Co-específico hacinado	1,112 e ⁺⁰⁰	1,159 e ⁺⁰⁰	0,960	0,337
Macho extraño	-7,340 e ⁻⁰¹	7,461 e ⁻⁰¹	-0,984	0,325
Orina de gato	2,949 e ⁺⁰¹	1,418 e ⁺⁰⁶	0,000	0,100
TMT	-6,430 e ⁻⁰¹	6,902 e ⁻⁰¹	-0,932	0,352

* $p < 0,00625$, ** $p < 0,001$. SE = Error estándar. Z= parámetro estimado. Número total de observaciones: 149.

Tabla A3. Resultados del Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) para la variable “Éxito de preñez” por tratamiento, considerando el momento del experimento como un factor aleatorio, con distribución Binomial, valores de significancia: * $p < 0,00625$ o ** $p < 0,001$.

Variable explicativa	Estimador	SE	Z	p
Ordenada al origen (Control)	1,566	0,509	3,078	0,002 *
17 β -estradiol	0,287	0,739	0,388	0,698
Co-específico hacinado	0,209	0,827	0,252	0,801
Macho extraño	-0,364	0,823	- 0,442	0,658
Orina de gato	0,181	0,83	0,217	0,828
TMT	-0,725	0,644	-1,126	0,260

* $p < 0,00625$, ** $p < 0,001$. SE = Error estándar. Z= parámetro estimado. Número total de observaciones: 149.

Tabla A4. Resultados del Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) para la variable “Cantidad de crías nacidas por hembra” por tratamiento, considerando el momento del experimento como un factor aleatorio, con distribución ZAP (Modelo inflado en ceros), valores de significancia: * $p < 0,00625$ o ** $p < 0,001$.

Variable explicativa	Estimador	SE	Z	p
Ordenada al origen (Control)	-1,602	0,543	-2,947	0,003 *
17 β -estradiol	0,028	0,726	0,039	0,969
Co-específico hacinado	-0,248	0,841	-0,295	0,768
Macho extraño	0,254	0,788	0,322	0,748
Orina de gato	-0,117	0,899	-0,130	0,897
TMT	0,935	0,664	1,409	0,159

* $p < 0,00625$, ** $p < 0,001$. SE = Error estándar. Z= parámetro estimado. Número total de observaciones: 149.

Tabla A5. Resultados del Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) para la variable “Cantidad de crías al destete por hembra” por tratamiento, considerando el momento del experimento como un factor aleatorio, con distribución ZAP (Modelo inflado en ceros), valores de significancia: * $p < 0,00625$ o ** $p < 0,001$.

Variable explicativa	Estimador	SE	Z	p
Ordenada al origen (Control)	-0,965	0,457	-2,111	0,035
17 β -estradiol	-0,052	0,610	-0,085	0,933
Co-específico hacinado	-0,920	0,822	-1,119	0,263
Macho extraño	-0,111	0,756	-0,147	0,884
Orina de gato	-0,019	0,793	-0,024	0,981
TMT	0,771	0,599	1,287	0,198

* $p < 0,00625$, ** $p < 0,001$. SE = Error estándar. Z= parámetro estimado. Número total de observaciones: 149.

Tabla A6. Resultados del Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) para la variable “Peso de las crías al nacer” por tratamiento, considerando el momento del experimento como un factor aleatorio, con distribución Normal, valores de significancia: * $p < 0,00625$ o ** $p < 0,001$.

Variable explicativa	Estimador	SE	t
Ordenada al origen (Control)	1,540	0,069	22,309
17 β -estradiol	0,023	0,093	0,253
Co-específico hacinado	0,052	0,104	0,497
Macho extraño	0,143	0,108	1,316
Orina de gato	0,113	0,112	1,006
TMT	-0,052	0,099	-0,528

* $p < 0,00625$, ** $p < 0,001$. SE = Error estándar. t= parámetro estimado. Número total de observaciones: 117, porque datos no analizables fueron eliminados.

Tabla A7. Resultados del Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) para la variable “Peso de las crías al destete” por tratamiento, considerando el momento del experimento como un factor aleatorio, con distribución Normal, valores de significancia: * $p < 0,00625$ o ** $p < 0,001$.

Variable explicativa	Estimador	SE	t
Ordenada al origen (Control)	8,745	0,851	10,273
17 β -estradiol	-0,393	1,161	-0,339
Co-específico hacinado	-1,373	1,256	-1,094
Macho extraño	1,221	1,326	0,921
Orina de gato	0,401	1,346	0,298
TMT	0,901	1,248	0,722

* $p < 0,00625$, ** $p < 0,001$. SE = Error estándar. t= parámetro estimado. Número total de observaciones: 106, porque datos no analizables fueron eliminados.

Tabla A8. Resultados del Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) para la variable “Proporción de mortalidad de crías por hembra” por tratamiento, considerando el momento del experimento y al individuo como un factor aleatorio, con distribución Binomial, valores de significancia: * $p < 0,00625$ o ** $p < 0,001$.

Variable explicativa	Estimador	SE	Z	p
Ordenada al origen (Control)	-2,123	0,646	-3,287	0,000 *
17 β -estradiol	0,609	0,868	0,701	0,483
Co-específico hacinado	-0,068	0,989	-0,068	0,946
Macho extraño	-0,347	1,024	-0,339	0,735
Orina de gato	-0,704	1,018	-0,692	0,489
TMT	-0,219	0,945	-0,232	0,817

* $p < 0,00625$, ** $p < 0,001$. SE = Error estándar. Z= parámetro estimado. Número total de observaciones: 120, porque datos no analizables fueron eliminados.

Tabla A9. Resultados del Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) para la variable “Preñez” por tratamiento, considerando el momento del experimento como un factor aleatorio, con distribución Binomial. Valores de significancia: *= p<0,00625 o **p<0,001.

Variable explicativa	Estimado	SE	Z	P-valor
Ordenada al origen (Control)	2,9 e ⁺⁰⁰	1,0 e ⁺⁰⁰	2,9	0,00411 **
17β-estradiol	-7,5 e ⁻⁰¹	1,3 e ⁺⁰⁰	-0,6	0,55
TMT	1,2 e ⁻¹⁴	1,4 e ⁺⁰⁰	0,0	1,00

SE = Error estándar. Z= parámetro estimado. Cantidad de observaciones: 60.

Tabla A10. Modelos Lineales Generalizados y Mixtos con diferentes distribuciones para la variable “Proporción de abortos por hembra” por tratamiento. Todos los modelos incluyeron al momento del experimento como un factor aleatorio.

	Tratamiento	Individuo (factor aleatorio)	Distribución	AIC	Grados de libertad
M0	+		Binomial	223,23	4
M1	+	+	Binomial	216,83	5
M2 (Nulo)		+	Binomial	213,43	3

Tabla A11. Resultados del Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) para la variable “Éxito de preñez” por tratamiento, considerando al momento del experimento como un factor aleatorio, con distribución Binomial. Valores de significancia: *= p<0.00625 o **p<0.001.

	Tratamiento	Distribución	AIC	Grados de libertad
M0	+	Binomial	41,9	4
M1 (Nulo)		Binomial	38,4	2

Tabla A12. Modelos Lineales Generalizados y Mixtos con diferentes distribuciones para la variable “Cantidad de crías al nacer por hembra” por tratamiento. Todos los modelos incluyeron al momento del experimento como un factor aleatorio.

	Tratamiento	Distribución	AIC	Grados de libertad
M0	+	Poisson	395,5	4
M1	+	Binomial Negativa	370,7	5
M2	+	Compoisson	360,8	5
M3 (Nulo)		Compoisson	357,5	3

SE = Error estándar. Z= parámetro estimado. Cantidad de observaciones: 60.

Tabla A13. Modelos Lineales Generalizados y Mixtos con diferentes distribuciones para la variable “Cantidad de crías al destete por hembra” por tratamiento. Todos los modelos incluyeron al momento del experimento como un factor aleatorio.

	Tratamiento	Distribución	AIC	Grados de libertad
M0	+	Poisson	410,3	4
M1	+	Hurdle Poisson	343,3	8
M2 (Nulo)		Hurdle Poisson	336,2	4

SE = Error estándar. Z= parámetro estimado. Cantidad de observaciones: 60.

Tabla A14. Resultados del Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) para la variable “Peso de las crías al nacer” por tratamiento, considerando al momento del experimento como un factor aleatorio, con distribución Normal, Valores de significancia: * $p < 0,00625$ o ** $p < 0,001$.

Variable explicativa	Estimado	SE	t
Ordenada al origen (Control)	1,6	0,06	26,758
17β-estradiol	0,12	0,08	1,4
TMT	-0,02	0,08	-0,3

SE = Error estándar, t= parámetro estimado. Cantidad de observaciones: 55, porque datos no analizables fueron eliminados.

Tabla A15. Resultados del Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) para la variable “Peso de las crías al destete” por tratamiento, considerando al momento del experimento como un factor aleatorio, con distribución Normal, Valores de significancia: * $p < 0,00625$ o ** $p < 0,001$.

Variable explicativa	Estimado	SE	t
Ordenada al origen (Control)	11,9	2,0	5,9
17β-estradiol	-1,1	0,9	-1,2
TMT	0,8	0,9	0,8

SE = Error estándar, t= parámetro estimado. Cantidad de observaciones: 52, porque datos no analizables fueron eliminados.

Tabla A16. Modelos Lineales Generalizados y Mixtos con diferentes distribuciones para la variable “Proporción de la mortalidad de las crías por hembra” por tratamiento. Todos los modelos incluyeron al momento del experimento como un factor aleatorio.

	Tratamiento	Individuo (aleatorio)	Distribución n	AIC	Grados de libertad
M0	+		Binomial	314,6	4
M1	+	+	Binomial	158,3	5
M2 (Nulo)		+	Binomial	156,2	3

Capítulo 3 – Parte 3

Tabla A17. Resultados del Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) para la variable “Preñez” por tratamiento, considerando al momento del experimento como un factor aleatorio, con distribución Binomial. Valores de significancia: *= p<0,00625 o **p<0,001.

Variable explicativa	Estimado	SE	Z	p
Ordenada al origen (Control)	2,17475	0,47194	4,608	4,06 e ⁻⁰⁶ **
17β-estradiol.2días	0,02247	0,88220	0,025	0,980
17β-estradiol.4días	0,46431	0,87088	0,533	0,594
TMT.2días	0,76969	1,12931	0,682	0,496
TMT.4días	-0,98517	0,63958	-1,540	0,123

SE = Error estándar. Z= parámetro estimado. Cantidad de observaciones: 149.

Tabla A18. Modelos Lineales Generalizados y Mixtos con diferentes distribuciones para la variable “Proporción de abortos por hembra” por tratamiento. Todos los modelos incluyeron al momento del experimento como un factor aleatorio.

	Tratamiento	Individuo (factor aleatorio)	Distribución	AIC	Grados de libertad
M0	+		Binomial	520,9	6
M1	+	+	Binomial	485,4	7
M2 (Nulo)		+	Binomial	480,9	3

Tabla A19. Resultados del Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) para la variable “Éxito de preñez” por tratamiento, considerando al momento del experimento como un factor aleatorio, con distribución Binomial. Valores de significancia: *= p<0,00625 o **p<0,001.

Variable explicativa	Estimado	SE	Z	p
Ordenada al origen (Control)	2,0222	0,4829	4,188	2,82e ⁻⁰⁵ ***
17β-estradiol.2días	0,1125	0,9061	0,124	0,9012
17β-estradiol.4días	-0,3805	0,6988	-0,544	0,5861
TMT.2días	0,1125	0,9061	0,124	0,9012
TMT.4días	-1,3263	0,6284	-2,111	0,0348

SE = Error estándar. Z= parámetro estimado. Cantidad de observaciones: 149.

Tabla A20. Modelos Lineales Generalizados y Mixtos con diferentes distribuciones para la variable “Cantidad de crías al nacer por hembra” por tratamiento. Todos los modelos incluyeron al momento del experimento como un factor aleatorio.

	Tratamiento	Distribución	AIC	Grados de libertad
M0	+	Poisson	1124,8	6
M1	+	Hurdle Poisson	813,1	12
M2 (Nulo)		Hurdle Poisson	806,1	4

Tabla A21. Modelos Lineales Generalizados y Mixtos con diferentes distribuciones para la variable “Cantidad de crías al destete por hembra” por tratamiento. Todos los modelos incluyeron al momento del experimento como un factor aleatorio.

	Tratamiento	Distribución	AIC	Grados de libertad
M0	+	Poisson	1121,4	6
M1	+	Hurdle Poisson	811,5	10
M2 (Nulo)		Hurdle Poisson	806,1	4

Tabla A22. Resultados del Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) para la variable “Peso de las crías al nacer” por tratamiento, considerando al momento del experimento como un factor aleatorio, con distribución Normal, Valores de significancia: * $p < 0,00625$ o ** $p < 0,001$.

Variable explicativa	Estimado	SE	t
Ordenada al origen (Control)	1,54920	0,04661	33,239
17β-estradiol.2días	0,17636	0,08580	2,055
17β-estradiol.4días	0,02407	0,07687	0,313
TMT.2días	0,02802	0,08580	0,327
TMT.4días	-0,05989	0,08272	-0,724

SE = Error estándar, t= parámetro estimado. Cantidad de observaciones: 124, porque datos no analizables fueron eliminados.

Tabla A23. Resultados del Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) para la variable “Peso de las crías al destete” por tratamiento, considerando al momento del experimento como un factor aleatorio, con distribución Normal, Valores de significancia: * $p < 0,00625$ o ** $p < 0,001$.

Variable explicativa	Estimado	SE	t
Ordenada al origen (Control)	9,4230	0,9635	9,780
17β-estradiol.2días	-0,3783	1,1540	-0,328
17β-estradiol.4días	-0,8339	1,1353	-0,735
TMT.2días	1,2843	1,1740	1,094
TMT.4días	0,6367	1,2757	0,499

SE = Error estándar, t= parámetro estimado. Cantidad de observaciones: 112, porque datos no analizables fueron eliminados.

Tabla A24. Resultados del Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) para la variable “Proporción de la mortalidad de las crías por hembra” por tratamiento, considerando al momento del experimento y al individuo como un factor aleatorio, con distribución Binomial, Valores de significancia: *= p<0,00625 o **p<0,001,

Variable explicativa	Estimado	SE	Z	P-valor
Ordenada al origen (Control)	-2,6634	0,6087	-4,376	1,21e ⁻⁰⁵ **
17β-estradiol.2días	-2,5122	1,0878	-2,309	0,0209
17β-estradiol.4días	1,1453	0,8972	1,276	0,2018
TMT.2días	-0,6483	1,0389	-0,624	0,5326
TMT.4días	0,2123	0,9909	0,214	0,8303

SE = Error estándar. Z= parámetro estimado. Cantidad de observaciones: 124, porque datos no analizables fueron eliminados.

Capítulo 4

Tabla A25. Modelos Lineales Generalizados y Mixtos con diferentes distribuciones para el número de Visitas para ratones hembras. Todos los modelos incluyeron el experimento como un factor aleatorio.

	Tratamiento	Distribución	AIC	Grados de libertad
M0	+	Gaussiana	181.191	6
M1	+	Poisson	170.520	5
M2	+	Hurdle Poisson	148.599	10
M3 (Nulo)		Hurdle Poisson	147.901	4

Tabla A26. Resultados del Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) para el número de Visitas a la caja de olor por tratamiento para ratones machos, considerando el experimento como un efecto aleatorio, con el modelo ZAP (distribución de Poisson inflado en cero). Valores de significancia: 0 ‘***’, 0,001 ‘**’, 0,01 ‘*’.

Variable explicativa	Estimado	SE	Z	P-valor
Ordenada al origen (Control)	1,844	0,163	11,303	<2e-16 ***
Piel de gato	0,101	0,314	0,322	0,748
Orina de gato	-0,478	0,342	-1,396	0,163
TMT	0,517	0,213	2,423	0,015 *

SE = Error estándar, Z= parámetro estimado, Cantidad de observaciones: 32.

Tabla A27. Resultados del Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) para el número de Visitas a la caja de olor por tratamiento para ratas hembras, considerando el experimento como un factor aleatorio, con distribución de Poisson. Valores de significancia: 0 '***', 0,001 '**', 0,01 '*'.

Variable explicativa	Estimado	SE	Z	P-valor
Ordenada al origen (Control)	2,11e+00	1,231e-01	17,143	<2e-16 ***
Piel de gato	-6,633e-01	2,111e-01	-3,142	0,00168 **
Orina de gato	-1,780e-15	1,741e-01	0,000	1,00000
TMT	-1,194e+00	2,552e-01	-4,678	2,9e-06 ***

SE = Error estándar, Z= parámetro estimado, Cantidad de observaciones: 32.

Tabla A28. Modelos Lineales Generalizados y Mixtos con diferentes distribuciones para la variable Duración en la caja de olor por tratamiento para *M*, *musculus*, Todos los modelos incluyeron el experimento como un factor aleatorio,

	Tratamiento	Individuo (factor aleatorio)	Distribución	AIC	Grados de libertad
M0	+		Binomial	608,8	9
M1	+	+	Binomial	272,0	10
M2 (Nulo)		+	Binomial	265,4	3

Tabla A29. Modelos Lineales Generalizados y Mixtos con diferentes distribuciones para la variable Duración en la caja de olor por tratamiento para ratas macho. Todos los modelos incluyeron el experimento como un factor aleatorio.

	Tratamiento	Individuo (factor aleatorio)	Distribución	AIC	Grados de libertad
M0	+		Binomial	328,8	5
M1	+	+	Binomial	226,9	6
M2 (Nulo)		+	Binomial	224,7	3

Tabla A30. Resultados del Modelo Lineal Generalizado Mixto (GLMM) para la variable Duración en la caja de olor por tratamiento para ratas hembras, considerando el experimento como un factor aleatorio, con distribución binomial. Valores de significancia: 0 '***', 0,001 '**', 0,01 '*'.

Variable explicativa	Estimado	SE	Z	P-valor
Ordenada al origen (Control)	-1,217	0,16	-7,601	2,94e-14 ***
Piel de gato	0,175	0,230	0,760	0,447
Orina de gato	0,672	0,220	3,049	0,0023 **
TMT	-0,467	0,278	-1,681	0,093

SE = Error estándar. Z= parámetro estimado. Cantidad de observaciones: 32.