

Mario Orts
Richart

QUIMIOSEÑALES EN LA CONDUCTA SOCIAL EN *MUS* *MUSCULUS*

ANÁLISIS CONDUCTUAL ANTE SEÑALES DE
ENFERMEDAD Y ESTÍMULOS DE DEPREDADOR

Autor
Mario Orts Richart


VNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Doctorado en Neurociencias

Director de la Tesis
Enrique Lanuza Navarro

Quimioseñales en la Conducta social en *Mus musculus*
Análisis Conductual ante Señales de Enfermedad y Estímulos de Depredador

2022



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA



Junio 2022

QUIMIOSEÑALES EN LA CONDUCTA SOCIAL EN *Mus musculus*

*ANÁLISIS CONDUCTUAL ANTE SEÑALES DE
ENFERMEDAD Y ESTÍMULOS DE DEPREDADOR*

AUTOR

Mario Orts Richart



VNIVERSITAT D VALÈNCIA

Doctorado en Neurociencias

DIRECTOR DE LA TESIS

Enrique Lanuza Navarro

Junio de 2022

Burjassot, 14-mayo-2022

D. Enrique Lanuza Navarro, Doctor en Ciencias Biológicas y Catedrático del Departamento de Biología Celular, Biología Funcional y Antropología Física de la Universitat de València,

CERTIFICA

que D. Mario Orts Richart, Graduado en Psicología y Máster en Neurociencias Básicas y Aplicadas por la Universitat de València, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Quimioseñales en la conducta social en *Mus musculus*. Análisis conductual ante señales de enfermedad y estímulos de depredador” para optar al Grado de Doctor en Biología en el Programa de Doctorado en Neurociencias.

Para que conste, en cumplimiento de la legislación vigente, hago constar que dicho trabajo recibe mi INFORME FAVORABLE y firmo el presente certificado a 14 de mayo de 2022

Enrique Lanuza Navarro
Catedràtic d'Universitat
Dept. de Biologia Cel·lular,
Fac. CC. Biològiques
Universitat de València



Durante la realización de esta tesis, el autor ha sido beneficiario de una beca predoctoral del Programa “Ayudas para la Contratación de Personal Investigador en Formación” de la *Conselleria* de Educación, Investigación y Deporte y del Fondo Social Europeo con el código ACIF/2018/060.

Además, esta tesis se ha enmarcado en los proyectos financiados por:

- *Circuitos neurales de la atracción por feromonas sexuales y aversión por señales de enfermedad: Un estudio anatómico, electrofisiológico y comportamental*; Ministerio de Economía y Competitividad-FEDER; Código: BFU2016-77691-C2-2-P; Duración: 2017-2019.

- *Integración de Memoria social y espacial en los circuitos amigdaló-hipocámpales en ratones*; Ministerio de Ciencia e Innovación-FEDER; Código: PID2019-108562GB-I00; Duración: 2020-2023.

"Bástame solo suplicaros acojáis con benevolencia este insignificante trabajo en el que, como dije al principio, se contendrán grandes defectos debido sin duda a mi natural insuficiencia."

*Tesis Doctoral de
Santiago Ramón y Cajal*

"Non est ad astra mollis e terris via. Per aspera ad astra"

Lucio Anneo Seneca

"Hay otras muchas cosas, Sócrates, sobre las que la gente se engaña"

Protágoras, Platón

Agradecimientos

Primero de todo, a Enrique, al que le debo no solo ser el demiurgo aristotélico de este trabajo y el *primum cognitum* semicartesiano/semitesiano, sino los años de continua humanidad y cercanía que ha tenido a bien de compartir conmigo. Mi agradecimiento va más allá de las palabras.

También gracias a mis compañeros de laboratorio, algunos casi hermanos. En especial a Manel que, a base de hierro y sudor, ha ampliado las cortas miras de este patoso observador del mundo. Gracias a tu dedo, más que el de Platón o el de Aristóteles, he alcanzado las vistas que me han llevado a donde estoy. Recuerda: *per aspera ad abstra*. Yo no lo olvidaré.

Gracias a mi familia, que me ha hecho crecer: a veces como el sol que guía a las plantas con su dulce caricia; a veces como una roca que obliga a las raíces a fortalecerse.

Gracias a mi familia *non petita pero manifesta*. Para crecer es necesario ver como el amor funciona. Y por ello, gracias por permitirme ver una muestra a Teo, Jose, Esmeralda, Pau y Maya. Y también, por más de lo mismo, y no digo mejor sino

diferente, y no digo diferente sino raro, a Sandra, Cristóbal, Cristian y Tere.

Gracias a vosotros, Gabi y Dominik. Habéis estado desde el principio, compartiendo vuestras vidas conmigo y permitiendo que comparta la mía con vosotros. Humildemente, gracias. Nadie se merece tan buen regalo.

Gracie mille a la bella gente dil NICO, en especial a Silvia, Isabella y Sara. Ojalá, Dios mediante, que la luz de vuestros microscopios nunca se ensombrezca.

Finalmente, a María Belén Corral Alcalde, la de la risa indómita que ni un torrente de lágrimas puede parar. Gracias por ser, sin duda, lo más bonito de aquella hermosa Italia en la que todo parecía florecer. Manchados quedan de ti mi Piemonte, mi Toscana, este trabajo y mi vida. Haces que mirar al futuro merezca la pena. Haces del dolor la mejor inversión de la vida, y de la alegría la mejor recompensa que se puede tener. Nada de lo que haga será en balde, y construir contigo es caminar hacia algo más grande que mí mismo.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURASxvi

LISTA DE TABLAS.....xix

ABREVIATURAS.....xx

PARTE I: Introducción General 1

Introducción:3

Sistemas Olfativos en Roedores: detección de señales 8

Feromonas en *Mus musculus*21

Neuroanatomía del Comportamiento Social28

Objetivos39

PARTE II: Estudios con el Modelo de LPS41

Introducción:44

Sistema Olfativo y Señales de Enfermedad.....52

Circuitos Neuronales y Conducta de Evitación de
Patógenos.....58

Hipótesis Experimentales.....63

Metodología:74

Metodología Estudios con Orina:	74
Experimento de Activación Neuronal	88
Metodología de los Estudios con Viruta	102
Metodología del Experimento con Animal <i>in vivo</i>	124
Procesamiento de Datos.....	128
Resultados:	135
Resultados Estudios con Orina.....	135
Experimento de Activación Neuronal	152
Resultados de los Estudios con Viruta.....	157
Resultados del Experimento con Animal anestesiado....	165
Discusión:	167
Experimentos con Orina	168
Experimentos con Viruta.....	187
Experimento con Animal Anestesiado.....	201
Experimento con D y con PF	206
Conclusiones:	210
PARTE III: Estudios con Kairomonas	213
Introducción:	215
Kairomonas	218
Circuito de Supervivencia Defensiva.....	222
Hipótesis Experimentales.....	227

Metodología:	230
Estímulos de <i>Felis catus</i> :	230
Estímulo de <i>Rattus norvegicus</i> :	240
Estímulo de <i>Canis lupus</i> : Trimetilpirazina:	243
Procesamiento de Datos:.....	246
Resultados:	249
Resultados Estímulos de <i>Felis catus</i> :	249
Resultados con Lecho de Rata:	254
Resultados con Trimetilpirazina:	255
Discusión:	257
Experimentos con Estímulo de Gato.....	258
Experimento con Estímulo de Rata y Conejo.....	267
Experimento con Estímulo de Lobo	274
Conclusiones	277
PARTE IV: Discusión General.....	279
Discusión Metodológica	282
Discusión Filosófica: Hiperrealidad de la Darcina	289
Múltiples determinantes de la Conducta Sociosex.....	304
Conclusiones Generales.....	317
Referencias	320

LISTA DE FIGURAS

Parte I: Introducción General

Figura 1	pag. 6
Figura 2	pag. 13
Figura 3	pag. 15
Figura 4	pag. 31
Figura 5	pag. 33
Figura 6	pag. 38

Parte II: Estudios de Señales de Enfermedad

Figura 7	pag. 48
Figura 8	pag. 51
Figura 9	pag. 55
Figura 10	pag. 57
Figura 11	pag. 61
Figura 12	pag. 79
Figura 13	pag. 82
Figura 14	pag. 84
Figura 15	pag. 90
Figura 16	pag. 92
Figura 17	pag. 100
Figura 18	pag. 101
Figura 19	pag. 106
Figura 20	pag. 112

Figura 21	pag. 113
Figura 22	pag. 117
Figura 23	pag. 118
Figura 24	pag. 122
Figura 25	pag. 125
Figura 26	pag. 127
Figura 27	pag. 136
Figura 28	pag. 138
Figura 29	pag. 139
Figura 30	pag. 141
Figura 31	pag. 143
Figura 32	pag. 144
Figura 33	pag. 147
Figura 34	pag. 149
Figura 35	pag. 151
Figura 36	pag. 153
Figura 37	pag. 155
Figura 38	pag. 157
Figura 39	pag. 159
Figura 40	pag. 161
Figura 41	pag. 163
Figura 42	pag. 165

Parte III: Estudios de Señales de Depredadores

Figura 43	pag. 223
Figura 44	pag. 235
Figura 45	pag. 236
Figura 46	pag. 237
Figura 47	pag. 238
Figura 48	pag. 248
Figura 49	pag. 245
Figura 50	pag. 249
Figura 51	pag. 251
Figura 52	pag. 253
Figura 53	pag. 254
Figura 54	pag. 256

Parte IV: Discusión General

Figura 55	pag. 295
------------------	----------

LISTA DE TABLAS

Parte II: Estudios de Señales de Enfermedad

Tabla 1	pag. 64
Tabla 2	pag. 66
Tabla 3	pag. 68
Tabla 4	pag. 69
Tabla 5	pag. 66
Tabla 6	pag. 72
Tabla 7	pag. 73
Tabla 8	pag. 75
Tabla 9	pag. 78
Tabla 10	pag. 98
Tabla 11	pag. 100
Tabla 12	pag. 188
Tabla 13	pag. 195
Tabla 14	pag. 197

Parte III: Estudios de Señales de Depredadores

Tabla 15	pag. 218
Tabla 16	pag. 228
Tabla 17	pag. 229
Tabla 18	pag. 229
Tabla 19	pag. 231

ABREVIATURAS

AL	Amígdala Lateral
BO	Bulbo Olfativo
BOA	Bulbo Olfativo Accesorio
C57	C57BL/6J
CI	Corteza Insular
CPH	Complejo Principal de Histocompatibilidad
D	Darcina
DAB	Diaminobencidina
EOP	Epitelio Olfativo Principal
ESP	Péptidos Exocrinos de Glándulas Secretoras
Lhx	Familia de genes LIM- Homebox
LPS	Lipopolisacárido
LTO	Lecho de Tracto Olfativo
Me	Amígdala Medial
MeA	Amígdala Medial Anterior

MePD	Amígdala Posterodorsal	Medial
MePV	Amígdala Posteroventral	Medial
NGS	Normal Goat Serum	
NLET	Núcleo del Lecho de la Estría Terminal	
OVN	Órgano Vomeronasal	
PF	Péptidos Formilados	
PFA	Paraformaldehído	
PMCo	Núcleo Cortical de la amígdala	Posteromedial
PUP	Proteína Urinaria Principal	
RATA	Receptores Asociados a Trazas de Aminas	
RO	Receptores Olfativos	
RCS	Red Cerebral Sociosexual	
RPF	Receptores de Péptidos Formilados	
rV	Receptores Vomeronasales	

SGP	Sustancia Periacueductal	Gris
SIC	Sistema Comportamental	Inmune
SOV	Sistema Vomeronasal	Olfativo
SSD	Sistema de Supervivencia Defensiva	
T	Testosterona	
TB	Tampón Tris	
TBS	Tampón Tris Salino	
TMT	2,5-Dihydro-2,4,5- Trimethylthiazoline	
VD	Variable Dependiente	
VI	Variable Independiente	
VMH	Hipotálamo Ventromedial	
VMH-DM	Hipotálamo Dorsomedial	Ventromedial
VMH-VL	Hipotálamo Ventrolateral	Ventromedial

RESUMEN

Los animales que, evolutivamente, han generado estructuras sociales que les permiten generar estrategias grupales de supervivencia y reproducción, así como mecanismos para obtener información de los individuos de la misma especie. En la mayoría de especies del orden de los mamíferos, un importante sistema de detección de señales del medio es el olfato. Se tratan, por lo tanto, de especies macrosmáticas que aprovechan las quimioseñales de su entorno para adaptarse al medio o relacionarse con el resto de individuos con los que comparte nicho ecológico. Desde un punto de vista funcionalista, las quimioseñales que utilizan los individuos de diferentes especies en su comunicación se clasifican según sean intraespecie o entrespecie y, en esta relación, en función de quién obtiene una ventaja evolutiva.

En esta tesis doctoral estudiaremos, utilizando especímenes de la especie de roedores *Mus musculus*, la conducta de éstos ante estímulos intra-especie (*id est*, feromonas) y estímulos entre-especies cuya recepción beneficia al receptor (*i.d.* las llamadas kairomonas, procedentes de un

depredador y detectados por su presa, beneficiando a la supervivencia de ésta última). Así pues, la tesis se divide en cuatro partes: en la primera se introducirá el estado de la cuestión respecto a la conducta social en mamíferos, centrándonos en describir las vías de procesamiento neuronal desde los sistemas olfativos del ratón hasta los centros de ejecución motora y describiendo la literatura actual sobre las moléculas y los receptores que éstas activan, y como la acción de estos receptores modula la actividad de las vías neuronales descritas.

En la Parte II de la tesis presentaremos nuestros experimentos sobre estímulos de comunicación intraespecie. En concreto, los experimentos de este apartado tienen como objetivo el estudio de la conducta de ratones ante señales de atracción sexual (*exempli gratia*, orina de ratón macho, Darcina) y de la misma ante señales de congéneres con un modelo de simulación de enfermedad (e.g. orina de ratón macho tratado con Lipopolisacarido de origen bacteriano). Los resultados de los experimentos no permiten rechazar las hipótesis nulas principales, no encontrando atracción ante las quimioseñales volátiles o no volátiles de los estímulos presentados ni un

comportamiento evitativo ante las quimioseñales del modelo de enfermedad con LPS.

Por otro lado, en la Parte III de la tesis, comentamos los resultados de los experimentos en los que utilizamos, como estímulo aversivo, señales de depredador. En concreto, utilizamos materiales procedentes de gatos: secreciones de la glándula perianal, saliva y un tejido donde había dormido un espécimen durante una semana; viruta de rata; y, finalmente, una molécula aislada presente en la orina de lobo, la Trimetilpirazina. Los resultados de nuestros experimentos, usando como variable dependiente la cantidad de tiempo que los animales pasan cerca del estímulo, no revelan un efecto significativo de los estímulos utilizados en los ratones de nuestra muestra.

En conclusión, terminamos en la Parte IV de esta tesis realizando una revisión metodológica de la misma, cuestionando el estatus gnoseológico de la Darcina (supuesta feromona presente en la orina de macho que motiva atracción sexual en ratones hembra) y realizando una reflexión sobre la investigación actual en neurociencia sobre la conducta social en roedores y su complejidad.

Parte I: Introducción General

Introducción:

La conducta social hace referencia a los comportamientos que se dan entre un individuo y los especímenes de su misma especie, para algunos autores pudiendo ser también incluida hacia miembros de otras especies con la que comparte ambiente (entre-especies) (Alcock, 2009). Estas interacciones entre individuos están enfocadas a la supervivencia y a la reproducción dentro de un hábitat en concreto, y dependiendo de la especie puede tomar unas características u otras y dar lugar a una serie de conductas que van desde la agresión maternal o la agresión entre machos a conductas copulatorias o de cuidado parental (Taborsky, Cant y Komdeur, 2021). Así, evolutivamente hablando, la conducta social se encuentra en una amplia variedad de especies y presenta una dinámica evolutiva compleja (Moore, Brodie y Wolf, 1997), presentando una alta plasticidad tanto a lo largo del tiempo del ciclo vital del individuo como de la línea evolutiva de la especie (Blomberg, Garland y Ives, 2003). Como parte de esta complejidad sociales también hay que tener en cuenta al estudiar las conductas sociales los microorganismos patógenos a los que las especies

están expuestos (Kavaliers et al., 2018), siendo este factor más importante en especies con elevado nivel de gregarismo, puesto que una alta sociabilidad la aumenta la probabilidad del contagio de las infecciones (Alexander, 1994).

La conducta social presenta, por tanto, una enorme complejidad como campo de estudio. Así, la organización social hace referencia para la ecología al número de individuos dentro de un grupo, su comportamiento y sus relaciones de parentesco genético (Ross y Keller, 1995). Las formas en que las especies se organizan varían enormemente entre ellas e incluso dentro de ellas mismas. Por ejemplo, podemos encontrar en la hormiga roja de fuego (*Solenopsis invicta*), una especie altamente eusocial, colonias donde solo se encuentra una reina reproductora (monoginia) u otras donde podemos encontrar varias reinas dentro de una de estas (poliginia) (Ross y Keller, 1995; Keller, 1993). Esta tendencia en la hormiga roja se ha visto que depende de la variación polimórfica en un super gen (Krieger y Ross, 2002), y se han encontrado relaciones parecidas con características sociales y supergenes en otras especies como plantas, pájaros o peces (para una revisión más profunda ver Weitekamp, Libbrecht y Keller, 2017).

Parte I: Introducción General

En el caso de los mamíferos, por otro lado, parece que los determinantes evolutivos, ecológicos y ambientales de la conducta social son más complejos (Clutton-Brock, 2021). Factores como la distribución de recursos, la estructura del hábitat, la presencia de depredadores, o características individuales como el rango en la jerarquía social y la edad influyen entre otras en el desarrollo de la conducta (Oldfield et al., 2013; Clutton-Brock, 2002). En ratas (*Rattus norvegicus*), por ejemplo, en experimentos en entornos seminaturales se ha encontrado que el estado emocional que provoca la presencia de ciertos estímulos ambientales (como el olor a lavanda, el ruido ambiente o la disponibilidad de chocolate) influye en el desarrollo del repertorio conductual reproductivo de machos y de hembras (Le Moëne y Ågmo, 2018).

Esta complejidad en los comportamientos sociales de los animales ha sido observada desde antiguo, dejando ya constancia de ello, para el caso de la zona de influencia actualmente llamada “occidente”, pensadores como Aristóteles y su teoría del hielomorfismo de la materia (Feser, 2019), teoría que superaba la teoría del alma pitagórica compartida también por Platón en su dialogo Fedón (1983) y que influiría a todo el

pensamiento escolástico en los siglos posteriores. Así, antes del surgimiento de la etología moderna con los trabajos de los ganadores del premio Nobel de 1973 en fisiología y medicina Karl von Frisch, Konrad Lorenz y Nikolaas Tinbergen, el naturalista inglés Carlos Darwin puso el ojo en la conducta reproductiva con su teoría de la evolución mediante selección sexual. En sus observaciones realizadas durante su viaje en el buque de la Marina Real Beagle se dio cuenta de cómo la presencia de conductas y caracteres externos promueven la selección de estos especímenes que los poseen por congéneres del sexo contrario para realizar la cópula (Darwin, 2020).

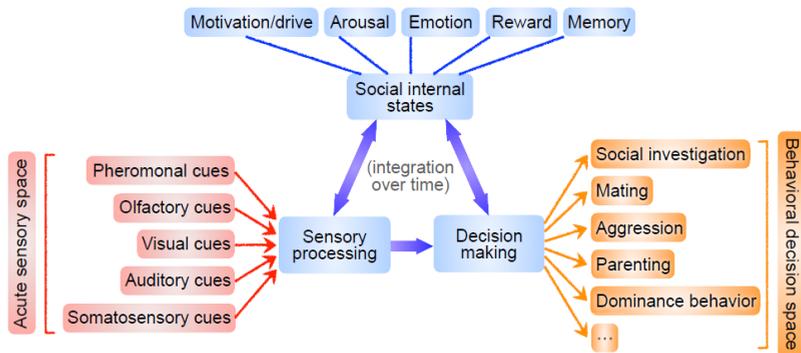


Figura 1: Esquema sobre la complejidad de la conducta social donde se muestra múltiples variables que influyen en la toma de decisiones sobre conductas sociales. Extraído de Chen y Hong, 2018.

Parte I: Introducción General

Podemos afirmar, por lo tanto, que una de las conductas sociales más importantes es la que tiene que ver con las conductas copulatorias y paracopulatorias. Este proceso, que culmina con la inseminación de la hembra por parte del macho en el acto de la cópula, se ha dividido en dos fases (Master, Johnson y Kolodny, 1995; Hull et al., 2002; Blaustein y Erskine, 2002): la llamada fase consumatoria (donde se realiza la cópula) y la fase de apetencia (donde se encontrarían conductas paracopulatorias como la detección del individuo de sexo opuesto, su búsqueda y el cortejo). Así, Darwin ya observó el uso de colores en el plumaje de algunas aves (*e.g.* pavos reales y aves del paraíso) para atraer en esta fase apetitiva el interés sexual en algunas aves que observó en su conocido viaje, señalando la importancia de las características sexuales secundarias desarrolladas después de la pubertad como estímulos visuales incitadores de la cópula (Darwin, 1859).

Cada especie, sin embargo, requiere de determinados de estímulos para iniciar conductas sociales, desde las conductas intra-especie (*e.g.* agresión entre machos, agresión materna, conductas copulatorias) a las inter-especie (*e.g.* conductas de depredación, evitación de depredadores, etc.). Así, mientras

tanto humanos como otros primates y muchas aves utilizan mayoritariamente el sentido de la vista para detectar señales que activan sistemas neuronales motivacionales que llevan a realizar estas conductas, otras especies, como la mayoría de los mamíferos (e.g. roedores, canes, lagomorfos, etc.) usan el olfato con esta misma finalidad.

Sistemas Olfativos en Roedores: detección de señales

Para el desarrollo de cualquier conducta es necesario la detección de señales que generen un estado interno que lleve al individuo a realizarla. En mamíferos, como comentábamos anteriormente, esta información se recibe principalmente mediante la detección de las señales que motivan comportamientos sociales (intra o entre-especie) por los sistemas olfativos, siendo esto principalmente cierto en la especie *Mus musculus* que nos ocupa en esta tesis (Wyatt, 2003, 2010; Brennan y Keverne, 2004). Los ratones son una especie nocturna que mantiene su olfato cerca del suelo, por lo que su forma de obtención de información del medio ha evolucionado de tal manera que no dependa de la presencia de

luz en el ambiente, mediante el aprovechamiento de las señales químicas presentes en éste. Su respiración constante, con un rango de inspiraciones de 106 a 230 por minuto, un volumen de aire de 0,15 a 0,29 ml y una ventilación entre 23 a 47,5 ml/min (Hoyt et al., 2007), convierte a su olfato en una magnífica manera de obtener quimio-señales del ambiente. Además, se ha encontrado que la regulación de los ritmos que toma la respiración está relacionada con la actividad de los sistemas olfativos (Mori, Manabe y Narikiyo, 2014).

Las señales olfativas que los ratones perciben mediante la respiración pueden indicar características del emisor como el sexo del individuo que ha generado la señal, la fase reproductiva en la que se encuentra, su estado de salud, otras características que permitan identificarle individualmente, etc. (Brennan y Kendrick, 2006; Logan et al., 2012). Estas señales se pueden clasificar según la naturaleza química de las mismas o según su funcionalidad en la comunicación entre individuos. Respecto a la clasificación de su naturaleza química se pueden dividir en señales de carácter proteico (proteínas o péptidos) y de otra naturaleza química.

Las moléculas con uniones peptídicas son usadas por la mayoría de vertebrados e invertebrados como feromonas y como señales de comunicación celular en todo el organismo (Wyatt, 2014b; Nicolau, 2012). Esta familia a su vez se puede clasificar según la cantidad de aminoácidos que las componen en péptidos pequeños, péptidos con estructura secundaria de 15 a 50 aminoácidos (e.g. Péptidos Exocrinos de Glándulas Secretoras; ESPs, del inglés *Exocrine Gland-secreting Peptides*) y polipéptidos (e.g las Proteínas Urinarias Principales, PUPs). Más adelante retomaremos algunas de estas moléculas.

Por otro lado, la clasificación según su funcionalidad utiliza un enfoque más etológico en el que se busca comprender los efectos de adaptación al ambiente en términos de beneficios/riesgos que estas moléculas poseen. Así, el primer término en ser introducido fue el de feromona (del griego *pherein* (transferir) y *hormon* (excitar)) por Karlson y Luscher (1959) mientras trabajaban en el instituto Max Planck en Alemania y, según estos, una feromona es:

"[...] substances secreted to the outside of an individual and received by a second individual of the same species, in which they release a specific reaction, for example, a

Parte I: Introducción General

*definite behaviour or developmental process*¹ (Karlson y Luscher, 1959)

Esta definición ha sido, no obstante, objeto de modificaciones para adaptarse a los hallazgos obtenidos posteriormente. Wyatt (2014a; 2010) matiza la definición de feromona para definirlas como moléculas que han evolucionado con la especie que son emitidas por un individuo y recibidas por un coespecífico y cuya respuesta de este último consiste en una reacción estereotipada o genéticamente definida. Wyatt (2010) señala que la respuesta estereotipada dependerá, entre otros, de factores contextuales, el estado interno del receptor (e.g. la madurez sexual influirá las conductas desarrolladas ante feromonas sexuales y el estado endocrino) y la experiencia anterior y el aprendizaje (Griffiths y Brennan, 2015; Beny y Kimchi, 2014; Stowers y Liberles, 2016).

Continuando con la clasificación de las feromonas en base a su función en la conducta social, desde el desarrollo de la definición de feromona se han introducido otros términos para

¹ Trad. del autor: [las feromonas] son sustancias secretadas hacia el exterior de un individuo y recibidas por un segundo individuo de la misma especie, en la que desencadenan reacciones específicas, como un comportamiento determinado o un proceso del desarrollo

referirse a la comunicación inter-especie. El concepto más general en este tipo de comunicación fue el de aleloquímico y hace referencia a los compuestos químicos que median interacciones entre dos individuos que pertenecen a especies distintas (Dicke y Sabelis, 1988; Sbarbati y Osculati, 2006). Dentro de los aleloquímicos encontramos las necromonas, las kairomonas y las synomonas, que difieren entre sí en receptor del beneficio adaptativo.

En el caso de las alomonas, la señal emitida genera una conducta favorable para el emisor en el receptor de la misma (Sbarbati y Osculati, 2006). Sería el caso de señales de un depredador que emite sustancias que atraen a la presa (Blum, 1996) y viceversa (Apfelbach et al., 2005). Las kairomonas, al contrario, se tratan de señales aleloquímicas secretadas por un individuo que generan una respuesta beneficiosa fisiológica o comportamental en el receptor de otra especie, pero desfavorable para el emisor (Dicke y Sabelis, 1988). Por último, nos encontramos, dentro de este grupo, con las sinomonas. Estas sustancias suponen un beneficio mutuo tanto para el emisor como para el receptor (Dicke y Sabelis, 1988).

Finalmente, dentro de esta clasificación que ilustramos en la **Figura 2**, se ha descrito el concepto de apneumona para referirse a las sustancias emitidas por materia no viva que provoca una respuesta adaptativamente beneficiosa para un individuo de una especie, pero puede ser desfavorable para un individuo de otra (Nordlund y Lewis, 1976). Las necromonas pueden ser tomadas como ejemplo de apneumona al consistir en una señal que emite un cadáver (materia no viva) y que favorece a organismos de la misma especie o de otra diferente al indicar la presencia de putrefacción (Rollo, Czuzewska y Borden, 1994; Sun y Zhou, 2013).

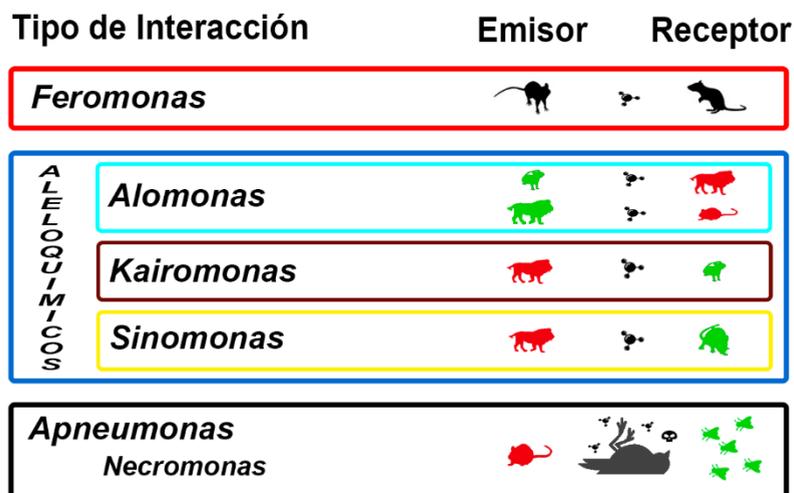


Figura 2: Representación gráfica de la clasificación de las quimioseñales en base a su funcionalidad y a su valor adaptativo para las especies. Las figuras con forma de leones indicarían especies depredadoras y las figuras con forma de ratón a sus presas. El

color rojo señala un beneficio adaptativo de la interacción que provoca la señal emitida; el color verde un beneficio adaptativo.

En la mayoría de tetrápodos existen principalmente dos sistemas olfativos de detección de quimioseñales olfativas (Eisthen 1997; Scalia y Winans, 1975): el Órgano Vomeronasal (OVN) o de Jacobson, por su descubridor el anatomista danés Ludvig Jacobson en 1813 (Jacobson, Trotier y Døving, 1998; Døving y Trotier, 1998; Halpern y Martínez-Marcos, 2003), y el Epitelio Olfativo Principal (EOP). Por otro lado, en ratones se conoce la existencia de otros dos pequeños sistemas de detección actualmente menos estudiados: el Órgano Septal de Maser y el Ganglio de Grüneberg. En la **Figura 3** se ilustra la posición espacial de estas cuatro estructuras en la cavidad buco-nasal.

En ratones, el OVN es una estructura tubular sin salida localizada en la base de la cavidad nasal. El conducto vomeronasal es una pequeña apertura de cuatro milímetros de largo que conecta con la cavidad nasal principal y donde se encuentra el epitelio del OVN (Døving y Trotier, 1998; Ogura et al., 2010). Por otro lado, el EOP es el que posee la mayor área dentro de la cavidad nasal del ratón y se considera que este

encargado de la detección de olores volátiles presentes en el ambiente.

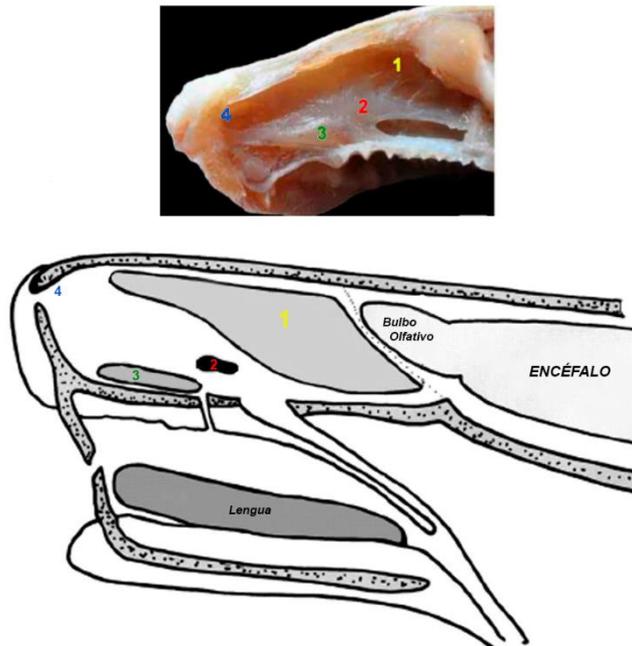


Figura 3: Arriba: Corte sagital de la cavidad nasal de un espécimen de la especie *Mus musculus* en el que se señalan los cuatro sistemas olfativos (Modificado de Barrios, Núñez, Sánchez-Quinteiro y Salazar, 2014). Abajo: Ilustración complementando la imagen anterior donde además se representan otras estructuras cercanas (modificado de Weiler y Farbman, 2003). 1. Epitelio Olfativo Principal; 2. Órgano Septal de Masera; 3. OVN; 4. Ganglio de Grüneberg.

Desde un punto de vista funcional se ha planteado que el OVN se encarga de la detección de señales feromonales de importancia adaptativa, aunque estudios actuales muestran un

papel complementario del EOP en la detección de éstas (Brenan y Zufall, 2006; Kelliher et al., 2006; Kelliher, 2007; Restrepo, et al., 2004; Zufall y Leinders-Zufall, 2007). Una prueba de la importancia del OVN es el alto peso molecular de algunas señales propuestas como feromonas en *Mus musculus* (e.g. PUPs) requiriendo así la intervención del bombeo del OVN, que mediante la dilatación y constricción de sus vasos sanguíneos absorbería estas moléculas hacia su interior (Wysocki, Wellington y Beauchamp, 1980; Meredith, Marques y Stern, 1980). Además, sabemos que estímulos procedentes de ratón macho estimulan la activación del OVN. Nuestro equipo (junto con otros) ha encontrado que el contacto de ratones hembra con viruta sucia procedente de cajas donde se había estabulado a ratones machos provoca la activación del sistema vomeronasal (Monchoi-Bogani et al., 2005; Martínez-Ricos et al., 2007). Además, lesiones en el Bulbo Olfativo Accesorio (BOA) en ratones hembra eliminan la preferencia de éstas por las feromonas atractivas presentes en la viruta sucia de ratones macho (Martínez-Ricos et al., 2008).

El Órgano Septal de Masera, el tercero en extensión de los cuatro sistemas olfativos, se encuentra en la parte basal del

septum (**Figura 2**; Weiler y Farbman, 2003) y aunque fue primeramente descrito en alemán por Ivar Broman en ratones recién nacidos (1921) fue el anatomista italiano Rodolfo-Masera el que lo localizó en diferentes especies. Respecto a su función, se ha encontrado que las neuronas que integran el órgano tienen un doble papel en quimiosensación y en mecanorrecepción, sincronizando la actividad del sistema bulbo olfativo (BO) con la respiración (Grosmaître et al., 2007).

Finalmente, el **Ganglio de Grüneberg**, el más pequeño de los sistemas olfativos, fue descubierto accidentalmente por Hans Grüneberg en 1971 (Grüneberg, 1971). Se ha especulado con un rol de este sistema en la termopercepción de neonatos (Mamasuew, Breer y Fleischer, 2008; Schmid et al., 2011) y, en los últimos años, se han publicado resultados que sugieren un papel en la detección de señales de alarma, de depredadores y otros (Brechtbühl, Klaey y Broillet, 2008; Brechtbühl et al., 2015; Mamasuew, Hofmann, Breer y Fleischer, 2011; Fleischer, 2021).

Parte importante del estudio de la percepción de las señales olfativas en ratones mediante estos cuatro sistemas, de los cuales, como comentábamos anteriormente, el OVN y el EOP desempeñan un papel protagonista, es la comprensión

sobre los receptores neuronales que median la transducción de la quimio-señal en un potencial de acción. Los receptores utilizados por los sistemas olfativos pueden ser considerados como receptores químicos del sistema neuronal especializados en la detección de señales procedentes del exterior del organismo. Se han descrito, pues, cuatro tipos de receptores olfativos: los Receptores Olfativos (RO), los Receptores Vomeronasales (rV), Receptores de Péptidos Formilados (RPF) y Receptores Asociados a Trazas de Aminas (RATA). Estos tipos de receptores forman parte de una gran superfamilia de receptores que están acoplados a una proteína G dividida en tres subunidades y que interactuará con un efector que puede ser una enzima o un canal iónico (Rosenbaum, Rasmussen y Kobilka, 2009; Brennan, 2018). Este efector será el encargado de iniciar la señal eléctrica.

Los primeros receptores en ser identificados fueron los RO por Richard Axel y Linda B. Buck, descubrimiento que los llevó a ganar el Premio Nobel en Medicina y Fisiología en 2004 (Buck y Axel, 1991; Buck, 2005; Axel, 2005). La familia de genes que codifican a los RO es la más grande dentro de los genomas de los vertebrados (Fleischer et al., 2009), estando en ratones

formada por más de 1000 genes (Godfrey, Malnic y Buck, 2004). La expresión de los genes de estos receptores se caracteriza por permitir la creación un código combinado de activación neuronal único para cada olor, al expresarse en cada neurona sensorial un solo tipo de receptor que es capaz de activarse ante varios olores (Malnic et al, 1999; Tirindelli et al., 2009).

Por otro lado, los rV son receptores que se encuentran en el epitelio del OV y se han clasificado en dos tipos. Primero, los rV tipo 1, descritos por el anteriormente mencionado Richard Axel (Dulac y Axel, 1995) y presentes en la capa apical del OV. Estos receptores detectan, entre otras señales, diferentes tipos de esteroides y podrían a su vez servir para la detección del estado fisiológico de un animal (Yoh et al, 2012). Segundo, los rV tipo 2 fueron descritos por tres equipos diferentes de manera simultánea (Herrada y Dulac, 1997; Matsunami y Buck, 1997; Ryba y Tirindelli, 1997) y están presentes en la capa basal del VO. En cuanto a las funciones de estos receptores, parecen relacionados con la identificación de congéneres (Yoh et al, 2012) al detectar péptidos del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH), Proteínas Urinarias Principales (PUPs) y ESPs (Leinders-Zufall et al., 2004)

El tercer tipo de receptores olfativos son los FPrs. Estos receptores fueron descubiertos en 1990 (Boulay, 1990) como parte del sistema inmune y localizados en 2009 en el OVN (Riviere et al., 2009). Son expresados por aproximadamente un 1% de las neuronas de OVN (Fleischer, 2009) y parecen tener un papel en el desarrollo de la evitación de coespecíficos con enfermedad (Liberles et al., 2009). Finalmente, los RATA son receptores que se encuentran en el EOP (Liberles y Buck, 2006; Borowsky et al., 2001) y parecen detectar aminas volátiles relacionadas con señales sociales, así como a las diaminas cadaverina y putrescina en peces (Hussain et al., 2013; Li et al., 2015).

Feromonas en *Mus musculus*

Como hemos definido en el apartado anterior, las feromonas se definen como señales químicas que sirven para generar respuestas estereotipadas en un congénere (Karlson y Luscher, 1959; Wyatt, 2014a). En el caso de los ratones, hasta la fecha se han encontrado varios candidatos que se aproximan a la realización de un papel de comunicación inter-especie para conductas evolutivamente programadas, aunque con un cierto grado de plasticidad (Ihara, Yoshikawa y Touhara, 2013).

Las funciones de las feromonas son muy diversas y pueden influir en las conductas de los individuos y en todos los aspectos de su conducta natural. Por ejemplo, respecto a la selección de comida, se ha encontrado que las heces de ratones a los que se les ha alimentado con una comida específica aumentan el interés sobre ésta en otros ratones que nunca la han probado, pero que han sido previamente expuestos a las deposiciones de los primeros (Arakawa et al., 2013). El Uroguanylin, una hormona peptídica secretada por células enterocromafines en el intestino, puede ser una candidata para mediar esta preferencia adquirida (Forte, 2004).

Se ha estudiado en mamíferos la atracción de los neonatos por los pezones de sus madres, habiendo sido encontrado en la especie de conejo *Oryctolagus cuniculus* que las hembras secretan 2-methylbut-2-enal en su leche provocando este olor la atracción de las crías (Schaal et al., 2003; Coureaud et al., 2006). En ratones se ha encontrado un mecanismo más complejo para el inicio de la lactancia por parte de las crías, siendo necesario el aprendizaje del conjunto individual de olores de la madre más que una sola molécula (Logan et al., 2012). Al nacer, los ratones hembra acicalan a sus cachorros y se acicalan a sí mismas (incluyendo la zona abdominal donde están los pezones) justo después del parto, permitiendo a los cachorros aprender estos olores y usarlos para encontrar su fuente de nutrientes.

Respecto a las quimioseñales que influyen en la **conducta sexual**, podemos diferenciar entre aquellas químicamente volátiles y las químicamente no volátiles. Esta diferencia, como comentábamos anteriormente, va a determinar la necesidad del OVN y del bombeo vomeronasal al necesitar las moléculas más pesadas esta acción para llegar al epitelio (Meredith et al., 1980). Así, pertenecientes a la familia comentada anteriormente de

péptidos de estructura secundaria y de tamaño de 15 a 50 aminoácidos, los **ESPs** son feromonas en ratones que cuenta con una familia de 38 genes y son secretados por la glándula lacrimal extraorbital (Ishii et al., 2017; Woodson, Niemeyer y Bergan, 2017). Estos péptidos son detectados por el OVN (Abe y Touhara, 2014) y la investigación ha destacado el papel de la ESP1 y la ESP22 (Kimoto et al., 2005; 2007; Haga et al., 2010). Por un lado, ESP1 es expresada por las glándulas lacrimales extraorbitales y se segrega de forma dependiente de Testosterona (T), por lo que es una señal masculina. Se ha demostrado que la ESP1 aumenta la receptividad de las hembras a la copula al aumentar el número de veces que ejecutan la lordosis. Finalmente, se ha demostrado que para la detección de esta molécula requiere la activación de neuronas que expresan receptores rV2 (Haga et al., 2010). Por otro lado, la ESP22 es una feromona que inhibe en machos el comportamiento sexual y que es secretado por especímenes pre-púberes (Ferrero et al., 2013).

Por otro lado, los péptidos de la clase I de la familia de los **CPH**, cuyos ligandos peptídicos son secretados en la orina de los ratones, poseen un alto polimorfismo que los convierte en

señales de individualidad que facilitan el reconocimiento (Beauchamp y Yamazaki, 2003; Sturm et al., 2013). No obstante, aunque se sabe que influyen en la preferencia social y evitan la endogamia y la consanguinidad (Leinders-Zufall et al., 2004; Spehr et al., 2006), las PUPs parecen tener un papel más preponderante (Sherborne et al., 2007; Cheetham et al., 2007). Para la detección de los CPH son necesarias las neuronas del OVN que expresan rV2, en concreto las rV2-1b (Leinders-Zufall et al., 2004)

Las antes mencionadas **PUPs** han sido propuestas como conglomerados de identidad individual (del inglés *Signature Mixtures*), al igual que los péptidos de los CPH (Wyatt, 2010; Kaur et al., 2014). Las PUPs son sintetizadas en el hígado, filtradas en los riñones y algunas de ellas son dependientes de T (Finlayson et al., 1965; Skoza y Paigen, 1978). Forman parte en ratones de una familia de 21 genes en el cromosoma 4 con una alta tendencia al polimorfismo (Mudge et al., 2008; Logan, Marton y Stowers, 2008; Hurst y Beynon 2013) y se ha encontrado que sirven como señales olfativas de tipo feromonal en la agresión entre machos (Chamero et al., 2007) como en la atracción de machos a hembras (Roberts et al, 2010). Para su

detección se ha encontrado que las neuronas que expresan receptores rV tipo 2 en el OVN son necesarias (Chamero et al., 2007).

Especial mención para esta tesis merece la PUP20, denominada **Darcina** (D; del neologismo inglés *Darcin*) en referencia al protagonista de la novela romántica *Pride and Prejudice* de Jane Austen el terrateniente Mr. Darcy. La D, como el resto de PUPs, pertenece a la superfamilia de las lipocalinas y se puede unir, como estas, a pequeñas quimioseñales volátiles de la orina (Bacchini, Gaetani y Cavaggioni, 1992; Novotny et al., 1999). Pesa 18893Da (Roberts et al., 2010), su cantidad en la orina es heredable (Liu et al., 2017) y su producción, es T dependiente (Lanuza et al., 2014; Amstrong et al., 2005) y como la del resto de PUPs decrece según envejece el macho (Garratt et al., 2011). Se ha relacionado a la D con diversas conductas típicas de especie. Así, dependiendo del estado reproductivo de la hembra, puede generar agresión maternal (*id est*, la agresión de las hembras a un macho intruso para defender a sus crías) (Martín-Sánchez et al., 2015b; 2015b) o generar atracción (Roberts et al., 2010) y fomentar el aprendizaje espacial en

hembras de ratón, así como en machos competidores (Roberts et al., 2012).

Como comentábamos anteriormente, el otro tipo de señales que se han estudiado que influyen en la conducta sexual de los ratones son las **señales de tipo volátil**. Por un lado, se ha encontrado que 2-sec-butyl dihydrothiazole, el dehydro-exo-brevicomín y la alfa y beta farnesene, los dos primeros compuestos de la orina de ratón macho que se producen de manera dependiente de T y los dos últimos presentes en glándula exocrina del prepucio de machos *Mus musculus* (Novotny et al., 1984; Harvey et al., 1989; Jemiolo et al., 1991) tienen la capacidad de acelerar la aparición de la pubertad en hembras (Novotny et al., 1986; 1999). Por otro lado, se han descrito que el (methylthio) methanethiol (Lin et al., 2005) y la trimetilamina (Li et al., 2012), compuestos presentes en la orina de ratón macho, generan atracción en hembras de la misma especie.

Finalmente, en la especie *Mus musculus* se han descrito una serie de efectos fisiológicos referidos a la reproducción provocadas por feromonas de congéneres del mismo sexo o del sexo contrario. Por un lado, el Efecto Bruce se describe como la

interrupción del embarazo durante los primeros días del mismo al entrar en contacto la hembra con un macho diferente al que inseminador de la camada o la exposición de estas con su orina (Bruce, 1960; Parker y Bruce, 1962; Dominic, 1966). El Efecto Vandenberg consiste en la aceleración de la pubertad en hembras jóvenes por la presencia de un macho o su orina (Vandenberg, 1967). Este efecto ha sido observado teniendo en cuenta medidas como los cambios en la citología vaginal, la edad de la apertura vaginal, el primer estro y la primera monta (Vandenberg, 1967, 1976; Bingel, 1972) y, además, se puede observar un aumento en el tamaño del útero y los ovarios (Beaton et al., 2006; Khan et al., 2008).

Los últimos dos efectos se encuentran relacionados al tratarse del inicio y detención del ciclo estral en ratones estabulados juntos. El primero de estos en ser descrito fue el Efecto Lee-Boot en 1955 (van der Lee y Boot, 1955; 1956) y consiste en la detención del ciclo estral y la inducción de un pseudo-embarazado cuando un grupo de hembras es estabulado sin la presencia de un macho. Estos trabajos fueron complementados por el trabajo de Whitten (1956; 1958; 1959), que mostró como la introducción de un macho o una hembra

tratada con andrógenos (Bronson y Whitten, 1968) provoca aceleración y sincronización del ciclo estral.

Neuroanatomía del Comportamiento Social

Los comportamientos sociales, como decíamos en el primer apartado, son de los comportamientos más complejos por la cantidad de variables internas, contextuales y de señalización que conllevan para su realización (véase **Figura 1**). Por ejemplo, el estudio de la reproducción en ratones conlleva el entendimiento de variables como las quimioseñales que pueden provocar atracción entre sexos (e.g. D (Roberts et al., 2010); ESP1 (Haga et al., 2010)) y otros estímulos sensoriales como las vocalizaciones ultrasónicas (Portfors, 2007) así como su interacción. Además, esta conducta requerirá un proceso de toma de decisiones por parte de dos sujetos por lo que podríamos ver esta interacción como el resultado del procesamiento de dos “cerebros tomadores de decisiones” (Chen y Hong, 2018; O'Connell y Hofmann, 2012) donde el papel que juega la incertidumbre en la respuesta conductual de ambos tendrá un rol determinante (Dayan, 2012).

Parte I: Introducción General

En este apartado nos vamos a centrar en las rutas neuronales de procesamiento de quimioseñales que se han encontrado involucradas desde el procesamiento de estímulos sociales de tipo quimisensorial hasta su resolución en una conducta concreta (véase **Figura 4**). A lo largo de la introducción hemos hablado de los cuatro sistemas de detección de señales olfativas que posee la especie *Mus musculus* (*i.e.* EOP, OVN, Ganglio de Grüneberg y el Órgano Septal de Maserà) y de los receptores de sus epitelios. Así, en el **EOP**, las células receptoras del epitelio que expresan el mismo tipo de RO envían aferencias a los mismos glomérulos del bulbo olfativo principal (Mombaerts et al., 1996) formando un mapa olfativo (Mori et al., 1999; Mori y Sakano, 2011). Este mapa formado por glomérulos específicos según las aferencias axonales de los OR enviará los inputs olfativos a la corteza olfativa a través de las proyecciones de las neuronas del BO (Buck, 2005; Gosh et al., 2011; Sosulski et al., 2011; Igarashi et al., 2012; Hirata et al., 2019). Así, la información olfativa llega a la Corteza Lateral Entorrinal, la Corteza Piriforme Anterior y Posterior, el Núcleo del Tracto Olfativo Lateral (LTO), el Núcleo Olfativo Anterior, el Tubérculo Olfativo y los núcleos de la amígdala Medial (Me) y los núcleos

corticales amigdalinos anterior y posterolateral (Spehr et al., 2006; Imamura et al., 2020).

En el caso del **OVN**, los axones de las neuronas sensoriales conectan mediante el nervio vomeronasal con las células mitrales del BOA (Buck, 2000). Estas células poseen múltiples dendritas apicales que conectan con cada una con diferentes glomérulos (Cajal, 1911). Desde aquí, estas neuronas conectan con el Núcleo del Lecho de la Estría Terminal (NLET) y con el Núcleo del Lecho de Tracto Olfativo Accesorio, además de con la Amígdala en sus núcleos Me y Posteromedial Cortical (PMCo). Desde estos núcleos, las proyecciones axonales llegarán a diferentes núcleos del hipotálamo (Zufall, Leinders-Zufall y Puche, 2008; Li, Kaba y Saito, 1990). Así, en el caso del núcleo de la Me Posterodorsal (MePD) se ha encontrado que proyecta preferentemente al sub-núcleo ventrolateral del hipotálamo ventromedial (VMH-VL); por otro lado, el núcleo Posteroventral de la Me proyecta eferencias a la parte dorsomedial del VMH (VMH-DM) (Canteras, Simerly y Swanson, 1995; Choi et al., 2005).

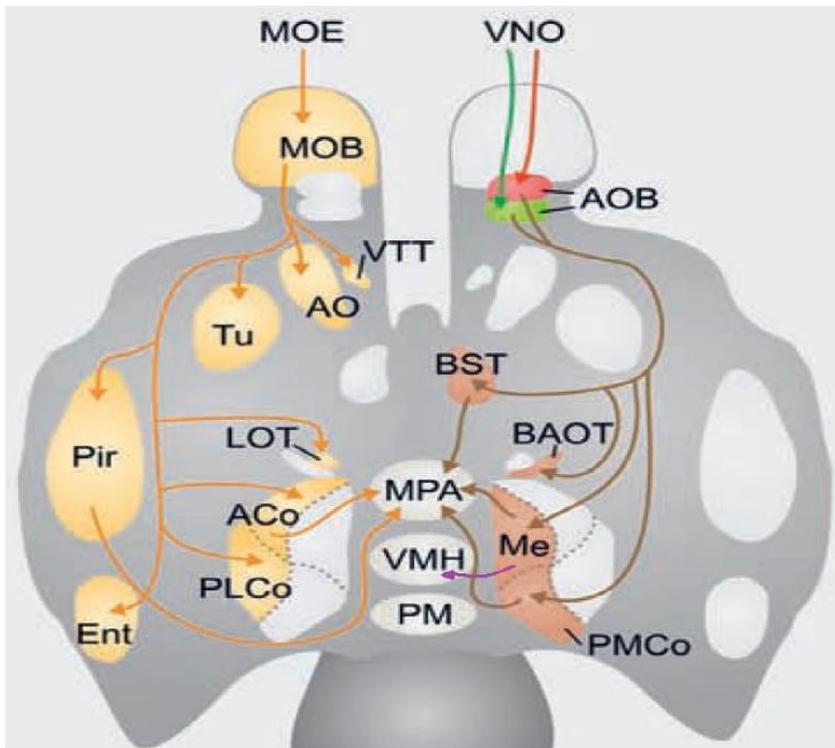


Figura 4: Conexiones entre el epitelio olfativo principal (MOE) y el órgano vomeronasal (VNO) con las áreas objetivo. En este trabajo es relevante la representación de las proyecciones del bulbo olfativo accesorio (AOB) con la amígdala medial (Me) y de esta con el hipotálamo ventromedial (VMH). Imagen adaptada de Spehr et al., 2006.

Conceptualmente, estas conexiones neuroanatómicas se han clasificado en base a sus proyecciones y su funcionalidad (*id est.*, el tipo de conducta que su activación sincrónica produce). En 1999 Newman desarrolló el concepto de Red

Cerebral Sociosexual (RCS; del inglés *Sociosexual Brain Network*). Los núcleos neuronales y sus conexiones están altamente conservados a lo largo de la filogenia y cumplen las siguientes características:

1. Están implicados en varios tipos de comportamiento social.
2. Están estrechamente interconectados.
3. Sus células expresan abundantemente receptores de hormonas esteroideas gonadales (e.g. andrógenos y estrógenos), permitiendo así un dimorfismo sexual en su estructura y funcionamiento.

En la **Figura 5** representamos el esquema inicial de los núcleos del RCS. Estos núcleos estarían detrás de comportamientos sociales como la agresión, la conducta materna o la reproducción. Un nodo importante entre ellos es la Amígdala Medial Extendida, que como veíamos antes recibe eferencias de los dos principales sistemas olfativos, el EOP y el OVN (Insel y Numan, 2003; Gutierrez-Castellanos et al., 2010; Cadíz-Moretti et al., 2013; Newman, 1999; Goodson, 2005). Véase **Figura 4** y **Figura 6**. Esta estructura forma parte de subsistema medial/cortical del complejo amigdalino que posee la

función de coordinar las respuestas típicas de especie ante estímulos químicos (Martínez-García y Lanuza, 2018; Gutiérrez-Castellanos et al., 2010). En roedores, además, se ha constatado que es un nodo clave para el desarrollo de las conductas relacionadas con la RCS (Newman, 1999; Swann et al., 2009; Bergan et al., 2014) y se compone de tres partes: la porción anterior (MeA), la posterodorsal (MePD) y la posteroventral (MePV) (Gomez y Newman, 1992; Canteras et al. 1995).

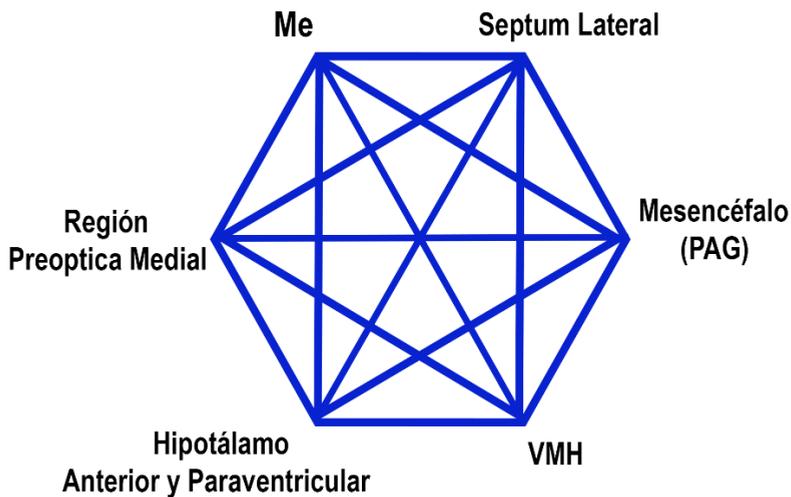


Figura 5: Representación gráfica de la propuesta de Newman (1999) sobre la interconexión de los diferentes núcleos neuronales que procesan la información sociosexual y desarrollan conductas en base a esta. Modificado de Newman, 1999 y Goodson, 2005.

Las neuronas de estas subregiones tienen origen heterogéneo a nivel del desarrollo del encéfalo, expresando cada núcleo un gen distinto de la familia de genes LIM-Homeobox (*Lhx*): las neuronas del MeA expresan *Lhx5*, las del MePD expresan *Lhx6* y las de MePV *Lhx9* (Medina, Bupesh y Abellán, 2011; Pabba y Fukuda, 2013). Funcionalmente, el **MePD** se ha encontrado activado en ratas macho cuando estas se hayan en encuentros agresivos con otros machos, en concreto las neuronas GABAérgicas de éste (Hong et al., 2014; Unger et al., 2015). Así mismo, se ha encontrado a este núcleo relacionado en conductas reproductivas en ratones (Choi et al., 2005; Wu y Tollhuhn, 2017; Fujiwara, Nitta y Chiba, 2016; Hosokawa y Chiba, 2010) y que los receptores de andrógenos y de estrógenos están principalmente distribuidos en las neuronas de esta estructura (Choi et al., 2005). Esto sugiere que distintos grupos neuronales de este núcleo se encargan de conductas agresivas y apetitivas hacia congéneres del mismo sexo. De hecho, se ha encontrado que activar las neuronas positivas para el transportador vesicular de GABA del MePD o las neuronas ESR1 positivas del núcleo VMH-VL inicia conductas de monta o de agresión según su intensidad sugiriendo que los grupos que

controlan cada conducta pueden diferir en el umbral de activación o puede que cada conducta necesite un número determinado de neuronas reclutadas (Lee et al., 2014; Chen y Hong, 2018).

Por otro lado, el núcleo **MePV** reciben convergencia directa de inputs desde los bulbos olfativos principal y accesorio (Keshavarzi et al., 2015). Las neuronas del núcleo MePV se ven activadas ante estímulos que representan una amenaza, como ante quimiosignales de depredador (Choi et al., 2005). Además, se ha encontrado que MePV tiene un papel en la conducta reproductiva de ratones hembra. La inactivación de las células *Vglut2* positivas reduce la frecuencia de la lordosis, mientras que su activación la incrementa (Ishii et al., 2017).

La Me proyecta a los núcleos del hipotálamo VMH y al Núcleo Hipotalámico Anterior (Pardo-Bellver et al., 2012; Canteras et al., 1995; Benn et al., 2019). El VMH recibe aferencias directas e indirectas de la Me y otras áreas relacionadas con conductas agresivas (Motta et al., 2013). En unos estudios clásicos se identificó esta área del hipotálamo y otras adyacentes como el Área de Ataque del Hipotálamo en gatos, ratas y otros animales (Hess y Brugger, 1943; Krurk,

2014) pues al estimularla con electrodos los animales iniciaban conductas de agresión. Como comentábamos anteriormente, las neuronas GABAérgicas del MePD poseen un papel clave en la agresión entre machos y su proyección a la parte posterior del NLET tiene un papel activador de estas conductas, como muestran estudios de activación de esta vía (Padilla et al., 2016). El hipotálamo **VMH-VL** recibe información de esta proyección y se ha visto activado durante la investigación y la confrontación entre machos (en concreto las neuronas Esr1/PR positivas) y su inhibición conduce a una reducción de este tipo de conducta (Lee et al., 2014; Lin et al., 2011; Yang et al., 2013, 2017). Esta misma población de neuronas se ha encontrado activada en la conducta de agresión de ratones hembras, provocando su inactivación una disminución de las respuestas agresivas (Hashikawa et al., 2017). Al mismo tiempo, el VMH-VL ha sido relacionado en la conducta de reproducción de ratones hembra y recientemente en la conducta reproductiva de machos (Lin et al., 2011; Lee et al., 2014)

El **VMH-DM** forma parte de un sistema que controla la lordosis en ratones hembra junto con el MePV y la Sustancia Gris Periacueductal (SGP). Se ha comprobado que la

inactivación de las neuronas *Sf1* positivas reduce la lordosis inducida por la respuesta de las neuronas ESP1 (Ishii et al., 2017).

Un núcleo importante para el desarrollo de las conductas sociales es el SGP, cuyo papel consistiría en el hacer de puerta de acceso de la actividad neuronal de los núcleos encefálicos que procesan la información social (véase **Figura 5** y **Figura 6**) a la medula espinal para el desarrollo de las conductas motoras. Se conoce su conexión con el VMH (Motta et al., 2013) y su papel en el desarrollo de la lordosis mediante su conexión con el VMH-DM (Ishii et al., 2017) mediante la vía neuronal MePV→VMH-DM→ PAG. Además, es un núcleo importante para el desarrollo de la conducta de agresión influida desde la actividad de las neuronas del VMH-VL, aunque las características de esta influencia en la agresión requieren futura investigación (Hashikawa et al., 2017b). De momento se ha comprobado que la lesión de algunas subregiones el SGP genera aumento de agresión en ratas hembra (Lonstein y Stern, 1997).

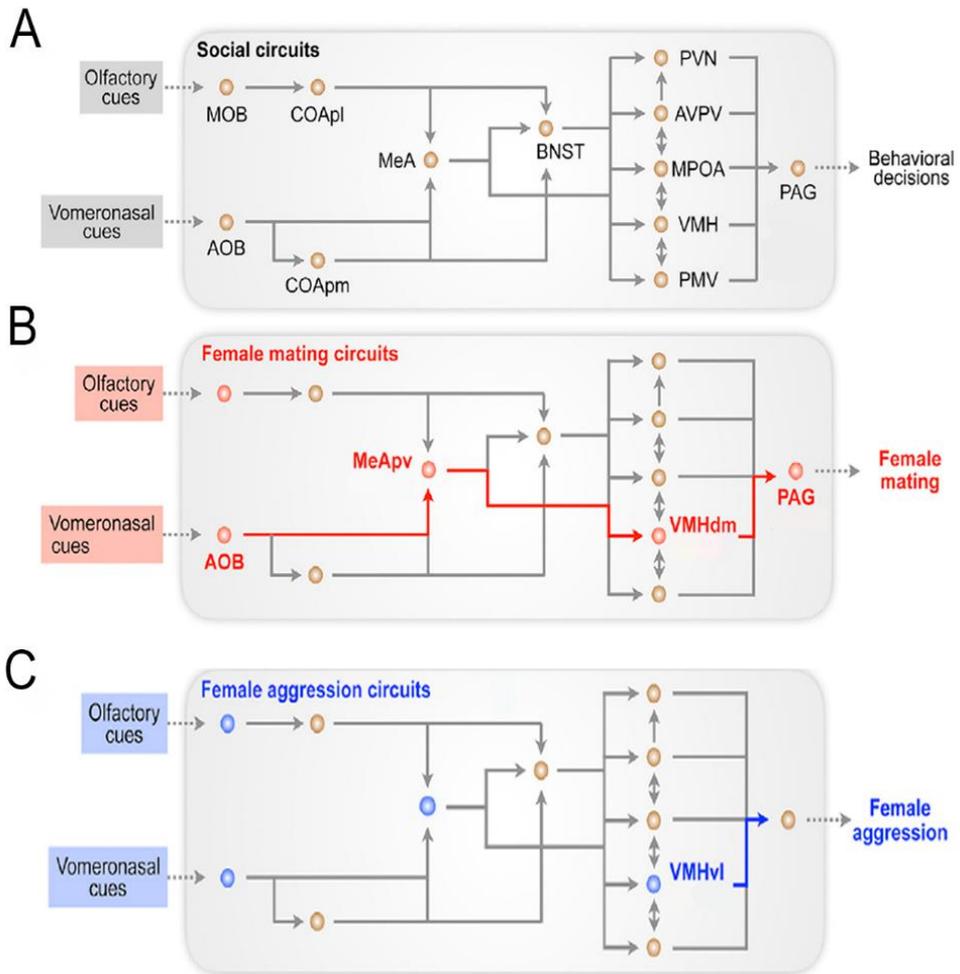


Figura 6: A. Representación esquemática de los principales circuitos y regiones cerebrales en la conducta social en ratones. B. Núcleos neuronales que modulan la conducta sexual en ratones hembra después de la detección de un estímulo atractivo vomeronasal (e.g. D, ESP1, etc.). C. Núcleos neuronales relacionados con la conducta de agresión en ratones hembras. Extraído de Chen y Hong, 2018.

Objetivos

Los principales objetivos desarrollados en esta tesis doctoral están relacionados con el estudio del comportamiento social de individuos de la especie *Mus musculus* ante quimioseñales emitidas tanto por congéneres de su misma especie (Feromonas) como por animales de otras (Kairomonas).

Los **objetivos específicos** son los siguientes:

1. Estudiar el comportamiento de ratones hembra ante feromonas sexuales presentes en la orina de macho.
2. Comprobar si el modelo de inducción de enfermedad por Lipopolisacárido es capaz de hacer que los ratones generen un estímulo que nos permita estudiar el comportamiento de evitación de señales de enfermedad y la neurobiología que subyace al mismo.
3. Además, comprobar la idoneidad de la Darcina y de los Péptidos Formilados como estímulos motivadores de conductas de acercamiento/atracción y evitación/aversión, respectivamente.
4. Comprobar la capacidad de motivar comportamientos evitativos/aversivos de Kairomonas presentes en

estímulos manchados por especímenes de *Felis catus* (gato doméstico) con la finalidad de usarlos para el estudio de las vías neuronales que modulan estos comportamientos.

5. Comprobar, asimismo, la capacidad de motivar conductas de evitación/aversión en ratones por parte de otros estímulos procedentes de depredadores con la misma finalidad que con los estudios del gato doméstico (*id est*, el estudio de las vías neuronales que median en los comportamientos de evitación).

Parte II: Estudios con el Modelo de LPS

Introducción:

Las especies animales que forman estructuras sociales con complejas interacciones entre sus miembros tienen mayor probabilidad de ser infectados por patógenos, hecho que ha sido comentado por algunos científicos como el precio a pagar por la sociabilidad (Alexander, 1974). Sin embargo, esta conducta social también puede funcionar como un factor protector puesto que puede ayudar a generar inmunidad fisiológica a los individuos del grupo (Kavaliers et al., 2020). Durante los *annus horribilis* de 2020 y posteriores, debido a la situación de emergencia internacional provocada por la pandemia causada por el virus SARS-CoV-2, hemos escuchado a diversos epidemiólogos en los *Mass media* hablar sobre los mecanismos de obtención de inmunidad a patógenos y, a nivel social, de la inmunidad de rebaño y de la necesidad de mantener la distancia social como medida de seguridad. Desde un punto de vista comportamental se pueden observar el desarrollo de conductas para evitar el contagio. Estas conductas, debido a la estrecha relación que existe a nivel evolutivo entre las especies sociales y los patógenos, están presentes de manera relativamente

innata en los individuos y se activarían ante señales perceptivas emitidas por el sujeto enfermo que pueden ser químicas o comportamentales (el llamado en inglés *Sick Behavior*) (Smith y Bilbo, 2020; Kavaliers et al., 2020, 2022).

El conjunto de conductas que desarrolla el sujeto receptor de estas señales de enfermedad para evitar el contagio ha sido denominado Sistema Inmune Comportamental (SIC) al considerarse una forma conceptualmente ligada al sistema inmune fisiológico, pero destinado a generar adaptaciones comportamentales para evitar el contacto con la enfermedad (Schaler y Park, 2011; Schaler, Murray y Bangerter, 2015). Estos comportamientos de evitación han sido descritos en muchas especies animales (Kavaliers, Choleris y Pfaff, 2005; Kiesecker et al., 1999) así como en seres humanos (Sarolidou, et al., 2020; Schaler y Park, 2011). Incluso en especies de insectos que forman eusociedades encontramos adaptaciones comportamentales a nivel de grupo: las llamadas respuestas inmunes sociales (Smith y Bilbo, 2020). Por ejemplo, algunas especies de abejas aumentan la temperatura de las zonas de cría de la colmena (a esto se ha llamado “fiebre” de la zona de cría, fíjense en el paralelismo con el sistema inmune fisiológico)

para protegerse de patógenos sensibles a la temperatura como el hongo *Ascosphaera apis* (Starks, Blackie y Seeley, 2000). Otro ejemplo, en este caso de conducta individual por el bien de la colonia, lo encontramos al observar a hormigas trabajadoras de la especie *Temnothorax unifasciatus* alejarse del grupo para morir aisladas después de ser infectadas por un patógeno, presumiblemente para no expandir la enfermedad (Heinze y Walter, 2010).

El SIC es considerado como un conjunto de mecanismos comportamentales que servirían como defensa preventiva a los ataques de patógenos (Schaler, Murray y Bangerter, 2015; Kavaliers y Choleris, 2018), una representación del dicho español “mejor prevenir que curar” en la conducta de los animales moldeada por años de acción de los mecanismos evolutivos. Las conductas que se dirigen a la evitación de patógenos se han dividido en dos tipos: uno reactivo, que se da ante la presencia de señales de enfermedad y que lleva a la evitación de los focos de infección, como podemos observar en chimpancés evitando el contacto con coespecíficos con poliometitis (Goodal, 1987); el otro proactivo, que consiste en las conductas que llevan a evitar la enfermedad aún sin estar en

presencia de la misma, como serían las conductas relacionadas con la higiene y el mantenimiento de ciertas normas culturales en los seres humanos (Murray y Schaler, 2012; Schaller, 2014).

El SIC, desde un punto de vista psicológico, es un sistema motivacional propiamente dicho como lo pueden ser los impulsos sexuales o el hambre, que requiere la coordinación de varios sistemas mentales (Bernard, 2012; Aunger y Curtis, 2013). Aunque no parece existir una correspondencia inequívoca entre sistemas motivacionales y emociones puesto que una emoción puede darse en varios sistemas motivacionales (Aunger y Curtis, 2013), una emoción que se encuentra íntimamente ligada a las conductas reactivas del SIC sería la emoción de asco.

La emoción de asco se considera que apareció a lo largo de la filogenia con la finalidad de servir a este sistema motivacional para la evitación de patógenos (Curtis, de Barra y Aunger, 2011; Tybur et al., 2013). En su libro publicado en 1872 *The Expression of Emotions in Humans and Other Animals* el naturalista Charles Darwin diseccionó la emoción de asco como la sensación de repugnancia que genera un objeto (al ser imaginado o al tener contacto directo con él) principalmente relacionado con el gusto, aunque también con el sentido del

olfato y la vista (Darwin, 1968). Actualmente poco se ha avanzado respecto a esta descripción decimonónica y no existe consenso conceptual sobre cuantos tipos de asco existen (Stevenson et al., 2019). La categorización del asco más reciente hace referencia a la existencia de tres dominios que promoverían la aparición del asco (Tybur et al., 2013; Véase **Figura 7**). En el primero, el asco ante patógenos, que es el objetivo de los estudios de esta parte de la tesis y en los que se englobaría a las sensaciones de asco propiamente dichas y que son normalmente provocadas por objetos como heces u olores de descomposición. El segundo dominio haría referencia al asco ante conductas sexuales indebidas, tales como el incesto o la pedofilia. El tercero, finalmente, se referiría al asco moral. Por otro lado, otra manera de categorizar al asco que encontramos en la literatura hace referencia al nivel de complejidad emocional con el que viene acompañada esta emoción. El asco, como todas las emociones, puede venir en compañía de otras sensaciones. En concreto, puede venir en conjunto con miedo, ira, vergüenza, compasión o tristeza (Marzillier y Davey, 2004; Simpson et al., 2006). Así, complementando la primera categorización descrita, el asco moral tendería a una mayor

Parte II: Estudios con el Modelo de LPS

complejidad al venir acompañado de ira, mientras que el asco hacia patógenos sería el que posee menor complejidad emocional al presentarse puramente la emoción de asco (Stevenson et al., 2019).

Adaptive problem	Cues that indicate probable presence of adaptive problem	Additional factors modulating response	Expected value estimator	Computed internal regulatory variable	Output
Avoiding contact with infectious disease-causing organisms	Bodily fluids and products, animals, poor hygiene, decomposing or rotting organic matter	Nutritional state, relationship to cue source (e.g., friendship, kinship), sexual arousal	Integrates contact avoidance benefits (reduced infection risk) with costs (e.g., not eating, not having sex)	Expected value of contact	Pathogen disgust: Sensation of disgust, disgust facial expression, motivation to avoid contact, and deployment of other functionally coordinated systems according to the magnitude of the expected value of contact
Avoiding sexual contact with individuals jeopardizing fitness	Sexual interest from individuals with poor genetic compatibility (kin) and with low mate value	Availability of alternative mates, one's own mate value (opportunity costs)	Integrates sexual avoidance benefits (reproductive opportunities saved for better partner) with costs (e.g., missed reproductive opportunities, impaired social relationship with target)	Expected sexual value	Sexual disgust: Sensation of disgust, disgust facial expression, motivation to avoid sexual contact, and deployment of functionally coordinated systems according to the magnitude of the expected sexual value
Communicating and coordinating condemnation with other people	Behaviors likely to be condemned by others (lying, cheating, stealing, rule violations)	Relationship to target (e.g., friendship, kinship)	Integrates condemnation benefits (mitigating conflict escalation) with costs (e.g., impaired social relationship with target)	Expected condemnation value	Moral disgust: Motivation to signal condemnation of the behavior/person and facial and vocal expressions of disgust

Figura 7: Tabla explicativa sobre los tres dominios del asco. Extraído de Tybur et al., 2013.

Aunque las investigaciones sobre las emociones se han centrado principalmente en los seres humanos, cada vez más se está reconociendo la necesidad y pertinencia de estudiar las emociones en otros animales (Kavaliers, Ossenkopp y Choleris, 2020; Dolensek et al., 2020; Anderson y Adolphs, 2014; Paul et al., 2020). Ya Darwin dio cuenta de diversas manifestaciones

conductuales en animales que indicaban la presencia de estados al menos similares a las emociones en el hombre (Darwin, 1968) e investigaciones recientes han encontrado expresiones faciales en ratones que presentan diferencias respecto al estado neutral de los músculos faciales dependiendo del estímulo presentado (Dolensek et al., 2020). Como podemos ver en la **Figura 8**, los individuos de la especie *Mus musculus* son capaces de expresar mediante el rostro la detección de sabores asquerosos, que sabemos capaces de producir náuseas en roedores (Parker y Limber, 2006).

En esta parte de la presente tesis doctoral nos centraremos en esta conducta de evitación en roedores, en específico en la especie *Mus musculus*. Para ello, en los siguientes apartados de esta introducción introduciremos las señales olfativas y los componentes neuroanatómicos del SIC, así como explicaremos los principales estudios referidos al modelo de inducción de activación del sistema inmune con Lipopolisacárido (LPS) de origen bacteriano.

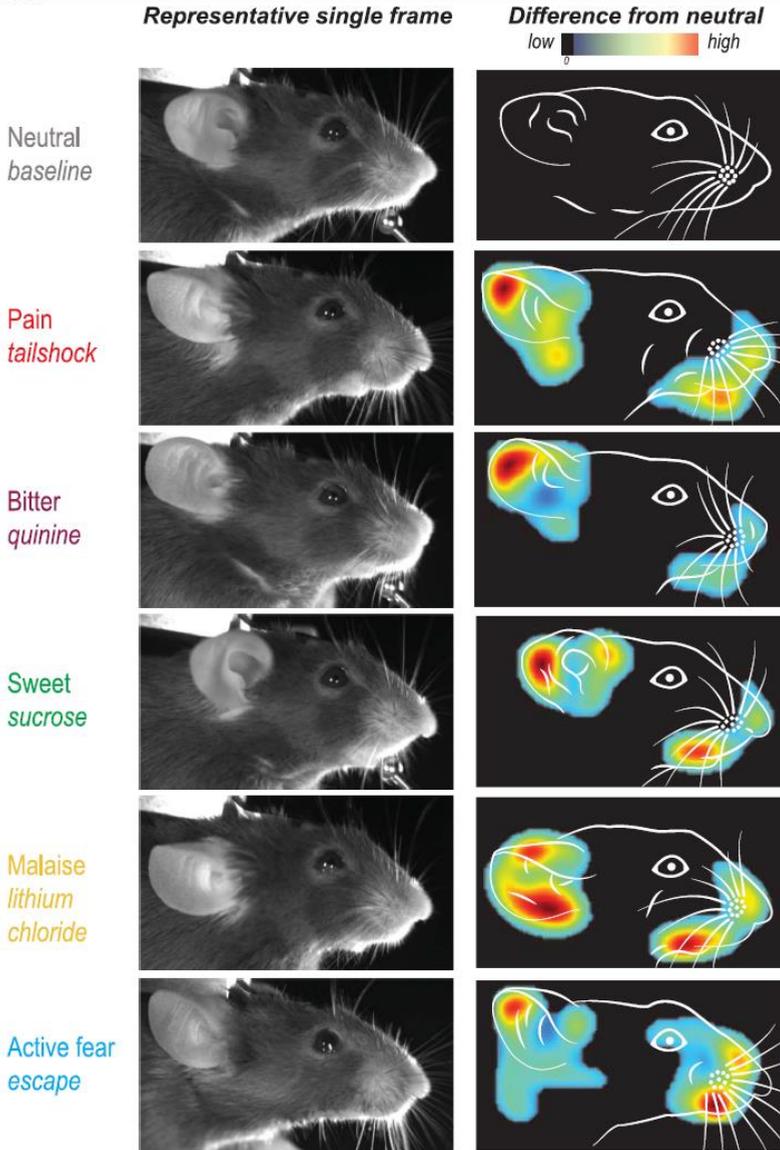


Figura 8: Fotogramas de la grabación del rostro de un mismo sujeto experimental durante el test con varios sabores. El sabor amargo se ha relacionado con la emoción de asco, ya que conduciría a la evitación de alimentos potencialmente tóxicos. Extraído de Dolensek et al., 2020.

Sistema Olfativo y Señales de Enfermedad

Las señales de enfermedad que provocan la activación del SIC en individuos de la misma especie son el resultado de la activación de los sistemas de defensa del individuo enfermo. Estos sistemas activarían mecanismos fisiológicos para combatir la enfermedad (e.g., la aparición de la fiebre, desarrollo de células inmunitarias, etc.) y estimularían la realización de adaptaciones en la conducta social que ayudarían a la recuperación (e.g. disminución de la sociabilidad con individuos ajenos al grupo y aumento con aquellos con los que se tiene familiaridad optimizando así el gasto energético) (Lopes, Block y König, 2016; Fishkin y Winslow, 1997; Smith y Bilbo, 2021).

En la especie *Mus musculus*, como describimos en la introducción de esta tesis, la principal fuente de estímulos del medio es sistema olfativo. El sistema olfativo está formado por varios órganos, de los cuales destacan el EOP y el OVN en la detección de señales de tipo feromonal, incluidos los referidos a los estímulos de enfermedad de co-específicos (Kavaliers y Choleris, 2018; Zufall y Leinders-Zufall, 2007). Las señales de

enfermedad parecen de requerir del correcto funcionamiento del OVN. En 2015 el equipo de Rodriguez (Boillat et al., 2015) publicó un artículo donde recogía una serie de experimentos realizados en la Universidad de Ginebra con la finalidad de comprobar qué sistema de señalización sensorial era requerido para la activación del SIC en ratones.

Para ello, el equipo de Rodriguez comprobó la existencia de conductas de evitación en una muestra de ratones macho de la cepa C57 utilizando un test de preferencia conductual con dos ratones macho anestesiados a cada lado de la caja de experimentación, uno tratado con LPS y el otro sin tratar. Los resultados de la medición de la conducta del ratón mostraban una preferencia de la muestra a explorar el conoespecífico no tratado con LPS respecto del tratado. Estos resultados fueron replicados en un ensayo con un único animal en la caja de experimentación y se encontró la misma tendencia de exploración respecto a la orina de machos tratados y sin tratar utilizando como sujetos ratones de la cepa B6CBAF1/J expuestos a papeles de filtro manchados con orina.

Después de confirmar las hipótesis conductuales respecto a las señales de enfermedad en su diseño experimental,

midieron la activación neuronal de su muestra mediante el marcaje de la proteína c-Fos al entrar en contacto con los estímulos y encontraron un alto marcaje en el BOA, en concreto en la parte del mismo de células granulares tanto en las porciones anterior y posterior. Esta activación del BOA sugería una activación del OVN, por lo que llevaron a cabo experimentos de conducta similares a los explicados anteriormente utilizando ratones genéticamente modificados para evitar el correcto funcionamiento de los canales de iones Trpc2 de las neuronas receptoras vomeronasales y ratones a los que se les había extirpado el OVN. Conductualmente, la preferencia en estos ratones por machos sin tratar con LPS fue eliminada y el equipo de Rodríguez no encontró las diferencias en activación encontradas en el BOA en la exploración de orina de macho sin tratar y macho tratado (**Figura 9**; Boillat et al., 2015).

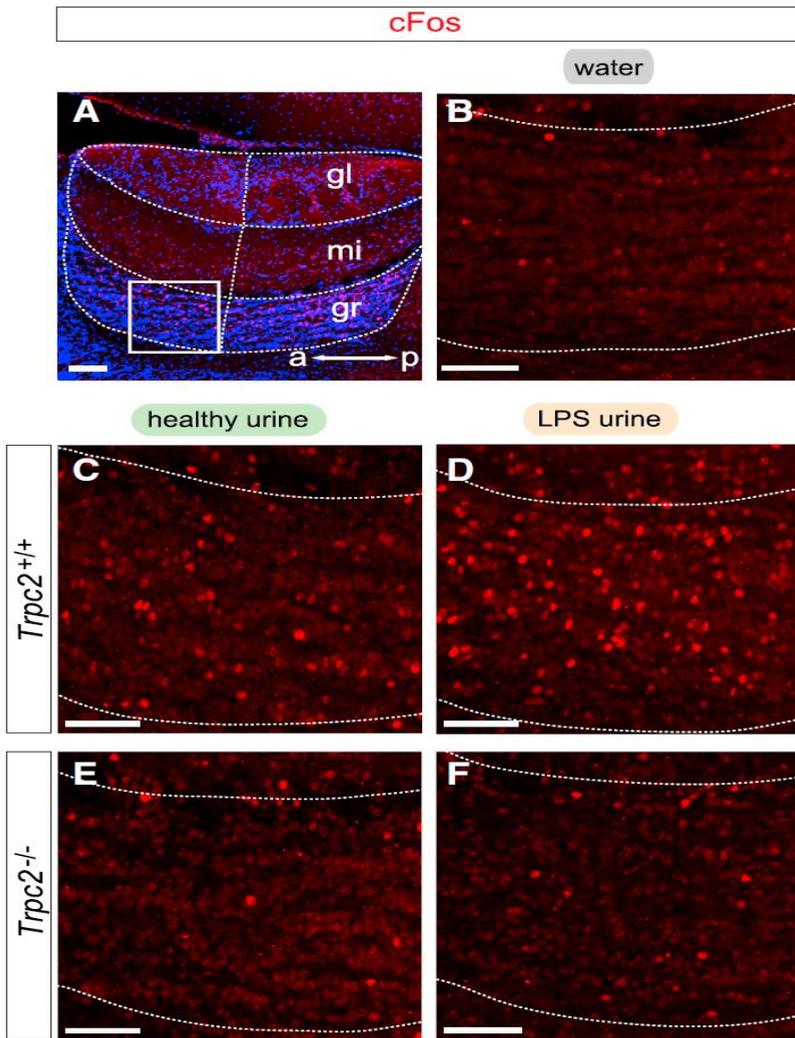


Figura 9: Fotografías del marcaje de la activación neuronal. A. marcaje en rojo de la proteína c-Fos y en Azul DAPI del BOA en sus partes anterior (a), posterior (p), capa periglomerular (gl), capa de células mitrales (mi) y la capa de células granulares (gr). Las imágenes B, C y D corresponden a la activación ante agua (B) y orina de macho sin tratar (C) y tratado (D). Las imágenes E y F corresponden a la activación ante los dos tipos de orina de ratones con defecto en los canales *Trpc2*. Extraído de Boillat et al., 2015

En 2009 se descubrió la presencia de una familia de quimiorreceptores en el OVN que inmediatamente fueron propuestos como candidatos para mediar la conducta de evitación ante señales de enfermedad: los Receptores de Péptidos Formilados (Rivière et al., 2009; Liberles et al., 2009). Los RPF son receptores con siete dominios transmembrana que reconocen péptidos formilados procedentes de bacterias entre otros ligandos (Bufe et al., 2019, 2015; Bloes, Kretschmer y Peschel, 2015; Dahlgren et al., 2016). El genoma del ratón contiene siete genes de RPF que son expresados, además de en el OVN, en células del sistema inmune: en concreto, los *Fpr1* y *Fpr-rs2* son transcritos por macrófagos; *Fpr-rs1* lo es tanto por células del sistema inmune como por las neuronas de OVN, encontrándose en este último en su capa basal; y de manera exclusiva, *Fpr-rs3*, *Fpr-rs4*, *Fpr-rs6* y *Fpr-rs7* son transcritos solo por neuronas del OVN en la capa apical de su neuroepitelio (Vease **Figura 10**; Rivière et al., 2009; Liberles et al., 2009; Dietschi et al., 2017). Finalmente, los axones de las neuronas que expresan estos receptores se dirigen, como el resto de neuronas sensoriales del OVN, a los glomérulos presentes en el BOA (Dietschi et al., 2013).

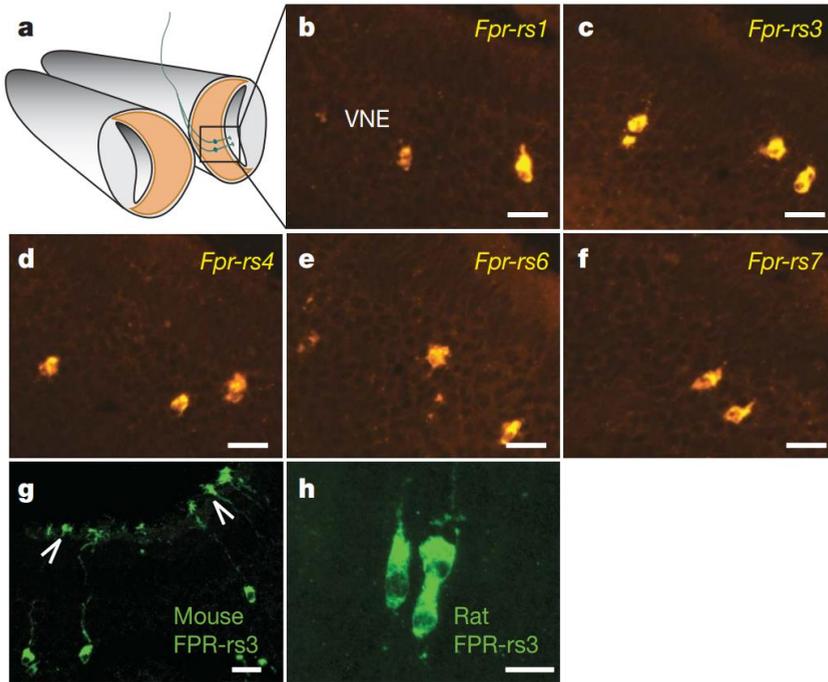


Figura 10: a. representación de un corte coronal del OVN; b-f. marcaje de los receptores *Fpr-rs1*, *Fpr-rs3*, *Fpr-rs4*, *Fpr-rs6* and *Fpr-rs7* en el neuroepitelio del OVN; g. marcaje mediante inmunohistoquímica de *Fpr-rs3* en el soma y las dendritas (flechas) de neuronas del OVN de un ratón; h. expresión de *Fpr-rs3* en el epitelio vomeronasal de una rata. Extraído de Rivière et al., 2009.

Circuitos Neuronales y Conducta de Evitación de Patógenos

Como comentábamos al principio de la introducción, cuando más gregaria es una especie mayor es el riesgo de exposición a patógenos. Por lo tanto, al darse esta intersección entre las conductas sociales y el riesgo de contagio, estudiar las estructuras neuronales que modulan la conducta social (e.g. la Red Cerebral Sociosexual de la que hablábamos en la parte introductoria) nos puede llevar a elucidar como se determinan las conductas del SIC. Variables sociales como la situación de aislamiento, así como la posición individual en las jerarquías grupales y las relaciones sociales positivas, son variables que influyen en el nivel de estrés y de este modo pueden afectar a la respuesta fisiológica del sistema inmune (Bzdok y Dunbar, 2020; Cohen, 2021). Pero no solo eso, si no que los animales que tienen el sistema inmune activado realizan una serie de conductas que parecen tener el sentido evolutivo de mejorar las probabilidades de recuperación y evitar expandir sobre el resto de individuos del grupo el patógeno (Smith y Bilbo, 2021)

El comportamiento de evitación de patógenos se asienta en un complejo substrato neuronal que modula desde la recepción de la señal externa hasta la resolución del comportamiento motor de evitación. Este substrato neuronal probablemente requiera de la coordinación de la actividad de varios sistemas neuronales que integren la información sensorial, la saliencia del estímulo, el nivel de refuerzo y amenaza que este pueda tener, el nivel de vigilancia del individuo y su capacidad de respuesta (Kavaliers et al., 2020). Así, Kavaliers y sus colaboradores proponen un modelo donde interactúan circuitos neuronales relacionados con la toma de decisiones sociales (O'Connell y Hofmann, 2012), el refuerzo y el cerebro sociosexual (vease **Figura 11**; Newman, 1999; Kavaliers et al., 2022). La activación o la inhibición de los núcleos de estos circuitos determinará las respuestas conductuales hacia otros individuos (e.g. conducta de acercamiento o evitación, decisiones de copulación, agresión, cuidado, etc.)

Un nodo importante dentro del procesamiento del comportamiento social, como comentábamos en la introducción de la tesis, es el complejo amigdalino o amígdala. La amígdala es considerada como un detector de estímulos prominentes,

siendo crítica para la identificación y decodificación de estímulos sociales y la resolución de las conductas relacionadas. En concreto, para la percepción y procesamiento de los estímulos olfativos, la Me se presenta como un núcleo clave de integración sensorial gracias a la convergencia en ella de información del MOE y del OVN (Cherry y Baum, 2020; Holy, 2018; Gutierrez-Castellanos et al., 2010; Cadíz-Moretti et al., 2013). Además, desde la Me, se dirigirán aferencias a núcleos del sistema de toma de decisiones como la Corteza Prefrontal (Leschak et al., 2022) y núcleos del sistema de recompensa que determinarán la valencia afectiva y el nivel de incentivo para realizar conductas de aproximación o evitación (Newman, 1999; O'Connell y Hofmann, 2012). Finalmente, otro núcleo del Complejo Amigdalino relacionado con conductas de evitación ha sido el Núcleo Posteromedial de la Amígdala Cortical, que se encuentra bilateralmente conectada con la Me y se ha encontrado que su activación ante hembras tratadas con LPS parece ser suficiente para disminuir significativamente las conductas de cópula de los machos, aunque no parece afectar a la conducta social entre machos cuando el conoespecífico ha sido tratado con LPS (Kwon et al., 2021).

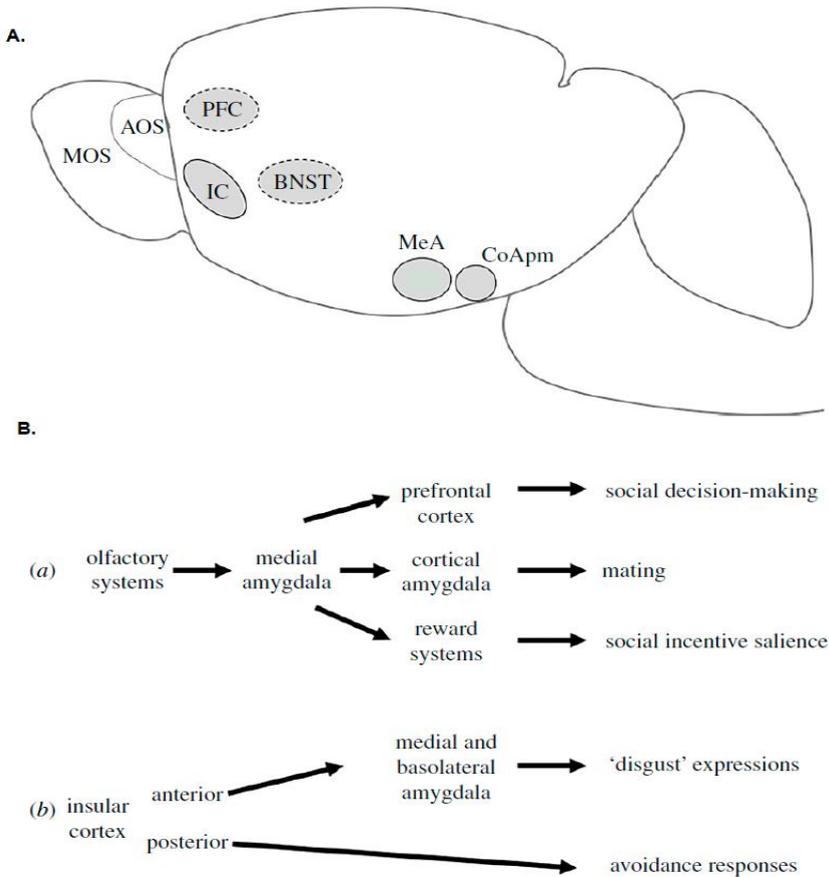


Figura 11: A. Representación de un corte sagital del encéfalo de ratón con las regiones cerebrales relacionadas con la conducta de evitación de patógenos en ratones marcadas. Las líneas discontinuas indican las regiones candidatas. **B.** Propuesta de Kavaliers et al. 2022 de las vías neuronales que influyen en el comportamiento de evitación de patógenos. MOS= Bulbo Olfativo Principal; AOS= Sistema Olfativo Accesorio; PFC= Corteza Prefrontal; IC= Corteza Insular; BNST= Núcleo del Lecho de la Estria Terminal; MeA= Amígdala Medial; CoApm= Núcleo Posteromedial de la Amígdala Cortical. Modificado de Kavaliers et al., 2022.

Otra región encefálica importante, necesaria para la expresión de estados afectivos, especialmente los relacionados con la emoción del asco, es la Corteza Insular (CI). Su conexión con componentes del RSC y el sistema cerebral de recompensa le convierten en un nodo importante en la modulación de los comportamientos referidos a la evitación de patógenos (Rogers-Carter et al., 2018). Se ha encontrado, además, que la región posterior y la región anterior de la CI se encargan de diferentes funciones dentro del SIC. Por un lado, la parte Posterior de la CI, al inactivarse farmacológicamente, elimina en ratas la evitación de conoespecíficos tratados con un imitador vírico (Rieger, Worley y Christianson, 2022). Finalmente, la parte Anterior de la CI, conectada la Me y la Amígdala Basolateral (Kayyal et al., 2019), cuando es activada farmacológicamente inicia el desarrollo de las expresiones faciales en ratones referidas al asco al presentarles a estos animales Cloruro de Litio (Dolensek et al., 2019).

Hipótesis Experimentales

A continuación enumeraremos, experimento a experimento, las hipótesis de inicio en cada uno de ellos. Primero, en **los experimentos de preferencia con orina de especímenes *Mus musculus*** las hipótesis fueron:

1. Los componentes no volátiles de la orina de macho no tratado con LPS producirán preferencia estadísticamente significativa respecto a los componentes no volátiles de la orina de hembra.
2. Los componentes no volátiles de la orina de macho tratado con LPS no producirán preferencia estadísticamente significativa respecto a la orina de hembra.
3. Los componentes no volátiles de la orina de macho sin tratar producirán preferencia estadísticamente significativa respecto a los mismos de la orina de macho tratado con LPS.
4. Los componentes volátiles de la orina de macho no tratado y de macho sin tratar no provocaran diferencias estadísticamente significativas en el tiempo en que los

sujetos de nuestra muestra se encuentran cerca de los mismos.

5. Los componentes volátiles de la orina de macho (tratado con LPS y sin tratar) provocaran de manera estadísticamente significativa que los ratones hembra de nuestra muestra pasen más tiempo cerca de estos respecto a los componentes volátiles de orina de hembra.

En la **Tabla 1** presentamos las fórmulas que condensan las hipótesis antes expresadas:

	H_i	Fórmula
Exptos. de Preferencia con Orina	1	$T(\text{noV})_{\text{♂noT}} > T(\text{noV})_{\text{♀}}$
	2	$T(\text{noV})_{\text{♂siT}} \leq T(\text{noV})_{\text{♀}}$
	3	$T(\text{noV})_{\text{♂siT}} < T(\text{noV})_{\text{♂noT}}$
	4	$T(\text{V})_{\text{♂noT}} = T(\text{V})_{\text{♂noT}}$
	5	$[T(\text{V})_{\text{♂noT}} \& T(\text{V})_{\text{♂noT}}] > T(\text{V})_{\text{♀}}$

Tabla 1: Tabla resumen de las hipótesis de trabajo para los experimentos de preferencia con orina de ratón. Los colores señalan el tipo de estímulo: el color azul la orina de macho sin tratar; el color verde la orina de macho tratado con LPS; el color rojo orina de hembra. Símbolos: T= tiempo; noV= condición de exposición a componentes no volátiles de la orina; V= condición de exposición a volátiles de orina; ♂noT= orina de macho no

tratado con LPS; ♂= orina de macho si tratado con LPS; ♀= orina de hembra.

Posteriormente el experimento que fue realizado fue el **experimento de activación neuronal** mediante marcaje de la proteína c-Fos. Las hipótesis de trabajo fueron:

6. Los sujetos de nuestra muestra mostrarán una tendencia estadísticamente significativa a permanecer cerca de la orina de macho sin tratar respecto a la orina de macho tratado con LPS y al estímulo neutro.
7. Los sujetos de la muestra no pasarán de manera estadísticamente significativa más tiempo cerca de la orina de macho tratado con LPS que cerca del estímulo neutro.
8. Encontraremos de forma estadísticamente significativa un mayor número de neuronas marcadas en la capa granular del núcleo BOA en los grupos expuestos a orina respecto al grupo expuesto a estímulo neutro.
9. Encontraremos de forma estadísticamente significativa mayor número de neuronas marcadas en los núcleos MePV y VHM-DM en el grupo expuesto a orina de macho

tratado con LPS respecto de los grupos expuestos a orina de macho no tratado y a estímulo neutro.

10. Por otro lado, encontraremos que el grupo expuesto a orina de macho no tratado posee mayor marcaje neuronal en los núcleos MePD y VMH-VL que los grupos expuestos a macho tratado con LPS y a estímulo neutro.

	H_i	Fórmula
Exp. de Activ. Neu.	6	$T_{\text{♂noT}} > [T_{\text{♂siT}} \& T_N]$
	7	$T_{\text{♂siT}} \leq T_N$
	8	$A(\text{BOA})_N < [A(\text{BOA})_{\text{♂siT}} \& A(\text{BOA})_{\text{♂noT}}]$
	9	$A(\text{MePV/VMHDM})_{\text{♂siT}} > [A(\text{MePV/VMHDM})_{\text{♂noT}} \& A(\text{MePV/VMHDM})_N]$
	10	$A(\text{MePD/VMHVL})_{\text{♂noT}} > [A(\text{MePD/VMHVL})_{\text{♂siT}} \& A(\text{MePD/VMHVL})_N]$

Tabla 2: Tabla resumen para las hipótesis de trabajo para el experimento de activación neuronal usando orina de ratón macho. Los colores señalan el tipo de estímulo: el color azul la orina de macho sin tratar; el color verde la orina de macho tratado con LPS; el color gris el estímulo neutro. **Símbolos:** T= tiempo; A= marcaje de c-Fos; BOA= Bulbo Olfativo Accesorio; MePV= Amígdala Medial Posteroventral; MePD = Amígdala Medial Posterodorsal; VMHDM= Hipotálamo Ventromedial Dorsomedial; VMHVL= Hipotálamo Ventromedial Ventrolateral; ♂noT= orina de macho no tratado con LPS; ♂siT= orina de macho si tratado con LPS; N= estímulo neutro.

Continuamos con el protocolo que hemos denominado **experimento de viruta vs orina/estro vs no estro**, en el que controlando la fase del ciclo estral de la muestra les presentamos estímulos procedentes de machos y hembras en forma de viruta sucia u orina. Las hipótesis de trabajo son las siguientes:

11. Los sujetos de nuestra muestra pasarán más tiempo cerca de los estímulos de viruta de manera estadísticamente significativa respecto a los estímulos de orina.
12. El tiempo que los animales en fase de estro pasarán explorando los estímulos será estadísticamente igual al que pasan en las fases no estro.
13. El tiempo que los animales pasarán explorando la viruta de macho será estadísticamente mayor respecto a la viruta de hembra.
14. El tiempo que los animales pasarán explorando la orina de macho será estadísticamente mayor respecto a la orina de hembra.

	H_i	Fórmula
Viruta vs Estro	11	$T(Vr) > T(Or)$
	12	$T(E) = T(noE)$
	13	$T(Vr)_{\text{♂}} > T(Vr)_{\text{♀}}$
	14	$T(Or)_{\text{♂}} > T(Or)_{\text{♀}}$

Tabla 3: Tabla resumen para las hipótesis de trabajo para el experimento de viruta vs orina/estro vs no estro. Los colores señalan el tipo de estímulo: el color azul la orina de macho; el color rojo el estímulo de hembra. Símbolos: T= tiempo; Or= Orina; Vr= Viruta ♂= estímulo de macho; ♀= estímulo de hembra.

El siguiente experimento que realizamos fue el **experimento con D y PF**. En este experimento fueron usadas diluciones de Darcina y de Péptidos Formilados para provocar conductas de atracción/evitación, respectivamente. Así, las hipótesis experimentales fueron las siguientes:

- La condición donde se presenta el estímulo D presentará una ratio significativamente mayor que la condición donde se presenta estímulo PF y la ratio de la condición donde solo se presenta estímulo neutro.

16. El estímulo PF presentará, de manera estadísticamente significativa, una ratio igual o menor que la ratio del estímulo neutro.

	<i>H_i</i>	<i>Fórmula</i>
<i>D vs PF</i>	15	$T_D > T_{PF} \ \& \ T_N$
	16	$T_{PF} < T_N$

Tabla 4: Tabla resumen para las hipótesis de trabajo para el experimento de preferencia entre D y PF. Los colores señalan el tipo de estímulo: el color azul la Darcina; el color gris los Péptidos Formilados; el color negro el estímulo neutro. Símbolos: T= tiempo; D= Darcina; PF= Péptidos Formilados; N= estímulo neutro.

A continuación, fue realizado el **experimento de viruta de macho tratado con LPS I**, en el que usamos viruta de macho tratado con una inyección de Lipopolisacarido (LPS) de origen bacteriano durante cuatro horas antes de la extracción de la viruta. Para este experimento las hipótesis de partida fueron:

17. El estímulo de viruta sucia por macho sin tratar presentará una ratio respecto al estímulo neutro junto con el que es presentado en la situación experimental significativamente mayor que el estímulo de viruta de macho tratado con LPS frente a su correspondiente

estímulo neutro y el estímulo neutro con el otro estímulo neutro presente en la caja.

18. El estímulo de viruta de macho tratado con LPS presentará, de manera estadísticamente significativa, una ratio igual o menor que la ratio del estímulo neutro.

	<i>H_i</i>	<i>Fórmula</i>
Viruta LPS I	17	$T_{\text{♂noT}} > T_{\text{♂siT}} \ \& \ T_N$
	18	$T_{\text{♂siT}} \leq T_N$

Tabla 5: Tabla resumen para las hipótesis de trabajo para el experimento de preferencia de viruta LPS I. Los colores señalan el tipo de estímulo: el color azul la viruta de macho sin tratar; el color verde la viruta de macho tratado con LPS; el color negro el estímulo neutro. **Símbolos:** T= tiempo; ♂noT= viruta de macho no tratado con LPS; ♂siT= viruta de macho si tratado con LPS; N= estímulo neutro.

A continuación, fue realizado el **experimento de viruta de macho tratado con LPS II**, cuya diferencia con el anterior reside en la duración del tratamiento con LPS antes de la recogida de la viruta, en este caso de 12 horas. Nuestras hipótesis respecto al este experimento fueron:

19. El tiempo total que los animales de nuestra muestra pasarán cerca del estímulo de viruta manchada de

macho sin tratar será estadísticamente mayor respecto al tiempo que pasarán cerca del estímulo de viruta manchada por macho tratado de LPS y del estímulo neutro.

20. El tiempo total que los animales macho de nuestra muestra pasarán cerca del estímulo de viruta de macho sin tratar será estadísticamente mayor respecto al tiempo que pasarán cerca del estímulo de viruta por macho tratado de LPS y del estímulo neutro.
21. El tiempo total que los animales hembra de nuestra muestra pasarán cerca del estímulo de viruta de macho sin tratar será estadísticamente mayor respecto al tiempo que pasarán cerca del estímulo de viruta de macho tratado de LPS y del estímulo neutro.
22. Los sujetos macho no pasarán cerca de la viruta de macho sin tratar más tiempo de forma significativa que los sujetos hembra.
23. Los sujetos macho y los sujetos hembra de la muestra no presentaran diferencias estadísticamente significativas en el tiempo en que ambos grupos pasan cerca de la viruta de macho tratado con LPS.

	<i>H_i</i>	<i>Fórmula</i>
Viruta LPS II	19	$T_{\text{♂noT}} > T_{\text{♂siT}} \ \& \ T_N$
	20	$T(\text{♂})_{\text{♂noT}} > T(\text{♂})_{\text{♂siT}} \ \& \ T(\text{♂})_N$
	21	$T(\text{♀})_{\text{♂noT}} > T(\text{♀})_{\text{♂siT}} \ \& \ T(\text{♀})_N$
	22	$T(\text{♂})_{\text{♂noT}} \leq T(\text{♀})_{\text{♂noT}}$
	23	$T(\text{♀})_{\text{♂siT}} = T(\text{♂})_{\text{♂siT}}$

Tabla 6: Tabla resumen para las hipótesis de trabajo para el experimento de preferencia de viruta LPS II. Los colores señalan el tipo de estímulo: el color azul la viruta de macho sin tratar; el color verde la viruta de macho tratado con LPS; el color negro el estímulo neutro. Símbolos: T= tiempo; ♂= grupo de machos; ♀= grupo de hembras; ♂noT= viruta de macho no tratado con LPS; ♂siT= viruta de macho si tratado con LPS; N= estímulo neutro.

Finalmente, el último experimento que fue realizado en esta parte de la tesis sobre el modelo de LPS fue el **experimento con animal anestesiado tratado con LPS**. Las hipótesis de partida fueron las que siguen:

24. Todos los animales de nuestra muestra pasarán más tiempo cerca del animal no tratado que del animal tratado con LPS y del estímulo neutro.

25. El tiempo total que los animales macho de nuestra muestra pasarán cerca del animal no tratado será estadísticamente superior respecto al tiempo que

pasarán cerca del animal tratado de LPS y del estímulo neutro.

26. El tiempo total que los animales hembra de nuestra muestra pasarán cerca del animal no tratado será estadísticamente superior respecto al tiempo que pasarán cerca del animal tratado de LPS y del estímulo neutro.

	H_i	Fórmula
Animal in vivo	24	$T_{noT} > T_{siT} \& T_N$
	25	$T(\♂)_{noT} > T(\♂)_{siT} \& T(\♂)_N$
	26	$T(\♀)_{noT} > T(\♀)_{siT} \& T(\♀)_N$

Tabla 7: Tabla resumen para las hipótesis de trabajo para el experimento de animal *in vivo*. Los colores señalan el tipo de estímulo: el color azul el animal sin tratar; el color verde el animal tratado con LPS; el color negro el estímulo neutro. **Símbolos:** T= tiempo; ♂= grupo de machos; ♀= grupo de hembras; noT= animal no tratado con LPS; siT= animal si tratado con LPS; N= estímulo neutro.

Metodología:

Metodología Estudios con Orina:

Animales

En los experimentos que presentaremos a continuación, en los que usamos orina de ratón como estímulo, utilizamos un total de 84 animales experimentales *Mus musculus* (Linnaeus, 1758). En concreto, estos animales corresponden a: 30 ratones hembra de la cepa SWISS RjOrl: SWISS (CD-1) (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Saint-Berthevin Cedex, Francia) para el Experimento de Preferencia I comprados con 8 semanas de edad; en el Experimento de Preferencia II, usamos otros 30 ratones hembra CD1 de la casa Janvier comprados con 8 semanas de edad; posteriormente, 21 de estos ratones hembra fueron usadas para el Experimento de Activación Neuronal cuando estas contaban con 26 semanas de edad; finalmente, usamos 24 ratones hembra de la cepa de la cepa C57BL/6J (C-57) (Janvier Labs).

Los protocolos usados fueron aprobados por el Comité de Ética sobre Experimentación Animal de la Universidad de Valencia y por la Dirección General de Agricultura y Pesca de la

Generalidad Valenciana (o el organismo equivalente en el momento de ser aprobado el protocolo). Los códigos de aprobación son mostrados en la **Tabla 8** junto con los datos de los animales usados en los experimentos llevados a cabo:

	<i>N</i>	<i>Cepa</i>	<i>Sexo</i>	<i>Edad</i> ¹	<i>Código</i> ²
<i>Exp. de Preferencia I</i>	30	CD1	♀	10	A1422608800108
<i>Exp. de Preferencia II</i>	30	CD1	♀	8	A1463579908516
<i>Exp. Act. Neuronal</i>	21			26	
<i>Exp. de Preferencia III</i>	24	C54	♀	8	A1536748473993
<i>Exp. de Viruta I</i>				26	
<i>Exp. de Viruta II</i>	18	CD1	♀	8	A20191115164620
<i>Exp. de Viruta III</i>	10	CD1	♀	30	A20210115233717
<i>Exp. de Animal in vivo</i>	8	CD1	♀	10	A20210115233717
	8	CD1	♂		
<i>Exp. de Viruta IV</i>	8	CD1	♀	18	A20210115233717
	8	CD1	♂		

Tabla 8: Tabla mostrando las características de los sujetos usados en los experimentos presentados en la Parte II sobre señales de enfermedad. ¹Edad en semanas. ²Código de aprobación por el Comité de Ética.

Por último, los sujetos experimentales tenían experiencia previa con los estímulos al haber sido criados hasta el momento de su envío al laboratorio por la casa de crianza con conespecíficos del sexo contrario. Es decir, no eran ingenuos a los estímulos olfativos que fueron presentados.

Estabulación

El protocolo de estabulación fue el mismo para todos los animales experimentales, independientemente del protocolo específico. Así, todas las ratonas fueron estabuladas en un espacio del laboratorio especialmente preparado para ello, a una temperatura de 22-24 °C con una humedad relativa al 70%. Finalmente, el ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas con la luz de la habitación programada para encenderse a las 8 am.

La alimentación consistió en la administración de un pienso estándar para roedores de la especie *Mus musculus*, sin ninguna característica que remarcar (e.g.: Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet, Harlan, ref: 2017). Tanto el agua como el pienso fueron proporcionados *ad libitum*.

Las jaulas de estabulación consistieron en cajas transparentes de propileno con tapa de alambre (215 x 465 x 145 mm, ref.1000, Panlab, Barcelona, España). Para favorecer la habituación y reducir las fuentes de estrés una semana antes de cada experimento se separaban aleatoriamente los sujetos de tal manera que quedaran divididos en los futuros grupos experimentales del protocolo. Además, el marcaje con tinta en la

cola fue realizado en este momento para favorecer su habituación. Se ha comprobado en estudios la importancia de reducir estos dos factores de estrés al ampliar el tiempo de adaptación a los mismos (Dahlborn et al., 2013). Finalmente, se les fue proporcionado papel triturado como material de anidación y enriquecimiento ambiental (tubos y trozos de cartón).

Estímulos

Para los estudios de orina, utilizamos tres tipos de estímulos: orina de hembra, orina de macho sano y orina de macho tratado con LPS:

Orina de hembra

La orina de hembra que presentaremos a continuación pertenece a ejemplares sanos en edad adulta de la especie *Mus musculus* criados por la empresa Janvier Labs de la cepa C57B/6JR. Esta orina fue transportada en alícuotas de 50 μ l y conservada a -20°C grados hasta el día de los respectivos experimentos.

Orina de Macho Sano

Para obtener la orina de macho usada como estímulo en estos experimentos se obtuvieron ratones macho de la cepa C57 (Janvier) en dos tandas. En la **Tabla 9** especificamos a que procedimientos corresponden cada tanda.

	<i>N</i>	<i>Cepa</i>	<i>Sexo</i>	<i>Edad</i>	<i>Protocolo</i>
Obtención de Orina I	26	C57	♂	8	Exp. de Pref. I
Obtención de Orina II	25	C57	♂	8	Exp. de Pref. II Exp. de Pref. III Exp. de Act. Neu.

Tabla 9: Tabla mostrando las características de los sujetos usados en la obtención de orina para los experimentos presentados en el apartado de Estudios de Preferencia de la Parte II sobre señales de enfermedad.

Para el procedimiento utilizado en ambos casos para la obtención de la orina de macho hicimos uso de la técnica de la micción libre (Watts, 1971). Así, colocándonos en una cabina de flujo laminar se sostiene al animal del que extraeremos la orina con una mano utilizando la piel de la parte dorsal y del cuello con el dedo índice y el dedo pulgar. Posteriormente, el animal será colocado sobre una placa Petri puesta sobre un papel de aluminio y este, a su vez, sobre papel de filtro (Ilustración 1).

La orina obtenida de los 25 machos usando esta técnica

Parte II: Estudios con el Modelo de LPS

se recolectó en tubos Eppendorf de 2 ml con una pipeta automática y conservado en hielo. Posteriormente, la orina de todos los animales fue centrifugada a 5000 rpm durante 5 minutos y alicuotada en tubos Eppendorf con un volumen final de 100µl cada uno.

Finalmente, la orina ya alicuotada fue conservada a -20°C.

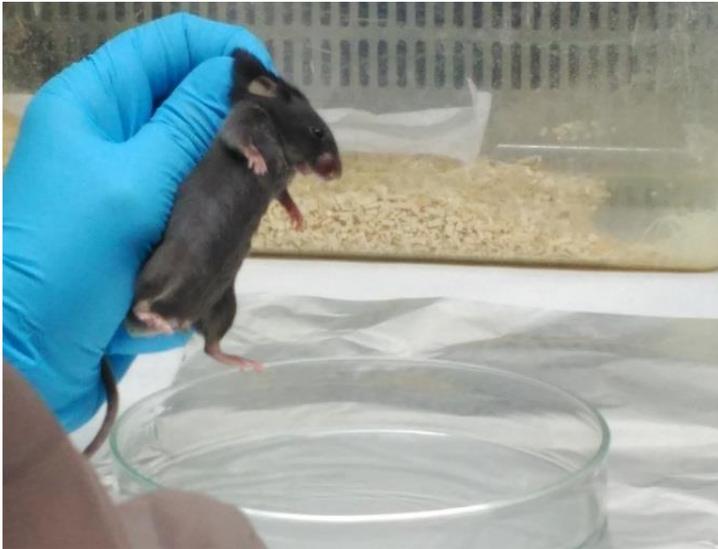


Figura 12: Ratón macho de la cepa C57 siendo manipulado para la obtención de orina con la técnica de la Micción Libre descrita.

Orina de Macho Enfermo

Para obtener el estímulo con señales de enfermedad utilizamos el modelo de Lipopolisacárido (LPS) utilizado en investigación de conducta de ratones por Boillat et al. (2015). Así, después de la recolección de la orina de ratón macho sin tratamiento, sobre los mismos machos aplicaremos una inyección de LPS de *Escherichia coli* 0111:B4 (Escherich, 1885) (Sigma.Aldrich ref. L2630) intraperitoneal de 0,1 mg/ml de LPS diluido en NaCl al 0,9%.

Pasadas cuatro horas después de la inyección, dejando tiempo para una activación suficiente de sistema inmune con síntomas similares a los de una infección bacteriana (Dantzer et al., 2008) y con los sujetos dando muestras claras de malestar, la orina fue recolectada siguiendo el mismo procedimiento de micción libre descrito en el apartado anterior. El procesamiento de la orina y su conservación también fue la misma.

Protocolo de preferencia

En el presente apartado explicaremos la metodología utilizada en los experimentos de orina realizados con la orina de *Mus musculus* descrita en el apartado anterior. Puesto que algunos de estos experimentos comparten procedimientos experimentales se ha dividido la sección en subapartados. Así, el primero de estos describirán las generalidades de los protocolos para, posteriormente, explicar las particularidades de cada uno.

Generalidades de los protocolos de preferencia con Orina

El tratamiento que fue realizado en los experimentos de preferencia con orina que vamos a presentar en este apartado fue el siguiente: primero, los distribuimos de forma aleatoria en tres cajas para su estabulación. Cada caja corresponderá a uno de los grupos experimentales y realizamos esta división una semana antes de la realización del protocolo para evitar estresores sociales que puedan afectar al comportamiento.

Posteriormente, en la semana de experimentación, se realizaron tres días de habituación. En estas, se le presentaba a los animales un estímulo neutro consistente en una solución salina (0,9%) en ambos lados de la caja de experimentación. Tanto la cantidad de estímulo neutro presentado como el tiempo de duración de la prueba serán iguales en la fase de habituación y en la siguiente fase de exposición.

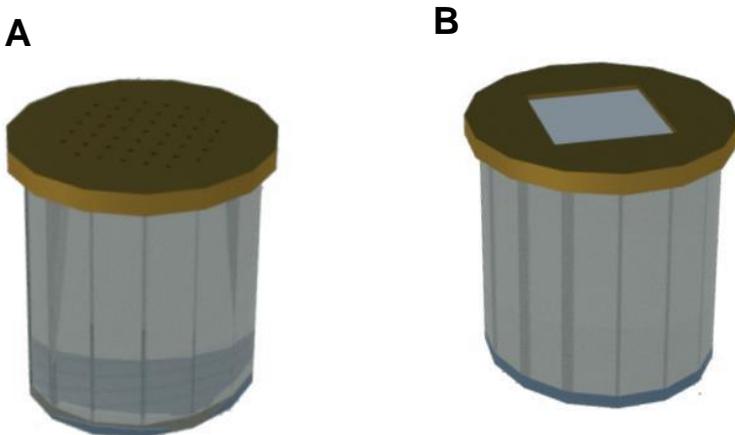


Figura 13: Diseño de los botes de cristal (4,5 cm de altura y 4,5 cm de diámetro) utilizados para los estudios de preferencia. (A) El modelo A fue usado el día de exposición a volátiles. Como podemos observar, se han dibujado pequeños agujeros en la tapa y se ha representado el papel de filtro usado como sustrato en la base dentro del bote. (B) El modelo B tiene un agujero en la tapa donde colocaremos el papel de filtro para facilitar el acceso de los animales de experimentación.

Finalmente, comenzará la fase de presentación de los estímulos de orina. Esta fase fue dividida en dos días: en el primero se restringió el contacto directo de los animales experimentales al estímulo, evitando así la acción del Bombeo Vomeronasal y permitiendo solo la detección de partículas volátiles por el sistema olfativo. El quinto día, finalmente, se les presento el estímulo de tal manera que tuvieran completo acceso al mismo, permitiendo el Bombeo Vomeronasal anteriormente y con esto la detección de feromonas que provocan. Estas feromonas, en la especie *Mus musculus*, son proteínas no volátiles que requieren del OVN y del Bombeo Vomeronasal para ser detectadas (Martinez-Ricós et al., 2008; Døving & Trotier, 1998). Para bloquear el acceso al estímulo modificamos la tapa de unos botes de cristal. En la condición de volátiles colocamos el papel en la base del bote y mediante unos agujeros en la tapa garantizamos el acceso del ratón a las moléculas volátiles mientras bloqueábamos el acceso directo al estímulo. Por otro lado, en el momento de presentar los estímulos involátiles la tapa presentaría una mayor abertura, donde pegaríamos el sustrato del estímulo (papel de filtro) mediante celo en la parte interna de la tapa del bote (Ilustración 2).

Todo este proceso queda ilustrado en la **Figura 14**:

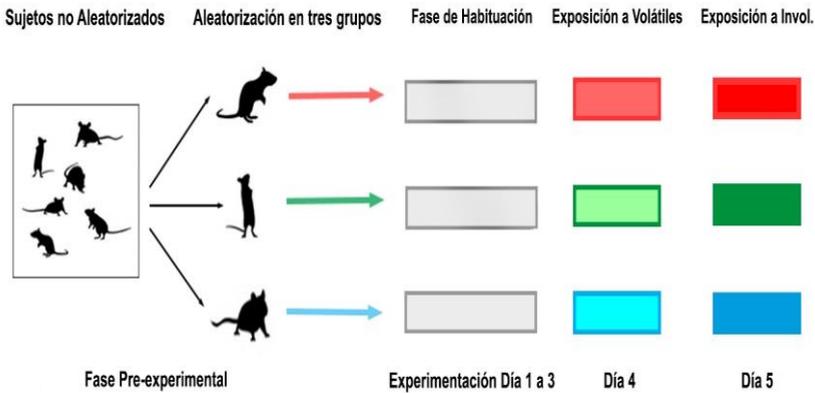


Figura 14: Ilustración del protocolo experimental realizado en los experimentos de preferencia de orina presentados en este apartado. En la parte superior de la figura se señalan las acciones realizadas según la línea temporal señala en la parte inferior. Cada línea de color marca una situación experimental: la línea roja señala los ratones hembra de la condición Orina de Hembra vs Orina de Macho Sano; La línea verde marca el grupo expuesto a Orina de Hembra vs Orina de Macho LPS; La línea azul señala el grupo expuesto a Orina de Macho Sano vs Orina de Macho LPS.

Los estímulos fueron distribuidos en la caja de experimentación de manera que cada uno de ellos resultara perfectamente accesible, pero en lados contrarios de la caja para forzar su elección. Así pues, cada grupo de animales de experimentación fue expuesto a dos de los estímulos de orina para explorar. Es decir, el primer grupo sería expuesto a Orina de Hembra en un lado contra Orina de Macho Sano; el segundo

grupo a Orina de Hembra contra Orina de Macho LPS; y el último grupo a Orina de Macho Sano frente a Orina de Macho LPS.

Experimento de Preferencia I

En el primer experimento que realizamos utilizamos una caja de metacrilato rectangular opaca con unas medidas de 250mm x 500mm x 300mm. En este caso, no había separación física entre los estímulos, es decir, no fue colocada ninguna barrera con puerta a la mitad de la caja.

La muestra de animales experimentales consistió en 30 ratones hembra de la cepa CD-1, como se puede observar en la tabla 1 presentada anteriormente. Siguiendo el protocolo descrito recientemente, en el momento de recibir los animales estos fueron estabulados en grupos de 10, correspondiendo con grupos experimentales del protocolo.

El estímulo consistió en 500 µl a una concentración 1:5 de Orina con Solución Salina (0,9%) los días de exposición a volátiles e involátiles. Los días de habituación, el estímulo colocado en el sustrato consistió en 500µl de Solución Salina (0,9%). La presentación de la Orina fue contrabalaceada durante los días de exposición, colocando cinco animales con

los estímulos en una posición y los cinco siguientes en la contraría (i.d., Orina de Macho Sano en el lado derecho frente a Orina de Hembra en el izquierdo los primeros cinco animales; Orina de Hembra en el lado derecho frente a Orina de Macho Sano los últimos cinco animales del grupo). La colocación de los animales en la caja experimental en el momento de la exposición también fue contrabalanceada, colocando los primeros cinco animales en un lado y los siguientes cinco en otro.

Finalmente, el tiempo de exposición en los ensayos tanto en la fase de habituación como en la fase experimental fue de 300s.

Experimento de Preferencia II

En este experimento utilizamos una caja experimental diferente a la del Experimento de Preferencia I. En este caso, las medidas de la caja de metacrilato de color negro fueron de 150mm x 895mm x 300mm. En este caso, tampoco fueron usadas puertas que marcaran o delimitaran las zonas dentro de la caja.

Como en el Experimento de Preferencia I, la muestra consistió en 30 sujetos hembra de la especie *Mus musculus* de

la cepa CD-1 y el estímulo de orina fue presentado en la misma proporción con solución salina y en la misma cantidad (i.e. 1:5 y 500µl respectivamente).

Finalmente, señalar que el tiempo de presentación del estímulo fue el mismo (300s) así como el procedimiento de colocación de botes y del animal de experimentación en la caja (i.e. con contrabalanceo).

Experimento de Preferencia III

En el último experimento con orina que vamos a presentar usamos la misma caja que en el Experimento de Preferencia I de metacrilato opaco con unas dimensiones de 250mm x 500mm x 300mm.

Los animales experimentales fueron 24 ratones hembras de la cepa C-57. El cambio de cepa fue motivado por un artículo en el que se mostraba la pérdida del gen para el Receptor de Peptidos Formilados 3 en algunas cepas de *Mus musculus*. Como es un receptor importante para la detección de señales de enfermedad decidimos optar por la cepa C-57 en la que el gen de este había sido confirmado (Stempel et al., 2016). Así, esta

cepa expresa dicho receptor y se han publicado artículos señalando un efecto negativo en la exploración de ratones C-57 ante la Orina de ratones tratados con LPS (e.g. Boillat et al., 2015).

Finalmente, la presentación de los estímulos presentó la misma dinámica que los anteriores experimentos respecto a la presentación de los estímulos y la posición de los ratones en la caja al inicio del ensayo. El tiempo por ensayo, por otro lado, fue ampliado 600s (10 min).

Experimento de Activación Neuronal

Muestra y Estabulación

La muestra consistió en 24 ratones hembra de 26 semanas de edad en el momento de empezar el experimento. Como podemos observar en la **Tabla I** estos animales fueron los mismos que fueron usados en el Experimento de Preferencia II y, por lo tanto, ya habían tenido experiencia con los estímulos presentados.

La estabulación se realizó dividiendo a las ratonas en tres cajas de ocho animales y las condiciones de estabulación fueron las descritas anteriormente para los estudios de Preferencia.

Protocolo de Experimentación

El protocolo para estudiar la activación neuronal ante estímulos de orina LPS consistió en dos fases: la Fase de Habitación y la Fase de Exposición y Perfusión. La finalidad de la Fase de Habitación fue la eliminación de la expresión de proteína c-Fos indeseada el día de la experimentación por la sobreestimulación que pudiera provocar la novedad, habituando así a los animales experimentales a los aspectos menos relevantes del experimento. Así, durante los tres días anteriores a la fase de exposición los experimentadores colocaban a las ratonas individualmente en cajas de metacrilato opaco (250mm x 500mm x 300mm). Cada ensayo experimental tuvo una duración de 300s (5 min). En el centro de la caja colocábamos un bote en cuya tapa se había dispuesto un agujero en el centro en el que se colocaba un papel de filtro (40mm x 40mm) que haría de sustrato para la colocación del estímulo. En el caso de la habitación, en todos los grupos el papel era empapado con 250 µl de solución salina a una concentración del 0,9%. Un ejemplo de cómo fue dispuesto todo en la situación experimental lo encontramos en la Ilustración 3.

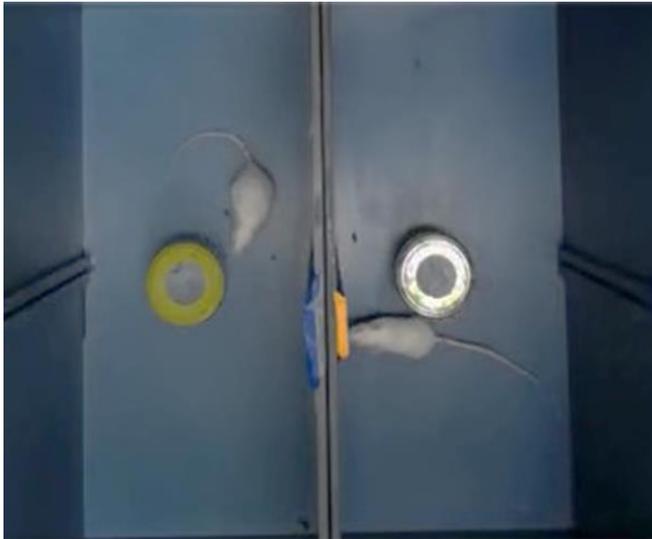


Figura 15: Ejemplo de test de conducta en el experimento de Activación Neuronal. Podemos observar que a los animales experimentales les ha sido facilitado el acceso al estímulo posicionándolo en el centro. La imagen ha sido extraída de una grabación de un día control.

El tercer día del procedimiento era dedicado a la exposición de las ratonas al estímulo correspondiente. En el caso de los sujetos del grupo Control este consistió en 250 μ l de Solución Salina (0,9%), al igual que en la Fase de Habitación. En el caso de los animales expuestos a Orina de Macho Sano y a Orina de Macho LPS el papel de filtro fue empapado con 250 μ l de orina. La orina no fue diluida en esta ocasión para asegurar la efectividad del estímulo para provocar activación neuronal.

Parte II: Estudios con el Modelo de LPS

Posteriormente a esta fase de exposición, a los 90 minutos de la misma, fue realizada la perfusión del animal y la extracción del encéfalo. La elección de esta franja de tiempo se hizo teniendo en cuenta el pico de expresión de proteína c-Fos en las neuronas del encéfalo (Sng et al., 2004; Herdegen & Leah, 1998; Kovács, 2008).

Las cajas donde se realizaba las fases de habituación y experimentación eran minuciosamente limpiadas primero con alcohol de 70° y por último con agua destilada después de la exposición de cada ratona. Así, se evitaba que olores extraños a los deseados afectaran la conducta de las ratonas. Además de ello, puesto que los ratones son una especie fácilmente estresante por el ruido ambiente, todas las fases experimentales se realizaron en una habitación libre de ruido.

Todo este proceso queda ilustrado en la **Figura 16**:

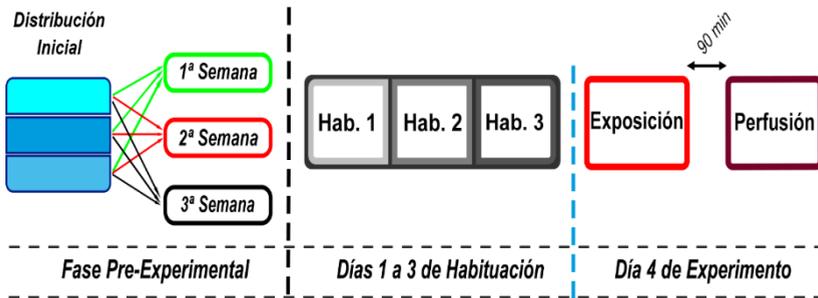


Figura 16: Ilustración del protocolo en el que se exponen los pasos de experimentación realizados. Primero, los animales estaban agrupados en tres cajas con ocho ratonas cada una; Segundo, cada semana de experimentación fueron escogidos dos ratones de cada caja inicial y fueron guardados en otra caja (representado en la imagen por los recuadros coloreados de verde, rojo y negro) durante toda la semana de experimentación; Tercero, la experimentación fue dividida en dos fases: tres días de habituación y uno de experimentación; Cuarto, el día de experimentación fue realizada la Exposición a los estímulos de orina (i.e., Macho Sano, Macho LPS y Control) y a los 90 minutos de la misma fue realizada la Perfusión de los animales de experimentación.

Perfusión y Conservación del tejido

Después de la exposición a los estímulos los animales fueron sacrificados mediante una dosis eutanásica de Pentobarbital Sódico (92 mg/Kg de peso del animal) diluido en una solución de etanol (20ml de Etanol, 8ml etilenglicol y 72ml agua destilada) de 0,012 ml/g administrada mediante inyección intraperitoneal.

Parte II: Estudios con el Modelo de LPS

El procedimiento de perfusión de los animales fue realizado en una campana extractora de fases. Para la limpieza de los vasos sanguíneos se utilizó entre 20 y 40ml de Solución Salina (0,9%). Esta solución fue inyectada en el sistema circulatorio del animal mientras este estaba profundamente anestesiado aguja colocada en el ventrículo izquierdo del corazón. La solución fue impulsada dentro del animal por una bomba de inyección de jeringa. Posteriormente, para la fijación del encéfalo, fueron utilizados 80ml de Paraformaldehído (PFA) al 4% en todos los animales.

Una vez acabada la perfusión el encéfalo era extraído del cráneo y dejado en postfijación por un periodo de 4 horas en un vial con PFA (4%) a una temperatura de 4°C. Al finalizar el periodo de postfijación el encéfalo era colocado en una Solución de Sacarosa (30%) como crioprotección hasta que se observaba que estaban hundidos, momento en el que pudieron de ser cortados.

Preparación Histológica: detección inmunohistoquímica de la proteína c-Fos:

Los cortes de los encéfalos fueron realizados en un microtomo de congelación de usando Solución de Sacarosa (30%) como crioprotector. Los cortes fueron realizados en un plano coronal (frontal) con un grosor de 40µm. Los Bulbos Olfativos (BO) también fueron cortados en este plano y previamente a la realización de los cortes la parte posterior del encéfalo (a partir de mitad del cerebelo) fue seccionada ya que no era necesaria para los objetivos de este protocolo.

Los cortes de cada encéfalo fueron colocados en Eppendorf en una solución de Sacarosa (30%) para crioprotegerlos. Finalmente fueron almacenados en un congelador a -20C^o hasta el día en que se realizó la inmunohistoquímica.

El procedimiento de marcaje de la proteína c-Fos fue realizado como sigue:

1. Se sometió a los cortes a una solución de Tampón Tris salino (TBS) con un 3% de Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂;

Panreac) para reducir la actividad de las peroxidasas endógenas durante 15 minutos a temperatura ambiente.

2. Posteriormente se realizó una preincubación con suero de la misma especie de animal donde se ha desarrollado el anticuerpo secundario: en este caso en cabra (*Normal Goat Serum*, NGS). La proporción de los componentes de la solución fue la siguiente: 3% de Normal Goat Serum (NGS) + 0,3 % de Triton X-100 en TBS. Los cortes se mantuvieron en esta durante una hora a temperatura ambiente.
3. El siguiente paso consistió en la incubación de los cortes con el anticuerpo primario Rabbit-anti-Fos (Santa Cruz Laboratories, Santa Cruz, CA, USA) a una dilución de 1:500. En esta misma incubación se añadió un 0,3% Triton X-100 y 2% de NGS en TBS. Se mantuvieron los cortes alrededor de 48 horas con una temperatura de 4 °C.
4. Finalizado el periodo de incubación del primario, y tras lavar los cortes en TBS, se inició la incubación de los cortes en el anticuerpo secundario Goat-anti-Rabbit marcado con biotina (Vector Laboratories) a una dilución

1:200 con 0,3% de Triton X-100 y un 3% de NGS en TBS.

El periodo de incubación se realizó a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo de 2 horas.

5. Después de lavar el anticuerpo secundario se incubaron los cortes en una solución con el complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (Vectastain ABC kit, Vector Labs, PK-6100, Burlingame, CA, USA) con la proporción indicada por el laboratorio fabricante (2 gotas del complejo A más 2 gotas complejo B por cada 5 ml de TBS) junto con un 0,3% de Triton X-100. La incubación fue realizada a temperatura ambiente y durante un periodo de tiempo de 90 minutos.
6. Finalmente se realizó el revelado mediante Diaminobencidina (DAB) al 0,025% y 0,01% de H₂O₂ en Tampón Tris dejando los cortes durante un tiempo comprendido entre 15/20 minutos dependiendo de la valoración que se hizo sobre el desarrollo del marcaje de la proteína objetivo.
7. Entre cada incubación fueron realizados tres lavados de TBS durante 5 minutos cada uno excepto durante la preincubación y la incubación del anticuerpo secundario.

Parte II: Estudios con el Modelo de LPS

Así, después de realizar la incubación del complejo ABC en los cortes y antes del revelado con DAB se realizaron lavados con TB.

Finalmente, los cortes fueron almacenados en viales en TB hasta el momento de su colocación en placas de vidrio. La colocación de los cortes fue realizada en portas con una disolución con un 0,2 % de gelatina (VWM, Prolabo Chemicals, Leuven Belgium), Azida Sódica y TB. Una vez montados en portaobjetos, se procedió a la deshidratación de los cortes mediante el uso de alcoholes y Xilol y se cubrieron utilizando la resina Entellan para su conservación.

Fase	Reactivo	Tiempo
<i>Lavado de Cortes en TBS</i>		
Reducción Peroxidasas	H ₂ O ₂	15 min
<i>Lavado de Cortes en TBS</i>		
Preincubación	NGS + Triton X-100	60 min
Incubación Anticuerpo I	Rabbit-anti-Fos (1:500)	48 horas
<i>Lavado de Cortes en TBS</i>		
Incubación Anticuerpo II	Goat-anti-Rabbit (1:200)	120 min
<i>Lavado de Cortes en TBS</i>		
Incubación Complejo ABC	Avidina-Biotina-Peroxidasa	90 min
<i>Lavado de Cortes en TB</i>		
Revelado	DAB (0,025%) + TB	10-15 min
<i>Lavado de Cortes en TB</i>		

Tabla 10: Resumen del procedimiento de inmunohistoquímica seguido para el revelado de la proteína c-Fos.

Análisis de los resultados: Conducta y Marcaje de la proteína c-Fos

La variable dependiente en la parte conductual de este protocolo fue evaluada de forma manual por un investigador ciego a las hipótesis del estudio y sin conocimientos de los grupos experimentales que estaba evaluando. Para asegurar el desconocimiento de a qué grupo experimental pertenecía cada ratón (i.e., que estímulo fue presentado en cada ensayo) se

elaboró un código aleatorio asignado a cada ratón cuya correspondencia con el código experimental solo conocía el investigador principal. Así, se recopiló en segundos el tiempo que cada animal pasaba en un radio de 5cm alrededor del centro del estímulo. Para la adquisición de esta variable fue utilizado una de las herramientas del programa *Smart 3.0* (Panlab Harvard Apparatus, Barcelona, Spain), que facilita el visionado del video mientras se recopila el tiempo en que el animal realiza una serie de variables conductuales previamente configuradas por el investigador.

Respecto a la activación neuronal medida con un marcador de la proteína c-Fos en los cortes de los encéfalos de los sujetos experimentales, esta fue medida usando el programa *ImageJ 1,51 K*. Las fotografías para el conteo del marcaje fueron realizadas mediante una cámara *Olympus XC50* integrada en un microscopio óptico *Olympus CX41RF-5*. Las capturas fueron realizadas con un aumento de 10x y siempre con la misma intensidad de Luz. Para guiarnos por las estructuras del encéfalo usamos el atlas estereotáxico de Paxinos y Franklin (2001),

situándonos en las coordenadas de Bregma expuestas en la tabla siguiente:

Estructura	Bregma
MePD	- 1,46 mm
MePV	- 1,46 mm
VMH	- 1,46 mm
AOB	3,56 mm

Tabla 11: Altura en el eje antero-posterior escogida para el análisis del marcaje para los núcleos Posteromedial Dorsal (MePD) y Ventral (MePV) de la Amígdala; para el Hipotálamo Ventromedial (VMH); y para el Bulbo Olfativo Accesorio (AOB).

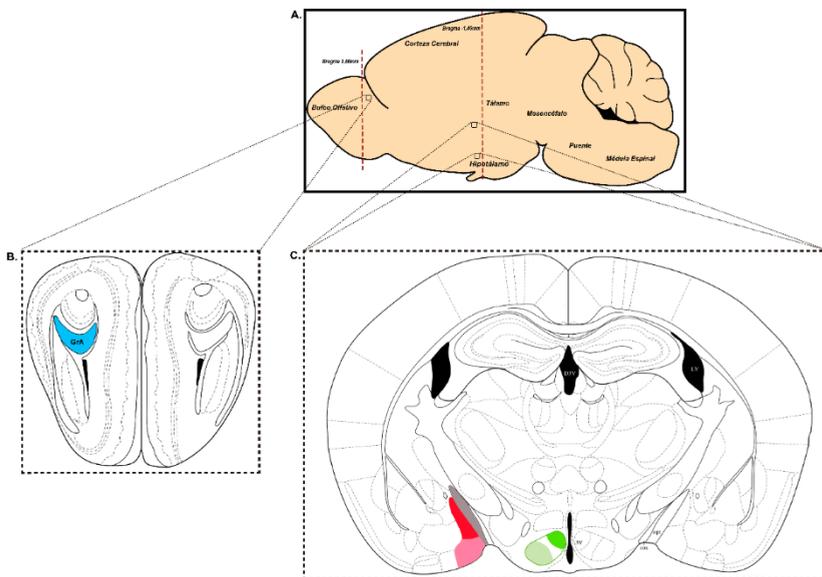


Figura 17: Representación de la posición espacial de los núcleos donde fue examinado el marcaje. A: Ilustración de un corte sagital de un encéfalo de ratón, donde se indican algunas estructuras. Las líneas rojas discontinuas indican la altura según las coordenadas de Bregma donde se han analizado las estructuras; B: Representación de la zona de los Bulbos Olfativos estudiada. En azul la capa de células granulares; C: Representación de los núcleos de la amígdala (MePD= rojo oscuro; MePV= rojo claro), el tracto óptico (gris) y los núcleos del hipotálamo (VMH-VL= verde oscuro; VMH-DM= verde intenso). Modificado de Paxinos y Franklin (2001).

Para analizar las imágenes con el *ImageJ 1, 51 K* estas fueron tratadas de la siguiente forma: primero se convirtieron a escala de grises (8-bit); por último, se ajustó el umbral de binarización al 80% de la moda y se binarizaron las imágenes en blanco y negro. En la siguiente imagen se ilustra el proceso:

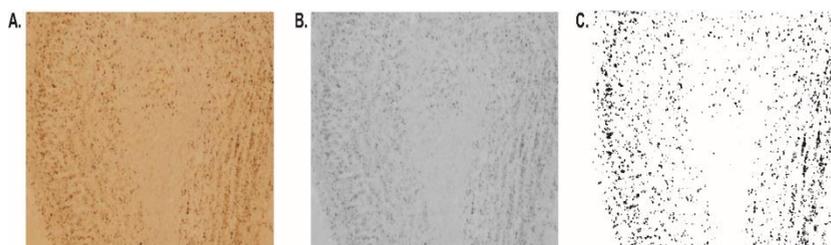


Figura 18: Procesamiento de imagen de los cortes realizado mediante el programa *ImageJ 1, 51 K*. A: imagen original extraída con el microscopio *Olympus CX41RF-5*; B: transformación de la imagen original a 8-bit; C: binarización en blanco en negro para su posterior análisis.

Finalmente, una vez tratadas las imágenes se realizaron los análisis en un área de $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$ en el núcleo objetivo. Para el análisis automático, solo fueron contabilizadas como neuronas aquellas marcas que poseían un tamaño igual o mayor a 40 píxeles.

Metodología de los Estudios con Viruta Experimento de Viruta I: Viruta vs Orina

Animales y Estabulación

La muestra consistió en 24 especímenes hembra *Mus musculus* de la cepa C-57 de 26 semanas de edad. Estos animales fueron reutilizados del Experimento de Preferencia III anteriormente descrito, por lo que no eran *naïve* a los estímulos presentados. Sin embargo, presentaban un buen estado de salud y aún se encontraban en periodo reproductivo, por lo que se supone su receptividad a estímulos sexuales como los estudiados en este capítulo.

Los animales fueron estabulados en las mismas condiciones descritas anteriormente para los estudios de preferencia. Sin embargo, en este caso, fueron separados en cuatro cajas preconfigurando los futuros grupos experimentales de seis ratones hembra cada una. Dos de esas cajas pertenecían a ratonas que serían expuestas a viruta sucia de macho sano y las otras dos a orina de macho sano. Finalmente, a una de las cajas de los sujetos que iban a ser expuestos a orina y a otra de los que iban a exponerse a viruta se colocó un bote de cristal abierto con unos 15g de viruta de ratón macho

sano C-57 sexualmente activo estabulado individualmente. La finalidad detrás de la colocación de la viruta de macho fue la comprobación del hecho que resaltaban algunos artículos publicados de la importancia de las fases del ciclo estral para la detección de las PUPs, siendo máxima en Estro y mínimo en diestro (Dey et al., 2015; Baum et al., 2018; Kunkhyen et al., 2018)

Esto se hizo así para, aprovechando el efecto Whitten, iniciar y sincronizar los ciclos estrales de los sujetos experimentales de dichas cajas. Este método ha sido utilizado por el equipo de Hurst (Roberts et al., 2010) con una alta probabilidad de éxito para realizar estudios de atracción a feromonas de ratón macho. Finalmente, el estímulo fue colocado aproximadamente 72 horas antes del día en que se realizó la exposición al estímulo.

Estímulos

Orina

Tanto la Orina de Hembra como la Orina de Macho Sano que han sido utilizadas en este experimento proceden de la misma fuente que la usada en el experimento de preferencia III. I.e., la Orina de Hembra de los laboratorios Javier de ratones hembra de la cepa C57B/6JR y la Orina de Macho de la segunda tanda de extracción de Orina (véase tabla II)

Viruta

En el caso del estímulo de viruta sucia, la viruta de Macho Sano fue obtenida de donantes machos de la cepa C57B/6JR sexualmente activos y estabulados durante al menos una semana en cajas individuales. Así, juntamos en un mismo conjunto la viruta sucia de cuatro ratones machos con las características anteriormente descritas y las utilizamos tanto para la fase de exposición del procedimiento de conducta como para iniciar sobre los sujetos experimentales correspondientes el efecto Whitten anteriormente descrito.

Finalmente, la viruta de hembra fue obtenida de ratones hembra de la cepa C57B/6JR estabulados en grupos de al

menos seis ratones. Toda la viruta acumulada fue mezclada en un mismo conjunto y utilizada posteriormente una muestra del mismo en el procedimiento.

Protocolo de Experimentación

La prueba de preferencia fue realizada en una caja de metacrilato opaco con dimensiones de 250mm x 500mm x 300mm. Los sujetos experimentales fueron colocados en un lado de la caja en concreto siendo este el lado contrario al estímulo de Macho (bien sea Orina de Macho o Viruta de Macho) el día de la exposición. Para evitar posibles sesgos por la ubicación espacial del sujeto o de los estímulos la mitad de los animales y los estímulos de macho estuvieron colocados en el lado contrario para hacer de contrabalanceo. Por otro lado, el estímulo fue presentado en un bote de cristal de 45mm de diámetro y 45mm de altura similar al usado en los experimentos de preferencia explicados anteriormente. Todos los sujetos tuvieron acceso completo al estímulo, *id est*, a los componentes tanto volátiles como no volátiles.

El procedimiento puede dividirse en tres fases bien diferenciadas: la fase Pre-Experimental o de estabulación previa

al procedimiento; la fase de Habitación; y la fase de Exposición.

Un esquema visual del procedimiento lo podemos encontrar en

la **Figura 19**.

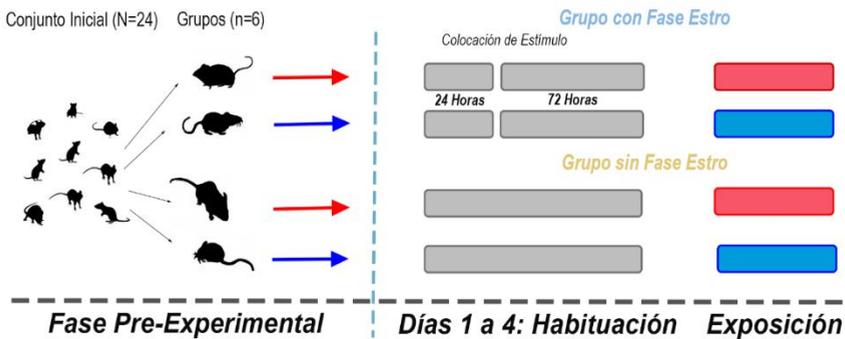


Figura 19: Ilustración del protocolo experimental seguido en el experimento de Viruta I. Fase Pre-Experimental: seleccionamos al menos una semana antes a las ratonas que formaran los cuatro grupos experimentales. Las flechas representan el tipo de estímulo, rojo para los grupos que fueron expuestos a viruta y azul los que fueron expuestos a Orina; Fase Experimental: dividida en la fase de habituación y exposición. Durante la fase de habituación fue colocada la viruta de macho C-57 en las cajas de los grupos con Fase Estro.

La fase de estabulación ya ha sido explicada anteriormente. Por su lado, la fase de habituación duró 4 días, el primero de los cuales fue dedicado al manejo de los animales experimentales por parte del experimentador con el fin de reducir la ansiedad de estos por el manejo (Gouveia & Hurst, 2010). El segundo día fue presentada la situación experimental colocando los animales en las cajas de experimentación con los estímulos

neutros correspondientes. Esto es: por un lado, 40µl de Solución Salina (0,9%) y, por otro, aproximadamente 20g de Viruta Limpia con las mismas características que la utilizada por los donantes de los estímulos. Las sesiones en la fase de habituación duraron 600s (10min), la misma cantidad de tiempo que durante la fase de experimentación. Este mismo día tuvo lugar la colocación dentro de las cajas de estabulación correspondiente del estímulo de macho para iniciar el ciclo estral de los ratones hembra. Las sesiones de habituación se repitieron hasta tres veces de manera consecutiva.

Finalmente, la Fase de Exposición fue realizada el último día. En esta fueron presentados los estímulos propiamente dichos, enfrentado así Orina de Hembra contra Orina de Macho o Viruta de Hembra contra Viruta de Macho según el grupo de animales.

Realización del Frotis Vaginal

Posteriormente a la fase experimental, unas cuatro horas después de la exposición al estímulo, fue realizado un frotis vaginal para determinar la fase en del ciclo estral en el que se encontraban los sujetos experimentales. Para ello fue realizado

un lavado vaginal siguiendo el procedimiento publicado por McLean (et al., 2012).

Así, mediante una pipeta esterilizada acercada a la cavidad vaginal de los animales fue introducido de forma no invasiva. Esto fue conseguido al depositar de forma superficial unos 100µl de agua destilada sobre la cavidad vaginal, esperar a que esta fuese succionada por el animal para, al ser expulsada, reabsorber con la pipeta.

Una vez con la muestra en la pipeta fue depositada sobre un portaobjetos etiquetado con el código del animal y dejada secar de tal manera que no pudiera ser contaminada. Una vez la muestra se encuentra deshidratada fue realizada una tinción con Hematoxilina de Gill y Colorante de Eosina acuosa (1%) para su posterior evaluación mediante el microscopio.

Para complementar el análisis de los frotis vaginales también fueron tomadas fotos de las cavidades vaginales de los animales experimentales. Para su evaluación fue usada como guía el artículo de Byers et al. (2012), donde explican como identificar visualmente las características que presentan los genitales de ratones hembra de varias cepas.

Experimento de Viruta II: Darcina vs Péptidos Formilados

Animales

Para este estudio 16 ratones hembra de la cepa C57 de la casa Janvier fueron utilizadas. En el momento del estudio los animales contaban con 8 semanas de edad, es decir, eran sexualmente maduras y por lo tanto receptivas a estímulos sexuales.

Fueron estabulados en el animalario de Burjassot y su mantenimiento fue llevado a cabo por el personal cualificado de la instalación siguiendo la Directiva 2010/63/UE de la Unión Europea y el Real Decreto 53/2013 de la legislación española. El agua y el alimento fue administrado *ad libitum*, con una temperatura en torno a los 22°C.

Finalmente, comentar que los animales de experimentación fueron estabulados en grupos de cuatro, cada grupo en una caja diferente. Dos de estos grupos pertenecerán al grupo experimental D/PF y los otros dos a el grupo PF/D.

Estímulos

En este experimento, con el fin de comprobar la efectividad de PUP20 (también denominada, como hemos comentado antes, Darcina) como estímulo atrayente como describe la literatura (Roberts et al., 2010; Roberts et al., 2012) así como de los PF como activadores de conducta de evitación dada su relación con el sistema vomeronasal ya comentado (Rivière et al., 2009).

Darcina

En este procedimiento fue utilizada PUP20 recombinante (13,4mg/ml) diluido 1:2 en PB. Fue obtenida por encargo al laboratorio de Hurts en la Universidad de Liverpool ya que fueron ellos quienes la identificaron como feromona (Roberts et al., 2010). Una vez recibido en el laboratorio fue alicuotado en Eppendorf y conservado en un congelador a -20 hasta su uso.

Péptidos Formilados

Fue usado un tripéptido compuesto por f-Met-Leu-Phe (Sigma-Aldrich) con la intención de obtener una respuesta aversiva o de evitación en los sujetos experimentales. Como

señalábamos antes, Rivière et al. (2009) mostraron la presencia de receptores de PF en el OV de la especie *Mus musculus*. Por lo tanto, estos receptores han sido propuestos como mediadores de las respuestas de evitación encontrados en la literatura sobre señales de enfermedad. En este procedimiento los PF fueron diluidos a una concentración de 9µM en PBS 0,01M.

Protocolo de Preferencia

El protocolo de experimentación fue llevado a cabo en una caja de metacrilato opaco con unas dimensiones 250mm x 500mm x 300mm. Los estímulos fueron colocados cada uno en un extremo de la caja sobre una Placa Petri de 80mm de diámetro. La presentación del estímulo consistió en colocar 2,5g de viruta limpia (facilitada por el animalario siendo esta la misma que le proporcionaban los animales para la estabulación) con 10µl del estímulo correspondiente en el medio rodeado por la viruta. La intención de presentar el estímulo rodeado de viruta fue facilitar la exploración del mismo al proporcionar un elemento más cercano a lo que el animal experimental podría encontrar en un entorno natural.

Podemos dividir el protocolo experimental en dos partes: la Fase Pre-Experimental y la Fase Experimental. La Fase Pre-Experimental consistió en todo el procedimiento seguido durante la estabulación de los animales ya explicado con anterioridad. No se realizó ninguna otra intervención aparte.

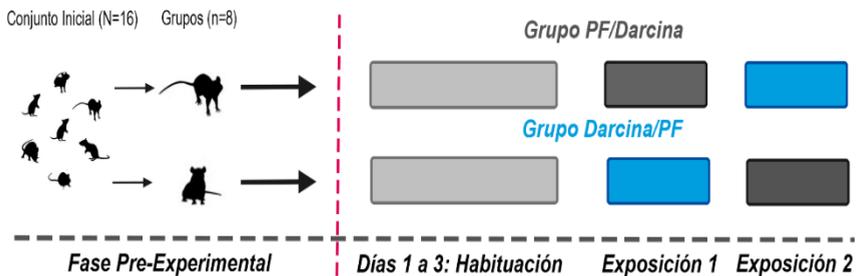


Figura 20: Representación gráfica del procedimiento experimental realizado. En la Fase Pre-Experimental, realizada una semana antes, los sujetos experimentales fueron divididos en dos grupos experimentales. La diferencia entre ambos grupos fue el orden de presentación de los estímulos los días de Exposición 1 y 2. Como se puede observar, fueron realizados tres días de habituación y dos de exposición, variando el orden de presentación a PUP20 (Darcina) o a los Péptidos Formilados.

La Fase Experimental consistió en tres días de habituación al experimentador, al contexto del experimento y a la situación experimental en si misma (i.e., caja de experimentación, condiciones ambientales como temperatura y luminosidad, disposición y presentación de los estímulos, duración del

procedimiento, etc.). El estímulo utilizado consistió en 10 μ l de Solución Salina (0,9%) en el centro de una Placa Petri rodeada por aproximadamente 2,5g de viruta limpia. Se colocaron dos Placas Petri, cada una a un lado de la caja, con la finalidad de cuantificar la cantidad de tiempo que pasaba en cada lado. En el medio de la caja fue colocado una barrera de metacrilato transparente, abierta para facilitar el acceso del animal, que delimitaba ambos lados de la misma.

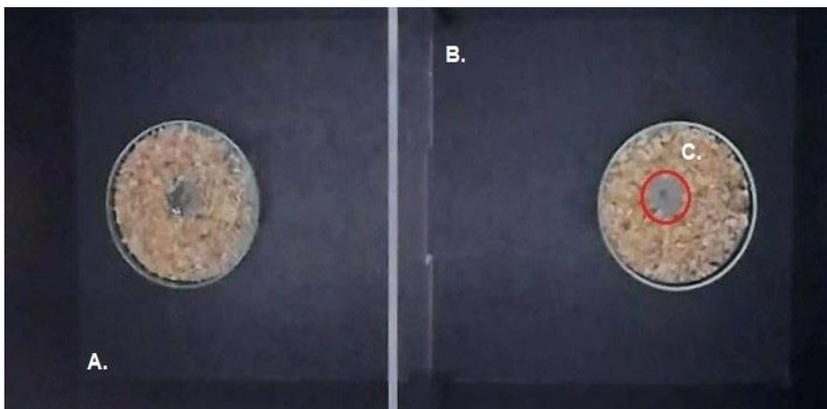


Figura 21: Ilustración de la situación experimental en la que se muestran: A: el lugar de colocación inicial del sujeto, al lado contrario del estímulo deseado y realizando un contrabalanceo en la mitad de la muestra; B: barrera de metacrilato transparente con acceso abierto para delimitar ambos lados de la caja; C: presentación del estímulo, con 10 μ l del estímulo correspondiente rodeado de 2,5g de viruta limpia en una Placa Petri.

Por otro lado, la fase de experimentación consistió en dos días en los que fueron presentados los estímulos a todos los animales del experimento. Fueron colocados en cada ensayo un estímulo neutro en un lado y en el contrario el estímulo experimental correspondiente. Dependiendo del grupo al que pertenecían vario el día de presentación de la D o de los PF, como se puede observar en la Ilustración 7. Los estímulos fueron presentados de igual manera a la presentación del estímulo neutro, con la diferencia de que en esta ocasión fue presentado 10µl de D o PF, según correspondiese.

Finalmente, las sesiones tuvieron en todos los ensayos (i.e., tanto en los tres ensayos de habituación como en los dos de exposición) una duración de 300s (5min). Para evitar sesgos se realizaron varios contrabalanceos: la mitad de la muestra tuvo el estímulo en un lado de la caja y la otra mitad en el contrario; se hizo lo mismo con la posición de inicio de los animales en los ensayos; cada cuatro ratones fue cambiado el estímulo que era presentado (e. g.: los primeros cuatro D, los siguientes cuatro PF, los siguientes cuatro D y los últimos cuatro PF; viceversa en la sesión de exposición del día siguiente). Este último

contrabalanceo tenía como objetivo evitar un efecto del momento de presentación respecto del ciclo de actividad.

Experimento de Viruta III: Animal Tratado con LPS I

Sujetos y Estabulación

La muestra consistió en 10 ratones hembra de la cepa CD-1 Swiss en etapa de madurez sexual. Su estabulación fue realizada en las instalaciones del animalario de la Universidad de Valencia en el campus de Burjasot y el mantenimiento de las mismas fue llevado a cabo por su equipo. La temperatura ambiente se situaba en torno a 22°C y el alimento y la hidratación fue administrada *ab libitum*.

Finalmente, fueron estabuladas en cajas de cinco animales, preconfigurando los grupos experimentales del protocolo que fue llevado a cabo posteriormente. Además de esta situación no fue realizado sobre los animales ningún tratamiento más.

Estímulos

Fue utilizada viruta sucia de macho *Mus musculus* de la cepa C57BL/6. Los animales se encontraban estabulados en cajas individuales. Para llevar a cabo el procedimiento se recogieron dos tipos viruta derivados de machos sin enfermedad o de machos que habían recibido una inyección de LPS para iniciar una respuesta inmune.

En el caso de la viruta de macho sano, el donante estuvo tres días en la caja estabulado con bebida y comida *ad libitum* y en condiciones ambientales adecuadas hasta el momento de la recogida del estímulo. Por otro lado, en el caso de la viruta de macho LPS, los donantes estuvieron estabulados con las mismas condiciones que los anteriormente descritos con la diferencia que el día de la recogida se le fue realizada una inyección intraperitoneal de LPS. El sujeto fue sacrificado seis horas después y la viruta recogida.

Estos animales pertenecían a otro procedimiento experimental y los procesos de tratamiento realizados sobre ellos fueron avalados por el comité de ética para el experimento correspondiente.

Protocolo de Preferencia

La caja donde fueron realizados los ensayos consistió, como en anteriores experimentos, en una caja de metacrilato opaco de dimensiones 250x500x300mm. La presentación de los estímulos fue desarrollada sobre una Placa Petri en la que se depositaron alrededor de 10g de viruta (*i.e.*, limpia, ensuciada por machos sin tratamiento o con tratamiento LPS). La Placa Petri con el estímulo fue colocada en la zona central de cada lado de la caja de experimentación. Finalmente, para facilitar la distinción entre los dos lados de la caja fue colocada una barrera de metacrilato transparente con acceso abierto. La disposición de los elementos anteriormente descritos queda ilustrada en la **Figura 22**.

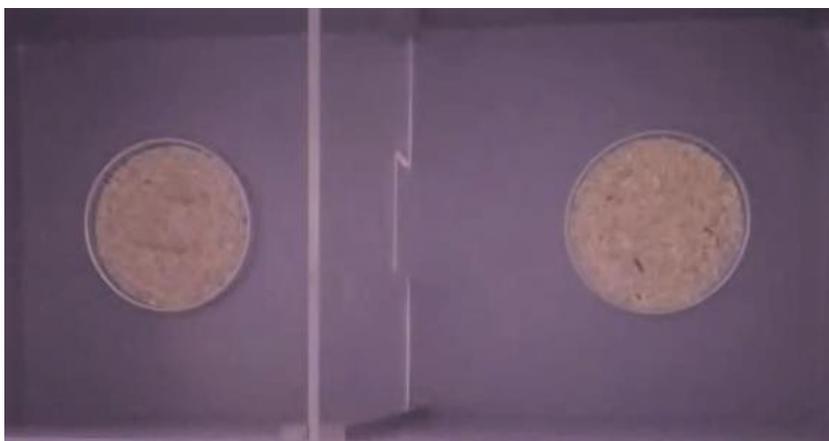


Figura 22: captura de la grabación de una de las sesiones experimentales.

El protocolo experimental fue realizado durante cuatro días consecutivos. Una semana antes, en la que podríamos denominar Fase Pre-Experimental, los sujetos fueron divididos en dos cajas de cinco para que se habituaran previamente al grupo social.

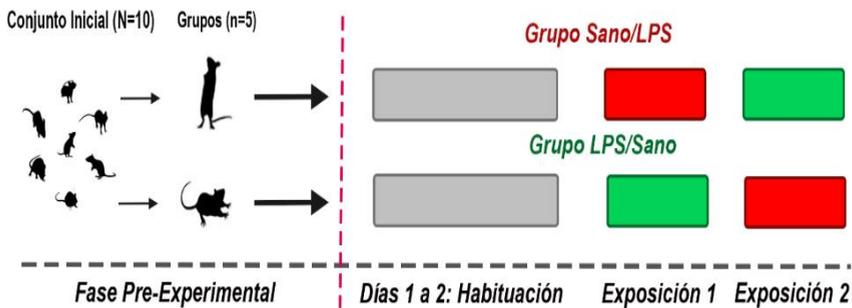


Figura 23: Ilustración gráfica del protocolo experimental. Los sujetos experimentales fueron divididos en dos grupos de cinco sujetos correspondiendo cada caja con un grupo experimental. En la Fase Experimental del procedimiento fueron realizados dos días de habituación y dos de exposición, alternando según el grupo el día de presentación a viruta de macho sano o a viruta de macho tratado con LPS. El objetivo final es que todos los animales realizasen un test con ambos tipos de estímulos.

La Fase Experimental fue dividida en dos: Habituación y Exposición. La habituación se repitió durante dos días consecutivos. En esta fase fue realizado el protocolo de experimentación como este iba a ser realizado en la posterior fase de presentación de los estímulos. La finalidad fue la

eliminación del estrés que podría crear la situación y el manejo de los animales por el experimentador. El estímulo neutro consistió en viruta limpia del mismo tipo que la manchada en los estímulos experimentales.

Finalmente, los dos días de exposición se presentaron los dos estímulos a todos los animales. Así, el primer día fue presentado a la mitad de la muestra Viruta Manchada de macho normal sin tratar frente a viruta limpia y a la otra mitad le fue presentado Viruta Manchada de Macho tratado con LPS. Al día siguiente fue invertida la presentación de los estímulos respecto de los animales. Este contrabalanceo fue realizado para evitar un efecto del día de experimentación en los resultados de la conducta. A parte de este contrabalanceo, otros fueron realizados (véase experimentos anteriores). Todo este proceso queda ilustrado en la **Figura 23**.

Finalmente, comentar que la duración de los ensayos fue de 600s (10min).

Exprmt. de Viruta IV: Animal Tratado con LPS II

Sujetos y Estabulación

Los sujetos experimentales fueron reutilizados de un experimento anterior. Consistieron en 14 especímenes *Mus musculus* (seis hembras y 8 machos) estabulados en el animalario del campus de Burjasot de la Universidad de Valencia.

Estímulos

En este experimento, los estímulos consisten en viruta manchada de 12 ratones macho de la cepa CD-1. Estos machos estaban estabulados en dos cajas de media docena de animales cada una. Así, seis de estos machos se mantuvieron sin tratar y con condiciones de estabulación óptimas. Los otros seis, por otro lado, fueron tratados al menos 12 horas antes de recoger la viruta sucia con LPS (1mg/kg; 0,2mg/ml en NaCl al 9%).

Esta viruta fue conservada en un congelador a -20°C hasta tres horas antes de su uso en el protocolo experimental. En el momento de la experimentación fueron depositados en botes de

cristal de 4,5cm de altura y 4,5cm de diámetro aproximadamente 8g de esta viruta como estímulo experimental.

Protocolo de Preferencia

Para este experimento fue utilizada una caja de experimentación de metacrilato opaco de dimensiones 250x500x300mm. Dentro de la situación experimental fueron colocados los botes anteriormente mencionados cada uno en un extremo de la caja, uno con estímulo experimental (viruta manchada) y otra con estímulo neutro (viruta limpia). Estos estímulos fueron contrabalanceados cambian en la mitad de la muestra su ubicación por el lado contrario para evitar posibles sesgos.

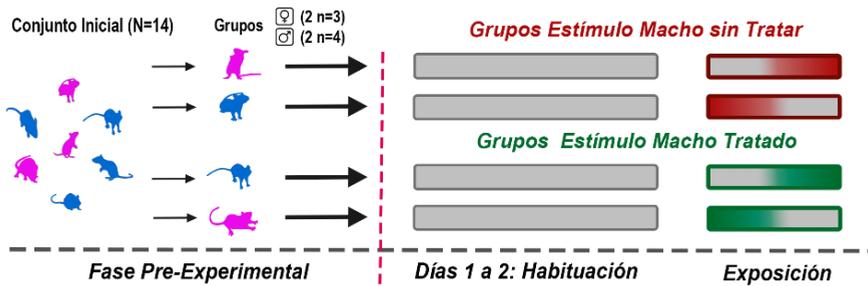


Figura 24: Ilustración gráfica del protocolo experimental. El color rosa representa al grupo de hembras y el azul al grupo de machos de nuestra muestra. En la Fase Experimental del procedimiento fueron realizados dos días de habituación y uno de exposición, donde se les presento a todos los animales viruta de macho tratado frente a viruta limpia (verde y gris) o bien viruta de macho sin tratar frente a viruta limpia (rojo y gris). El cambio en la lateralidad de los colores en la fase de exposición se realiza para indicar el contrabalanceo dentro de la caja.

El protocolo experimental, como se puede ver en la siguiente ilustración, consistió en dos días de habituación y uno de exposición a los estímulos. En la fase de habituación la situación experimental se mantuvo igual que en la fase de experimentación salvo por la viruta utilizada como estímulo neutro que se encontraba limpia en el momento de usarse. El día de la exposición la mitad de la muestra realizó el test de preferencia en la condición de Viruta de Macho Sin Tratar vs Estímulo Neutro; la otra mitad de la muestra realizó el mismo test con Viruta de Macho Tratado con LPS frente a Estímulo Neutro.

Parte II: Estudios con el Modelo de LPS

Finalmente, la duración de los ensayos durante el procedimiento fue de cinco minutos (300s), tanto en los que respectan a la Habitación como los que lo hacen a la fase de Exposición.

Metodología del Experimento con Animal *in vivo*

Sujetos y Estabulación

En este experimento fueron utilizados 16 especímenes de *Mus musculus* de la cepa CD-1 de al menos 10 semanas de edad, concretamente ocho hembras y ocho machos. Los animales fueron estabulados en el animalario de la Universidad de Valencia en condiciones de temperatura y humedad óptimas y bajo el atento cuidado del equipo de profesionales del animalario.

Estímulos

Los animales que fueron utilizados de estímulo experimental consistieron en 12 machos *Mus musculus* de al menos 10 semanas de edad estabulados en grupos de seis. Seis de esos machos fueron tratados mediante inyección intraperitoneal con LPS (1mg/kg; 0,2mg/ml en NaCl al 9%) al menos 12 horas antes del inicio del último día del protocolo experimental.

Parte II: Estudios con el Modelo de LPS

Todos los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal con Ketamina (100g/ml) y Metomidina (0,5mg/ml) antes de los ensayos experimentales. Al finalizar el procedimiento experimental fueron perfundidos con una dosis eutanásica de pentobarbital sódico.

Protocolo de Preferencia

Para este experimento fue utilizada una caja de experimentación de metacrilato opaco de dimensiones 250x500x300mm. Los estímulos fueron dispuestos en extremos opuestos de la caja de experimentación, depositando al animal anestesiado encima de una Placa de Petri. Los días de habituación la situación fue idéntica salvo por la ausencia del animal anestesiado. Esta situación experimental se muestra en la **Figura 25**.

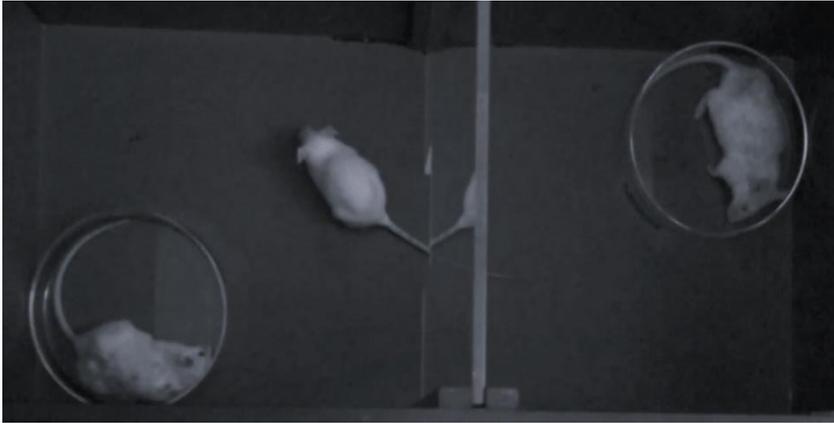


Figura 25: Muestra de la situación experimental extraído de la grabación de un ensayo el día de la exposición a los animales anestesiados.

El protocolo experimental consistió en cuatro días de los cuales tres correspondieron a la habituación a la situación experimental y el último a la presentación de los estímulos. El procedimiento se puede observar en la **Figura 26**. El último día se presentaron a un mismo animal experimental en un lado un macho sin tratar y al otro lado un macho tratado con LPS. En animales alternos se aplicó, como en experimentos anteriores, un contrabalanceo respecto a la posición de cada modalidad de estímulo.

Parte II: Estudios con el Modelo de LPS

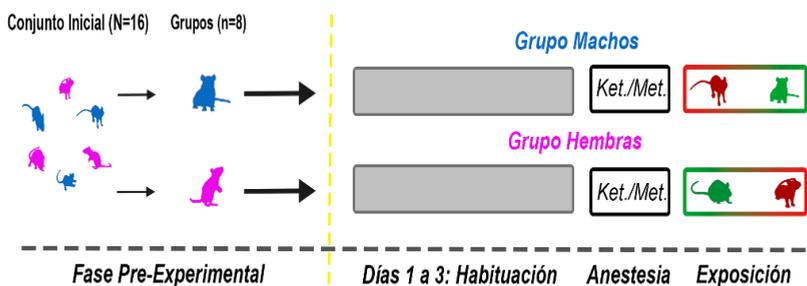


Figura 26: Ilustración gráfica del protocolo experimental. El color rosa representa al grupo de hembras y el azul al grupo de machos de nuestra muestra. En la Fase Experimental del procedimiento fueron realizados tres días de habituación y uno de exposición, donde se les presentó a todos los animales ambos tipos de estímulo (en verde: macho tratado con LPS; en rojo, macho sin tratar).

Finalmente, la duración de los ensayos fue de diez minutos (600s) tanto en la Exposición como en los tres días de Habitación.

Procesamiento de Datos

A continuación, explicaremos las medidas realizadas como variables dependientes en cada uno de nuestros experimentos, la forma de obtención de estas y las pruebas estadísticas realizadas. Aunque explicaremos los experimentos de manera particular, todos tienen en común: la conducta de los animales fue grabada y fueron tomadas para análisis la grabación del último día de habituación así como los días de exposición a los estímulos experimentales; en su mayoría, los videos fueron analizados utilizando el programa “Smart v3.0” (Panlab, Barcelona, España), que detecta por contraste de pixeles entre una imagen base (*id est*, la misma situación experimental pero sin el sujeto) y el fotograma de la grabación con la posición del animal; otros, sin embargo, fueron analizados manualmente mediante doble ciego por otro experimentador ajeno al diseño experimental y al objetivo del experimento; finalmente, para el uso de las herramientas de estadística fue usado el software “IBM SPSS Statistics v23.0”.

Previamente a la realización de pruebas de análisis de datos para medir los efectos de las variables se han realizado

test para evaluar que estos cumplan los criterios para realizar pruebas paramétricas. En concreto, para evaluar la esfericidad se ha realizado el test de Mauchly; para evaluar la normalidad de los datos se ha realizado el test de Kolmogorov-Smirnov; y para la homogeneidad de los datos en variables entresujetos el test de Levene. Se señalará expresamente durante la exposición de los resultados si estos criterios no han sido cumplidos.

Así pues, en el **estudio de preferencia I** la variable dependiente (VD) fue el tiempo en segundos en el que el animal se encontraba cerca del estímulo, en concreto en un radio de 6cm alrededor del centro del estímulo. Las variables independientes (VI) usadas para el análisis fueron las variables intrasujetos Exposición, con tres condiciones (Control; Volátiles; Involátiles) y Tipo de Estímulo con dos condiciones (Estímulo Lado Derecho; Estímulo Lado Izquierdo). Por otro lado, la herramienta de análisis usada fue una Anova de Medidas Repetidas y un Test de Análisis de Esfericidad de Mauchly para la variable Exposición, no siendo necesario en el caso de la variable Tipo de Estímulo al contar solo con dos condiciones. Para la condición Macho Tratado con LPS vs Hembra, al no

haber superado el test de esfericidad, fueron aplicados sobre los datos el test no paramétrico de la Anova de Friedman.

En el **experimento de preferencia II**, la VD consistió en el tiempo en segundos en la zona (*i. e.*, la mitad de la caja) de la caja donde ésta situado el estímulo, mientras que las VI son las mismas que en el Experimento de Preferencia I. Por lo tanto, las herramientas estadísticas utilizadas también fueron las mismas.

En el caso del **experimento de preferencia III**, la VD consistió en el tiempo que el animal pasaba cerca del estímulo, en concreto en un radio de 6cm respecto al centro de este. Tanto las VIs como los test estadísticos utilizados son los mismos que en los experimentos de preferencia anteriores, aunque en este caso fueron realizadas comparaciones de medias *post hoc* con la corrección de Bonferroni. Además, como la condición Orina de Macho Tratado vs Orina de Hembra no se cumplen los criterios de normalidad sobre estos datos fue realizado el test no paramétrico de Anova de Friedman.

Por su lado, el **experimento de activación neuronal** posee dos apartados. El primero esta referido al análisis de conducta, para el que la VD fue el tiempo en segundos que el

animal pasaba cerca del estímulo. Respecto a las VIs nos encontramos con un modelo mixto con una VI intrasujetos que llamamos Exposición con dos condiciones (Habitación; Estímulo Experimental) y otra VI entresujetos que llamamos Tipo de Estímulo, con tres condiciones (Neutro; Orina de Macho sin Tratar; Orina de Macho Tratado). Las pruebas de procesamiento de datos utilizadas consistieron en una Anova de Medidas Repetidas. Posteriormente, se realizó una comparación de medias con el ajuste de Bonferroni.

El segundo apartado de este experimento consistió en el análisis del marcaje de la proteína c-Fos. En éste, la VD consistió en la cantidad de puntos igual o mayor de 40 píxeles que hubiese en una muestra de 200x200µm de las fotografías tomadas del marcaje de los núcleos objetivo. Para el análisis estadístico de la VD previamente fueron realizadas las pruebas de Levene y de Kolmogorov-Smirnov con el fin de valorar los requisitos de las pruebas paramétricas. En el caso de cumplirlas realizamos un ANOVA, en caso contrario realizamos una prueba de Kruskal-Wallis. Cuando fue pertinente, se realizaron pruebas *post hoc* comparando las medias usando la corrección de Bonferroni.

En el **experimento de viruta/orina y estro/no-estro** utilizamos como VD el tiempo que el animal pasa cerca del estímulo, concretamente en un radio de 6cm a partir del centro del estímulo. Las VI consistieron en dos variables intrasujetos y dos variables entresujetos. Así, como variables nuestro diseño experimental tiene las variables entre Ciclo Estral, con dos condiciones (no Estro; Estro), y la variable Substrato, también con dos condiciones (Orina; Viruta); y las variables intra Exposición (Habitación; Exposición al Estímulo Experimental) y Estímulo (Lado Derecho; Lado Izquierdo). Finalmente, las pruebas estadísticas utilizadas consistieron en el test de Levene para igualdad de varianzas y el test de Kolmogorov-Smirnov para normalidad, una Anova de medidas de repetidas para comparar el efecto de las variables y, posteriormente, una comparación de medias usando la corrección de Bonferroni.

En el experimento en el que usamos **viruta manchada por un ratón macho tratado con LPS durante cuatro horas**, la VD es la ratio del tiempo que el animal pasa en la zona de la caja de experimentación donde están cada uno de los estímulos. La VI se trata de una variable intrasujetos que hemos denominado Estímulo y posee tres condiciones (Neutro; Macho sin Tratar;

Macho Tratado con LPS). La herramienta de análisis utilizada para analizar los resultados fue una Anova de medidas repetidas.

El siguiente experimento fue el que expone a la muestra a **D y a PF**. La variable dependiente en este experimento consistió en la ratio entre el tiempo medido en segundos que los animales pasan dentro de un radio de 6cm en cada estímulo. Al igual que en el anterior experimento, el diseño experimental consistió en una variable intra que fue denominada Estímulo y poseía tres condiciones (Neutro; Darcina; Péptidos Formilados) y a la que le fue realizada un test de esfericidad de varianzas.

En el **experimento de viruta manchada durante 12 horas por un macho tratado con LPS** tuvo como VD la ratio entre el tiempo que los animales pasaron en cada mitad de la caja de experimentación. La medición fue realizada por un investigador ajeno al experimento. Las VI fueron una variable intrasujetos que denominamos Día de Exposición con dos condiciones (Control; Viruta Manchada) y dos variables entresujetos que fueron denominadas Sexo y Estímulo (Viruta de Macho Tratado con LPS; Viruta de Macho no Tratado). La herramienta de análisis fue un Anova de medidas repetidas.

El protocolo en el que usamos un **ratón macho anestesiado** como estímulo tuvo como VD la ratio entre el tiempo medido en segundos que los animales pasan en cada mitad de la caja de experimentación. En este caso, como en el experimento anterior, la medición fue realizada por un investigador ajeno al experimento. En este experimento utilizamos una VI entresujetos de dos condiciones que decidimos denominar Sexo y otra variable intrasujetos de dos condiciones denominada Exposición (Ratio Control; Ratio Animal Anestesiado). La herramienta utilizada para analizar los datos consistió en una Anova de medidas repetidas.

Resultados:

Resultados Estudios con Orina

A continuación, serán presentados los resultados respecto a la conducta de los animales en los experimentos de preferencia usando como estímulo orina de individuos de la especie *Mus musculus*. Los tres procedimientos se separarán, a su vez, en las tres condiciones experimentales que de ellos forman parte.

Experimento de Preferencia I

Orina de Macho sin Tratar vs Orina de Hembra

A continuación, se presentan gráficamente los resultados obtenidos durante la condición experimental en la que fueron presentados Orina de Macho sin Tratar y Orina de Hembra.

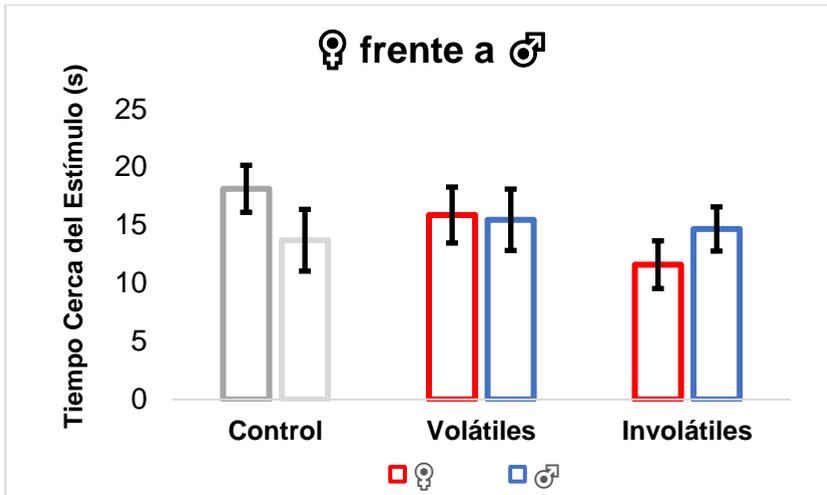


Figura 27: Representación de los resultados de la condición de orina de hembra (en rojo) y orina de macho (en azul) en las fases experimentales de *Habitación (Control)*, *Exposición a Volátiles* y *Exposición a no Volátiles*. La variable dependiente es el tiempo que el animal pasa cerca de los estímulos. Las barras de error representan el error de la media. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales.

Respecto a los resultados de las pruebas realizadas, ninguno de los factores analizados da resultados significativos. Así, ni el factor intrasujetos exposición (con las condiciones habitación, volátiles y no volátiles; $F_{2,8} = 1,742$; $p = 0,236$) ni el factor tipo de estímulo (lado derecho; lado izquierdo; $F_{1,9} = 0,76$; $p = 0,789$) dan resultados estadísticamente significativos. Por otro lado, su interacción tampoco tiene un efecto significativo sobre la VD ($F_{2,8} = 1,241$; $p = 0,339$).

Con base a estos resultados podemos concluir que en nuestra muestra de sujetos no hay diferencias en el tiempo que deciden pasar cerca de un estímulo o cerca de otro. Es decir, no parecen tener preferencia por la orina de Macho sin Tratar y en edad reproductiva respecto a la Orina de Hembra. Esto se da tanto en la condición en la que solo se permite el acceso a los componentes volátiles como en la que se permite el acceso a los no volátiles.

Orina de Hembra vs Orina de Macho Tratado con LPS

A continuación se presentan gráficamente los resultados del análisis de la conducta en el test de preferencia que enfrentaba los estímulo de Orina de Hembra y de Orina de Macho Tratado.

Los test para evaluar los requisitos de las pruebas paramétricas nos indican que en el caso de esta condición los datos no cumplen con los criterios de esfericidad medidos con el test de Mauchly ($\chi^2_2 = 7,977$; $p = 0,019$). Por lo tanto, para esta condición experimental deberemos usar pruebas no paramétricas.

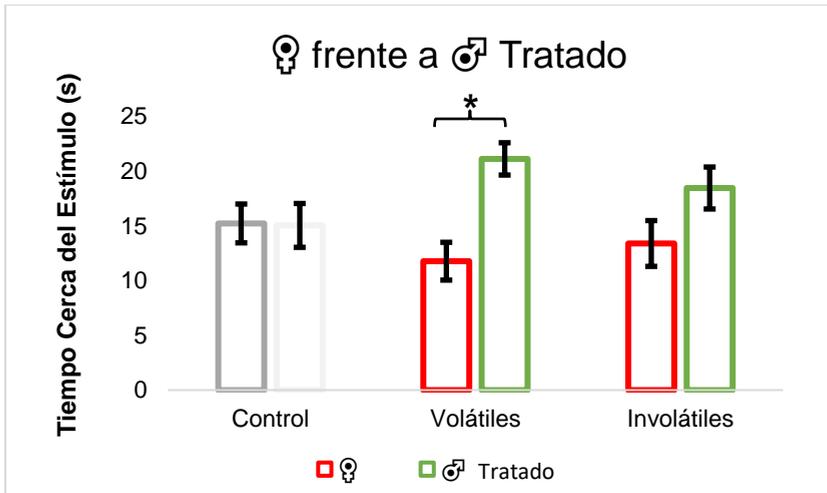


Figura 28: Representación de los resultados de la condición de *Orina de Hembra* (en rojo) y *Orina de Macho Tratado* (en verde) en las fases experimentales de *Habitación (Control)*, *Exposición a Volátiles* y *Exposición a no Volátiles*. La variable dependiente es el tiempo que el animal pasa cerca de los estímulos. Las barras de error representan el error de la media. Encontramos diferencias significativas en la condición atracción a volátiles ($p= 0,017$).

Los resultados del test de la Anova de Friedman realizado sobre los datos de la VD nos indican unos efectos significativos de la variable exposición ($\chi^2_5= 11,314$; $p= 0,045$). Como prueba *post hoc* realizamos un test de Wilcoxon para comprar la exploración en la condición de volátiles, dándonos un resultado significativo al analizar los datos ($T=4$; $p= 0,017$). En este caso, al realizar solo una comparación entre medias, no es necesario realizar el ajuste de Bonferroni.

Estos resultados nos indicarían una tendencia hacia la exploración de los componentes volátiles de la Orina de Macho Tratado frente a Orina de Hembra. Sin embargo, esta tendencia no se repetirá en la condición de no volátiles, no mostrando preferencia por ningún estímulo.

Orina de Macho sin Tratar vs Orina de Macho Tratado con LPS

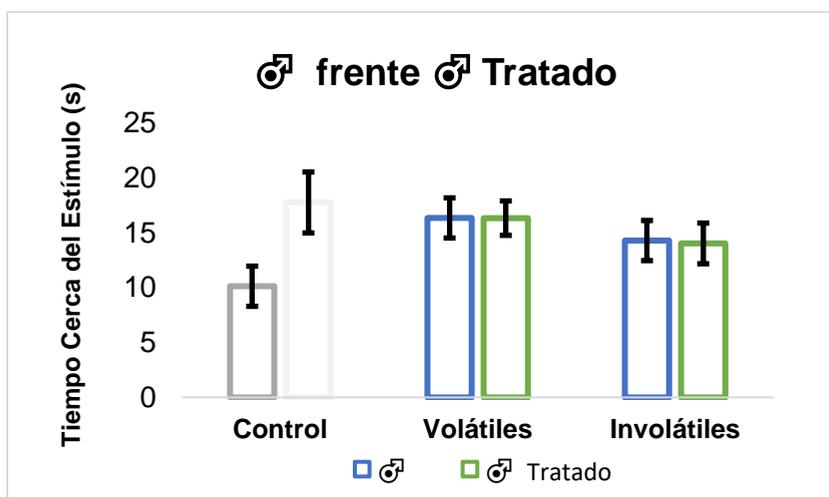


Figura 29: Representación de los resultados de la condición de Orina de Macho sin Tratar (Azul) y Orina de Macho Tratado (Verde) en las fases experimentales de *Habitación (Control)*, *Exposición a Volátiles* y *Exposición a no Volátiles*. La variable dependiente es el tiempo que el animal pasa cerca de los estímulos. Las barras de error representan el error de la media. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales.

Como podemos observar en la **Figura 29**, no encontramos efectos significativos de las VI sobre el tiempo en que los sujetos experimentales estuvieron cerca del estímulo. Así, la variable Exposición nos da una significación en el test de 0,143 ($F_{2,8}=2,504$) y la VI Tipo de Estímulo una significación de 0,285 ($F_{1,9}=1,291$). Asimismo, la interacción entre ambas tampoco tiene un efecto significativo ($F_{2,8}= 2,495$; $p= 0,144$).

Estos resultados nos indican que los ratones hembra que hemos usado en nuestra muestra no presentan preferencia por ninguna de las muestras de Orina de Macho presentadas, sean de macho tratado con LPS o sin tratar. Esto se repitió en la exposición restringida a volátiles y la exposición a los no volátiles del estímulo.

Experimento de Preferencia II

Orina de Macho sin Tratar vs Orina de Hembra

A continuación, se presentan los resultados para el segundo experimento de preferencia, en el que fue cambiada la caja de experimentación para comprobar el efecto que este cambio en la situación experimental podía ejercer sobre los resultados (e.g., maximizar las diferencias en la conducta de

exploración si las hubiera). Presentamos en la **Figura 30** los resultados de la condición del protocolo de preferencia en que presentábamos Orina de Hembra frente Orina de Macho sin Tratar

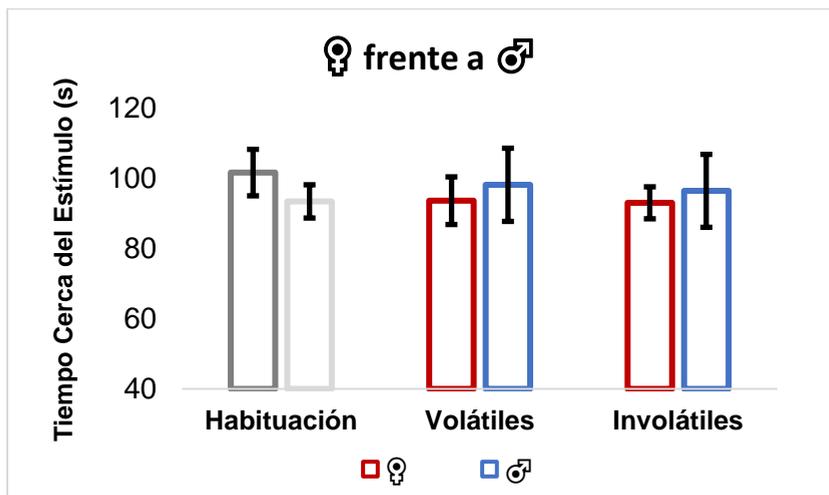


Figura 30: Representación de los resultados de la condición de Orina de Hembra (en rojo) y Orina de Macho (en azul) en las fases experimentales de *Habitación (Control)*, *Exposición a Volátiles* y *Exposición a no Volátiles*. La variable dependiente es el tiempo que el animal pasa cerca de los estímulos. Las barras de error representan el error de la media. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales.

Los resultados de las pruebas de análisis de datos realizadas nos arrojan unos resultados no significativos para ninguna de las VI, *id est*, 0,888 para exposición ($F_{2,8} = 0,120$) y 0,992 para tipo de estímulo ($F_{2,9} = 0$). Tampoco encontramos

efectos significativos para la interacción entre ambas ($F_{2,8}=0,674$; $p= 0,536$).

Así pues, los sujetos de nuestra muestra no prefieren la Orina de Macho sin Tratar frente a la Orina de Hembra.

Orina de Hembra vs Orina de Macho Tratado con LPS

Como el siguiente gráfico ilustra, encontramos un efecto significativo de la interacción entre las variables Exposición y Tipo de Estímulo ($F_{2,8}= 9,338$; $p= 0,008$), aunque ninguna de estas presenta efecto por sí misma (respectivamente, $F_{2,8}= 0,326$; $p= 0,731$ y $F_{1,9}= 3,677$; $p= 0,087$). El análisis *post hoc* de comparación de medias con la corrección de Bonferroni nos indica diferencias significativas en el tiempo pasado en la zona del estímulo en la fase del protocolo de Exposición a Volátiles de la Orina ($F_{1,9}= 30,041$; $p= 0,0001$)

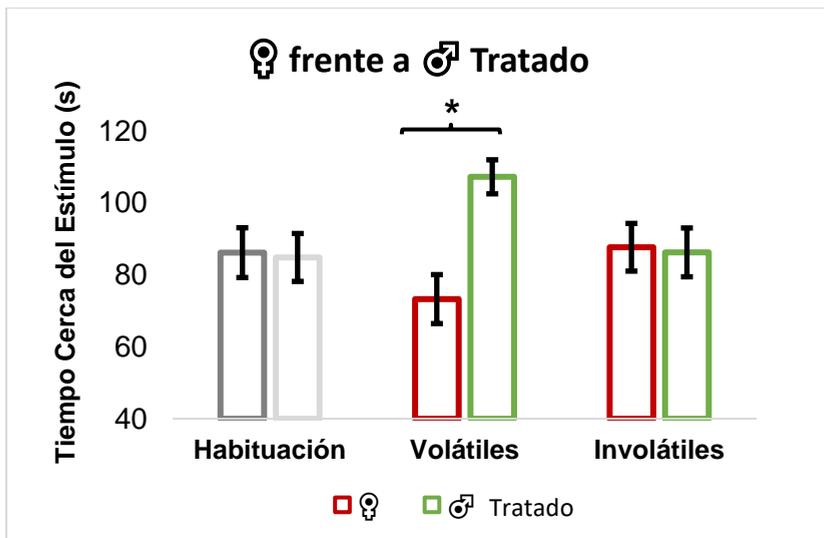


Figura 31: Representación de los resultados de la condición de *Orina de Hembra* (en rojo) y *Orina de Macho Tratado* (en verde) en las fases experimentales de *Habitación (Control)*, *Exposición a Volátiles* y *Exposición a Involátiles*. La variable dependiente es el tiempo que el animal pasa cerca de los estímulos. Las barras de error representan el error de la media. Encontramos diferencias significativas en la condición atracción a volátiles ($p= 0,0001$).

Así, los ratones hembra expuestos a orina en esta condición prefirieron pasar más tiempo cerca de la zona donde detectaron los volátiles de Orina de Macho Tratado con LPS. Sin embargo, no encontramos la misma preferencia cuando se les permite el contacto con el estímulo y el acceso a los componentes no volátiles de ambos estímulos

Orina de Macho sin Tratar vs Orina de Macho Tratado con LPS

Finalmente, presentamos a continuación los resultados de la última condición experimental del segundo protocolo de preferencia por orina. Estos resultados se representan en la siguiente gráfica.

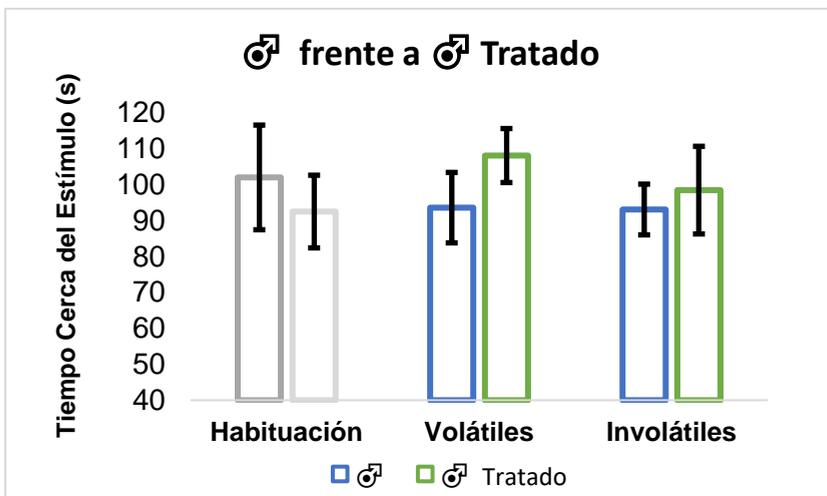


Figura 32: Representación de los resultados de la condición de Orina de Macho sin Tratar (Azul) y Orina de Macho Tratado (Verde) en las fases experimentales de *Habitación (Control)*, *Exposición a Volátiles* y *Exposición a no Volátiles*. La variable dependiente es el tiempo que el animal pasa cerca de los estímulos. Las barras de error representan el error de la media. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales.

Las pruebas realizadas sobre los datos nos proporcionan resultados no significativos para los efectos de las VI sobre la VD. Así, la variable exposición ($F_{2,8}=0,740$, $p= 0,507$), Tipo de estímulo ($F_{1,9}= 0,065$, $p=0,804$) y su interacción ($F_{2,8}= 1,519$, $p= 0,276$) no poseen una influencia suficiente en nuestro diseño experimental como para afectar a la conducta de los ratones hembra utilizados en esta condición. Por lo tanto, podemos decir que los sujetos experimentales no presentan una preferencia por estar cerca del estímulo de Orina de Macho sin Tratar o Tratado que hemos usado en el experimento.

Experimento de Preferencia III

A continuación, se presentarán los resultados de los Estudios de Preferencia de Orina usando la cepa de *Mus musculus* C-57 y la caja de experimentación de dimensiones 250x500x300mm. Este cambio fue realizado para comprobar el posible efecto de la cepa en los resultados, ya que se había encontrado la pérdida del gen para el receptor de péptidos formilados 3 en algunas cepas, siendo confirmada su presencia en la C-57 (Stempel et al., 2016).

Orina de Macho sin Tratar vs Orina de Hembra

En la figura siguiente encontramos representados los resultados del análisis de la conducta:

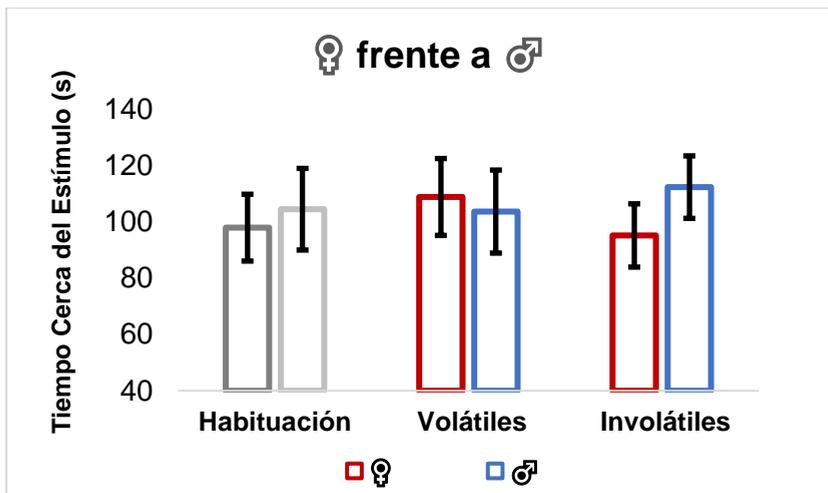


Figura 33: Representación de los resultados de la condición de *Orina de Hembra* (en rojo) y *Orina de Macho sin Tratar* (en azul) en las fases experimentales de *Habitación (Control)*, *Exposición a Volátiles* y *Exposición a no Volátiles*. La variable dependiente es el tiempo que el animal pasa cerca de los estímulos. Las barras de error representan el error de la media. No encontramos diferencias significativas entre las condiciones experimentales.

Así, los resultados de las pruebas Anova realizadas en nuestro diseño experimental nos arrojan unos efectos no significativos para los factores analizados. Así, el factor exposición ($F_{2,6} = 0,105$; $p = 0,902$) y tipo de estímulo ($F_{2,6} = 0,006$; $p = 0,941$) en este diseño experimental no afectan a la conducta de exploración de nuestra muestra. La interacción de estas variables sobre la VD tampoco nos aporta un resultado significativo ($F_{2,6} = 0,768$; $p = 0,493$).

Por lo tanto, no encontramos efecto atractivo de la Orina de Macho no Tratado frente a la Orina de Hembra. Es decir, ni en los componentes volátiles ni en los componentes no volátiles de la Orina de Macho nuestros animales experimentales encuentran estimulación suficiente como para mostrar interés.

Orina de Hembra vs Orina de Macho Tratado con LPS

Continuamos con los experimentos de preferencia ante orina presentando los resultados para la VD de los animales expuestos a Orina de Macho Tratado y Orina de Macho sin Tratar. A continuación, se presentan de manera gráfica los resultados:

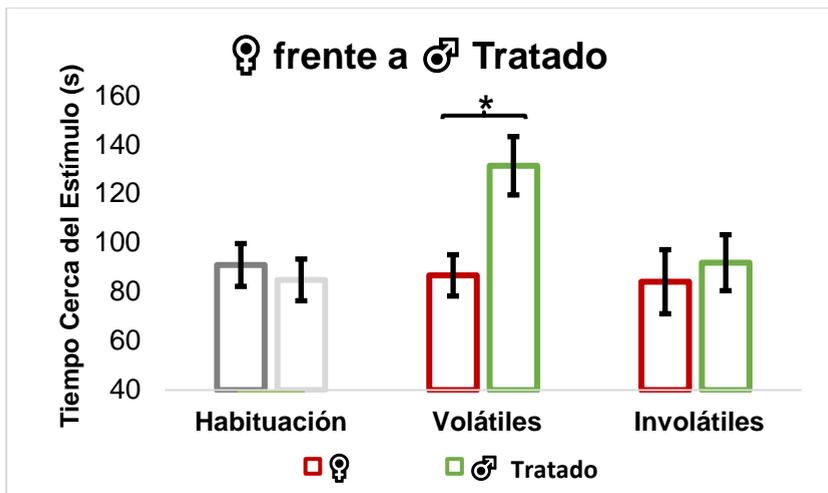


Figura 34: Representación de los resultados de la condición de *Orina de Hembra* (en rojo) y *Orina de Macho Tratado* (en verde) en las fases experimentales de *Habitación (Control)*, *Exposición a Volátiles* y *Exposición a Involátiles*. La variable dependiente es el tiempo que el animal pasa cerca de los estímulos. Las barras de error representan el error de la media. Encontramos diferencias significativas en la condición atracción a volátiles ($p= 0,017$).

Al realizar los test de normalidad para las variables de esta condición el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov nos arroja un resultado significativo ($D_{10}=0,324$; $p= 0,013$) por lo que realizamos un test no paramétrico de la Anova de Friedman.

Como podemos observar en la gráfica, en esta condición experimental sí que observamos efectos estadísticamente significativos ($\chi^2_5=13,714$; $p= 0,018$). Así, como análisis *post hoc* realizamos un test de Wilcoxon para las variables de la condición de volátiles, encontrando que las diferencias en el tiempo

pasado entre uno y otro estímulo son estadísticamente significativas ($T=1$; $p= 0,017$).

En conclusión, si observamos la representación de los datos que ofrecemos en la gráfica, podemos decir que los ratones hembra prefieren encontrarse cerca del estímulo de Orina de Macho Tratado cuando este es presentado frente al estímulo de Orina de Hembra. Sin embargo, esto se da tan solo cuando se restringe el acceso de los sujetos experimentales a los componentes involátiles de ambos tipos de orina.

Orina de Macho sin Tratar vs Orina de Macho Tratado con LPS

A continuación, presentamos los últimos resultados de los estudios de preferencia. Primero de todo, presentaremos en el siguiente gráfico los resultados obtenidos:

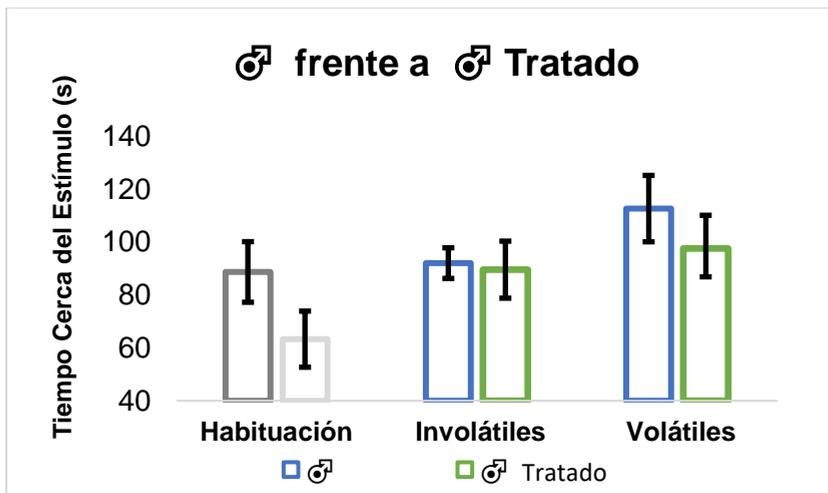


Figura 35: Representación de los resultados de la condición de *Orina de Macho sin Tratar* (Azul) y *Orina de Macho Tratado* (Verde) en las fases experimentales de *Habitación (Control)*, *Exposición a Volátiles* y *Exposición a no Volátiles*. La variable dependiente es el tiempo que el animal pasa cerca de los estímulos. Las barras de error representan el error de la media. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales.

En este caso, el factor tipo de estímulo presenta un efecto significativo efecto sobre la medición del tiempo cerca del estímulo ($F_{1,7}= 6,152$; $p= 0,042$), aunque la VI exposición solo tiene una tendencia a la significación ($F_{2,6}= 4,569$; $p= 0,062$). Sin embargo, no encontramos una interacción estadísticamente significativa ($F_{2,6}= 0,804$; $p= 0,491$).

Por lo tanto, pese a que la variable Tipo de Estímulo parece tener un efecto, las diferencias entre las medias de las

condiciones no son significativas. Es decir, los sujetos de nuestra muestra no presentan tendencia a pasar menos tiempo ante la Orina de Macho sin Tratar que frente a la Orina de Macho Tratado.

Experimento de Activación Neuronal

Análisis Conductual

A continuación, vamos a describir los resultados obtenidos en el protocolo de activación neuronal. Así, analizaremos los resultados obtenidos de la conducta de los animales en la situación experimental; a continuación, presentaremos los resultados del estudio inmunohistoquímico del marcaje de la proteína c-Fos.

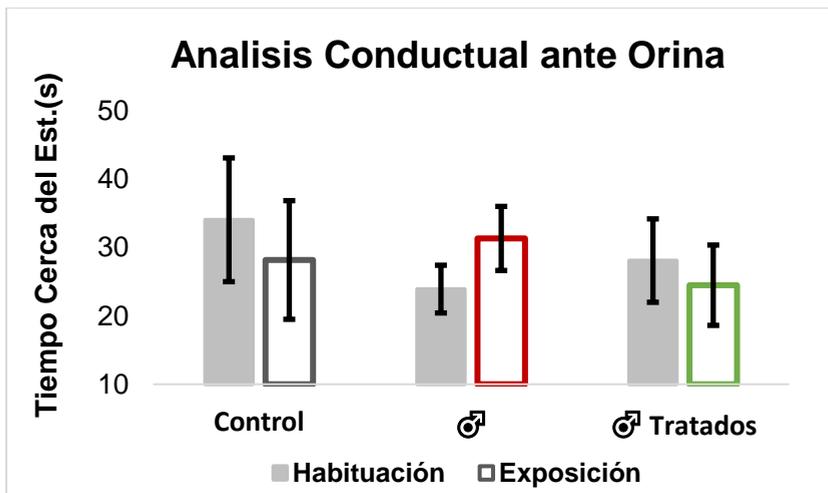


Figura 36: Análisis de la conducta de la exposición de los ratones hembra a la *Orina de Macho sin Tratar* (rojo) y *Orina de Macho Tratado* (verde) y de un *Estímulo Neutro* (gris) en las fases experimentales de *Habitación* (barras con relleno gris) y *Exposición* (barras con relleno blanco). Las barras de error representan el error de la media. La variable dependiente es el tiempo que el animal pasa cerca del estímulo en segundos (s). No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales.

Así pues, el análisis estadístico realizado nos aporta unos resultados no significativos en todas las variables analizadas respecto de la conducta de los animales. Así, la variable Exposición (habitación y estímulo experimental) no tiene un efecto significativo ($F_{1,18} = 0,112$; $p = 0,741$) ni tampoco la VI tipo de estímulo (control, orina de macho sin tratar y orina de macho tratados; $F_{2,18} = 0,180$; $p = 0,837$). No obstante, la interacción entre las variables día de experimentación y tipo de estímulo sí

que aporta un impacto significativo ($F_{2,18} = 3,946$; $p = 0,038$), aunque el análisis post hoc con la rectificación de Bonferroni no arroja diferencias significativas. Señalar que sí encontramos diferencias casi significativas en la comparación del día control vs día exposición del grupo expuesto a orina de macho sin tratar ($p = 0,053$).

Es decir, los datos nos indican que nuestra muestra no presenta significativamente mayor tendencia a explorar o rechazar ninguno de los estímulos de orina utilizados cuando los comparamos con la exploración de un estímulo neutro.

Estudio Histológico: Marcaje de c-Fos

Los resultados respecto del marcaje de la proteína c-Fos son presentados gráficamente más abajo. Los resultados de las pruebas de análisis de datos realizadas nos indican, respecto a las pruebas de requisitos paramétricos, que los grupos BOA (test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov $p = 0,035$) y VMH-DM (test de homogeneidad de varianzas de Levene; $p = 0,035$) no cumplen con estos criterios, por lo que se requieren de pruebas no paramétricas para su análisis.

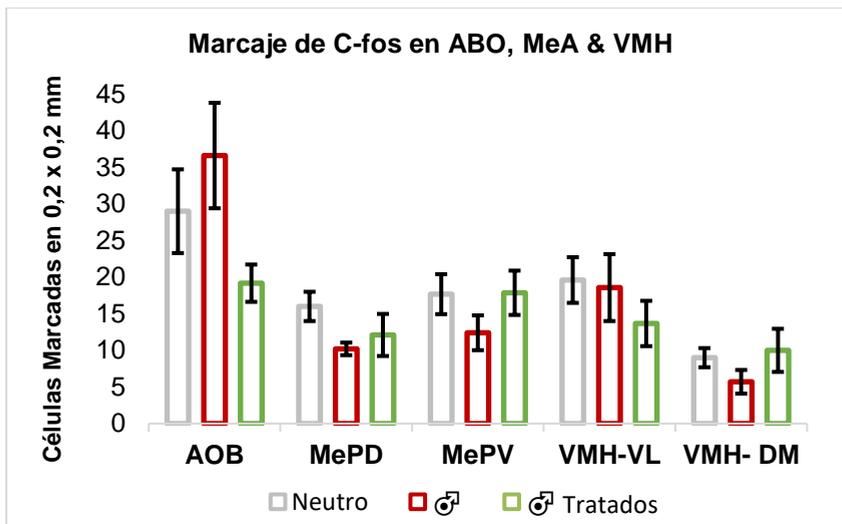


Figura 37: Análisis del marcaje de la proteína c-Fos en el tejido de los ratones hembra en la fase experimental de exposición a *Estímulo Neutro* (barras con borde gris), a *Orina de Macho sin Tratar* (barras con borde rojo) y a *Orina de Macho Tratado* (barras con borde verde). Las siglas utilizadas corresponden a: BOA, capa de células granulares del bulbo olfativo accesorio; MePD, neuronas del núcleo posterodorsal de la amígdala; MePV, neuronas del núcleo posteroventral de la amígdala; VMH-VL, neuronas del núcleo Ventrolateral del Hipotálamo ventromedial; VMH-DM, neuronas del Hipotálamo dorsomedial del hipotálamo ventromedial. Las barras de error representan el error de la media. La variable dependiente es el número de puntos con ≥ 40 pixeles un área de $200\mu^2$. No encontramos diferencias estadísticamente significativas en los núcleos analizados entre las condiciones experimentales.

Así pues, en la prueba no paramétrica realizada sobre los grupos de la condición BOA no encontramos efectos significativos de la VI Tipo de Estímulo ($p= 0,292$) así como en el test no paramétrico utilizado en la condición VMH-DM ($p=$

0,744). Por otro lado, los test paramétricos realizados tampoco arrojan efectos significativos en el resto de condiciones analizadas. Así, en los núcleos de la amígdala, ni en MePD ($F_{2,18}= 0,487$; $p= 0,622$) ni en MePV ($F_{2, 17}= 0,301$, $p= 0,744$). Tampoco en el núcleo Ventrolateral del hipotálamo ventromedial encontramos un efecto significativo del tipo de orina utilizado sobre la VD ($F_{2,18}=0,040$, $p= 0,961$).

En conclusión, en nuestra muestra histológica no encontramos diferencias significativas en la presencia de marcaje sobre la proteína c-Fos utilizada para medir la activación neuronal según el estímulo al que los sujetos fueron presentados.

Resultados de los Estudios con Viruta Estudio de Viruta frente a Orina

A continuación, presentamos de manera gráfica los resultados de la conducta de nuestra muestra en el experimento de preferencia a Viruta o a Orina.

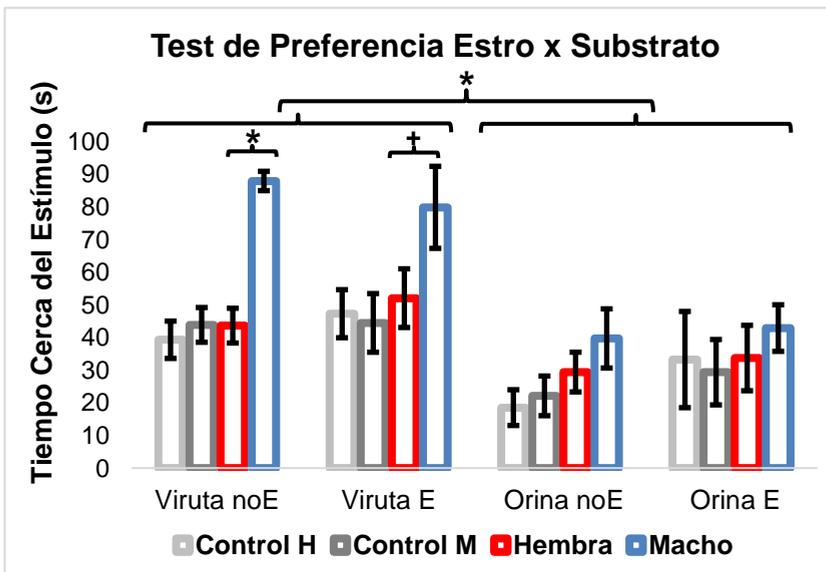


Figura 38: Análisis de la conducta de la exposición de los ratones hembra a la *Orina/Viruta de Hembra* (rojo) y *Orina/Viruta de Macho* (azul) y de un *Estímulo Neutro* (gris claro y gris oscuro). La variable dependiente es el tiempo que el animal pasa cerca del estímulo en segundos (s). Encontramos diferencias significativas en las situaciones experimentales en las que se expone a los sujetos experimentales a viruta de macho frente a viruta de hembra tanto en las condiciones no- estro ($p= 0,005$) y casi significativas en estro ($p= 0,086$). Además, existen diferencias significativas entre los estímulos de Orina vs Viruta ($p= 0,0001$) y entre la fase control y la experimental ($p= 0,0001$; no mostrados). No encontramos diferencias significativas en los test con estímulo de orina.

Las pruebas de análisis realizados encuentran que la variable estímulo (neutro o experimental) nos arroja resultados significativos ($F_{1,17}=25,898$; $p= 0,0001$) así como la variable tipo de substrato (orina; viruta; $F_{1,17}= 23,707$; $p= 0,0001$). Sin embargo, la variable ciclo estral no muestra efectos significativos ($F_{1,17}= 1,152$; $p= 0,298$), así como interacción con las variables anteriores. Por otro lado, la variable sexo del donante del estímulo muestra efectos significativos ($F_{1,17}= 4,592$; $p= 0,047$), siendo significativo además el efecto de la interacción de estas variables sobre el tiempo que pasan cerca del estímulo durante la situación experimental ($F_{1,17}= 4,484$; $p= 0,049$).

Por otro lado, la comparación de medias con la corrección de Bonferroni muestra que los ratones hembra de nuestra muestra prefieren de manera significativa explorar la viruta sucia de macho frente a la viruta sucia de hembra ($F_{1,17}= 11,966$; $p= 0,003$), siendo solo estadísticamente significativo en el grupo no-Estro ($F_{1,17}= 10,500$; $p= 0,005$) y con tendencia a la significación en el Estro ($F_{1,17}= 3,323$; $p= 0,086$).

Finalmente, no fueron encontradas diferencias en la exploración de los estímulos de orina de macho y orina de hembra independientemente de la fase estral.

En conclusión, los ratones de nuestra muestra tienden a pasar más tiempo cerca de la viruta de macho que de la orina de macho. Además, encontramos una tendencia estadística a que esto sea independiente de la fase del ciclo estral en la que se encuentra el sujeto.

Darcina vs Péptidos Formilados

A continuación, presentamos de forma gráfica los resultados de la VD del experimento en el que usamos D y PF como estímulos experimentales.

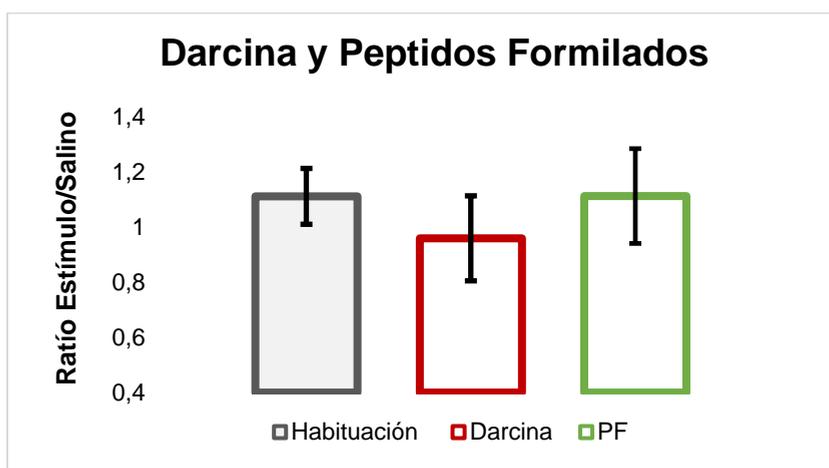


Figura 39: Análisis de la conducta de la exposición de los ratones hembra a *Darcina* (rojo) y *Péptidos Formilados* (verde) y a *Estímulo Neutro* (gris). Se presentan las ratios respecto al estímulo neutro frente al que fueron presentados de tal manera que si el sujeto experimental pasa más tiempo cerca del estímulo el resultado será >1 . Las barras de error representan el error de la media. La variable dependiente es el tiempo que el animal pasa

cerca del estímulo en segundos (s). No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales.

Respecto a los resultados de las pruebas de análisis de datos utilizadas, no encontramos efecto significativo de la variable Estímulo sobre la VD ($F_{2,8} = 0,548$; $p = 0,760$). Por lo tanto, no existen diferencias en el tiempo en el que pasan junto a ninguno de los estímulos experimentales presentados.

Estudio de Viruta de Animal Tratado con LPS I

A continuación, presentamos de manera gráfica los resultados del análisis de la conducta de los sujetos de nuestra muestra ante la viruta sucia durante cuatro horas por ratones macho tratados y sin tratar con LPS. Al comprobar, en el experimento de viruta vs orina, que la viruta tuvo efectos en la conducta estadísticamente significativos decidimos intentar lo mismo respecto a las señales de enfermedad y la conducta de evitación.

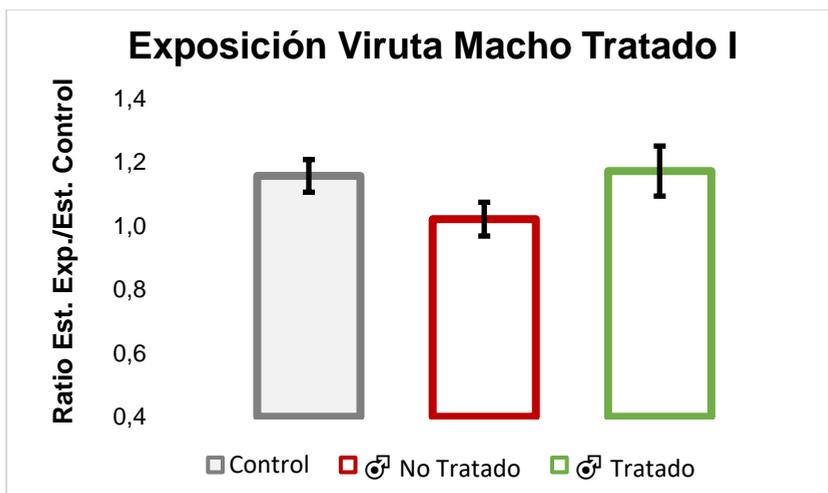


Figura 40: Análisis de la conducta de la exposición de los ratones hembra a *Viruta de Macho no Tratado* (rojo), a *Viruta de Macho Tratado con LPS* (verde) y a *Estímulo Neutro* (gris). Se presentan los ratios respecto al estímulo neutro frente al que fueron presentados de tal manera que si el sujeto experimental pasa más tiempo cerca del estímulo el resultado será >1. Las barras de error

representan el error estándar de la media. La variable dependiente es el tiempo que el animal pasa cerca del estímulo en segundos (s). No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales.

Los resultados de la Anova de medidas repetidas arrojan resultados no significativos sobre el efecto de la VI sobre el tiempo que los animales de nuestra muestra pasan cerca de los estímulos ($F_{2,8} = 0,390$; $p = 0,689$). Estos resultados indican que los ratones hembra de la muestra no prefieren estar más tiempo en el área con la viruta sucia de ratón macho sin tratar respecto al área con la viruta sucia de macho tratado con LPS.

Estudio de Viruta de Animal Tratado con LPS II

En el segundo experimento con viruta decidimos aumentar el tiempo que el animal tratado con LPS pasa ensuciando la viruta, dado que se ha descrito que a las 12 horas de haber recibido la inyección los machos tratados con LPS muestran una reducción significativa en la expresión genética en el hígado de D y en los niveles de testosterona en el plasma sanguíneo (Lopes & König, 2016). Además, decidimos usar en la muestra tanto machos como hembras con la finalidad de comparar nuestros resultados con los obtenidos por Boillat et al. (2015) en

su muestra de machos usando el modelo de LPS. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 41**.

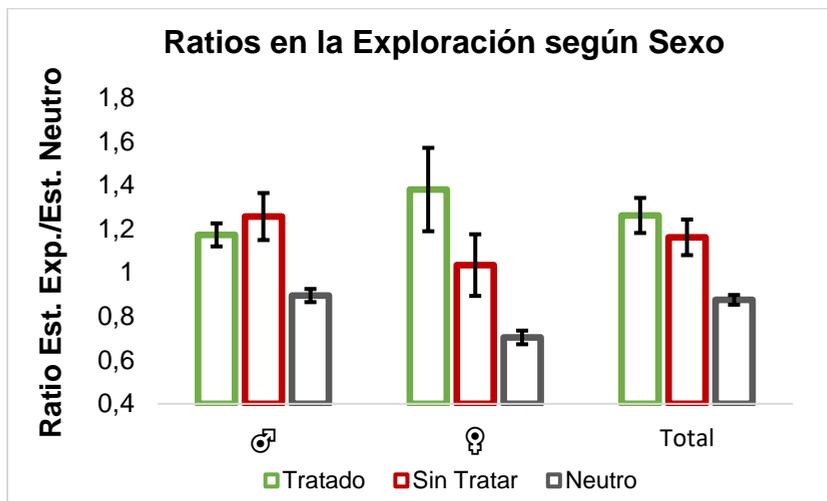


Figura 41: Análisis de la conducta de la exposición de los ratones hembra y macho a *Viruta de Macho Tratado con LPS* (en verde), a *Macho sin Tratar* (en rojo) y a *Estímulo Neutro* (en gris). Se presentan las ratios respecto al estímulo neutro frente al estímulo experimental al que fueron presentados de tal manera que si el sujeto experimental pasa más tiempo cerca del estímulo no neutro el resultado será >1 . Las barras de error representan el error de la media. No encontramos efectos estadísticamente significativos.

Respecto a los resultados de las pruebas estadísticas utilizadas, encontramos que la VI intrasujetos día de exposición (habituaación; viruta manchada) no tiene un efecto significativo sobre el tiempo que nuestra muestra explora los estímulos ($F_{1,9}=3,397$; $p= 0,098$). La interacción de esta variable con las variables entresujetos Sexo ($F_{1,9}=0,065$; $p= 0,804$) y estímulo

(viruta de macho tratado con LPS; viruta de macho no tratado; $F_{1,9}=0,835$; $p= 0,385$) y la interacción entre estas tres ($F_{1,9}=0,737$; $p= 0,413$) nos arrojan asimismo efectos no significativos sobre los resultados del análisis de la conducta.

Además, las pruebas sobre los efectos de las VI entresujetos también nos proporcionan resultados con efectos no significativos. Así, el sexo de la muestra experimental ($F_{1,9}= 0,741$; $p= 0,412$) y el estímulo ($F_{1,9}= 1,143$; $p= 0,313$), así como su interacción ($F_{1,9}= 3,606$; $p= 0,090$) no tienen una influencia suficiente sobre la muestra como para alterar su conducta.

Concluimos que nuestra muestra no ha explorado de manera diferenciada los estímulos presentados. Este hecho ocurre independientemente del sexo del sujeto.

Resultados del Experimento con Animal anestesiado

En el experimento en el que fueron utilizados animales anestesiados tratados o no con LPS como estímulo intentábamos comparar los resultados utilizando el mismo modelo que Boillat y su equipo utilizó en su artículo de 2015. Además, fue mantenida una muestra con ratones hembra y macho para, como en el experimento anterior, poder comparar nuestro experimento con el anteriormente mencionado. En la **Figura 42** presentamos de manera gráfica los resultados:

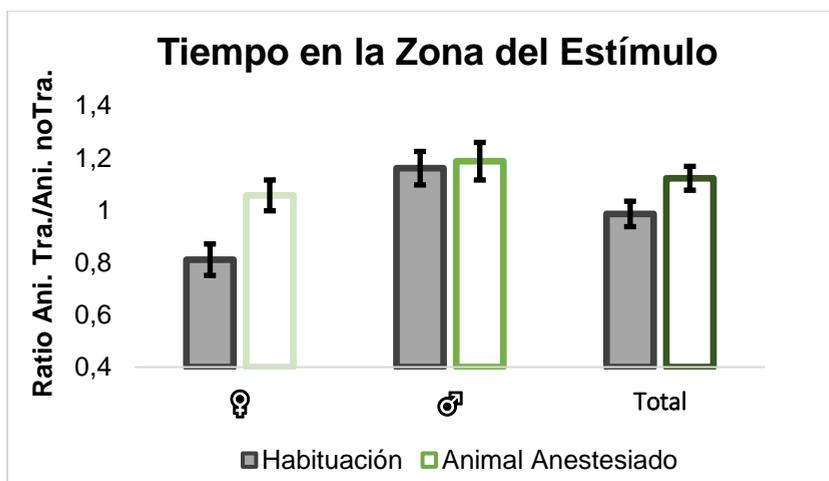


Figura 42: Análisis de la conducta de la exposición de ratones hembra y macho a los *animales anestesiados*. Se presentan las ratios de tal manera que si el sujeto experimental pasa más tiempo cerca del *animal anestesiado tratado con LPS* el resultado será >1 . Las barras de error representan el error de la media. La variable

dependiente es el tiempo que el animal pasa cerca del estímulo en segundos. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales.

Así, las pruebas realizadas de análisis de datos nos arrojan resultados no significativos. Ni la VI sexo ($F_{1,10} = 0,001$; $p = 0,976$), ni la variable exposición ($F_{1,10} = 0,288$; $p = 0,603$) ni la interacción entre ambas ($F_{1,10} = 0,776$; $p = 0,399$) poseen un efecto estadístico sobre la medición realizada de la conducta de los animales de nuestra muestra.

Por lo tanto, un animal anestesiado con señales de enfermedad no ha sido estímulo suficiente como para provocar una respuesta conductual significativa al compararlo con un espécimen control de la misma especie.

Discusión:

En la siguiente discusión comenzaremos por comentar los aspectos técnicos de los experimentos realizados dividiéndolos en cuatro apartados: experimentos con orina, experimentos con viruta, experimento con animal anestesiado y experimento de D y PF. Haremos un resumen de los resultados obtenidos y realizaremos una interpretación de los mismos teniendo en cuenta las hipótesis descritas en la introducción.

Finalmente, en un subapartado de conclusiones y discusión, discutiremos las limitaciones de la metodología utilizada y pondremos en contexto nuestros resultados respecto a la literatura publicada hasta el momento. En estos últimos apartados daremos una visión de conjunto de cómo colocar nuestras conclusiones en el estado de la cuestión sobre comportamientos de evitación de enfermedad y el denominado “Sistema Inmune Conductual”.

Experimentos con Orina

Hemos realizado un total de cuatro procedimientos usando como estímulo orina de especímenes *Mus musculus*. En tres de ellos la lógica experimental se repite, *id est*, usamos un test de preferencia para comprobar el efecto de los componentes volátiles y no volátiles de la orina de macho tratado a LPS, la orina de macho no tratado con LPS y la orina de hembra. Los estímulos fueron enfrentados formando tres condiciones donde dos de ellos serían colocados en lados opuestos de la caja de experimentación. Así, en grupos de ocho a diez ratones hembra, fue medida la localización de estas al colocarlas en la caja experimental y exponerlas, según la condición experimental, a los estímulos. Las condiciones experimentales, recordamos, consistieron en: 1) en **orina de hembra vs orina de macho sin tratar**; 2) **orina de hembra vs orina de macho tratado**; y 3) **orina de macho sin tratar vs orina de macho tratado**.

Finalmente, en el cuarto experimento, realizamos un procedimiento para medir la **activación neuronal** mediante el marcaje de la proteína c-Fos. Para ello, a un total de 21 especímenes hembra *Mus musculus* les fue presentado

únicamente uno de los siguientes estímulos durante 300s (5 min): solución salina; orina de macho sin tratar; orina de macho tratado. Posteriormente fue realizado el sacrificio de los animales de la muestra y el tratamiento del tejido con inmunohistoquímica.

Interpretación de los Resultados

Para discutir los resultados obtenidos partiremos de las hipótesis experimentales comentadas al inicio de esta parte de la tesis. Así pues, la fórmula que resume la primera hipótesis de estos procedimientos es:

$$\left[1. \quad T(\text{noV})_{\text{♂noT}} > T(\text{noV})_{\text{♀}} \right]$$

es decir, el tiempo en que nuestros animales pasan cerca de los componentes no volátiles de la orina de macho no tratado con LPS será mayor que el tiempo que pasan cerca de los componentes no volátiles de la orina de hembra.

Respecto a los resultados para comprobar esta hipótesis, no encontramos en ninguno de los tres experimentos realizados diferencias estadísticamente significativas en los tiempos de

preferencia de nuestra muestra que nos confirmen el cumplimiento de esta hipótesis. Por lo tanto, nuestros resultados concluyen que los ratones hembras expuestos a la condición de acceso a los estímulos no volátiles no muestran una atracción hacia estos componentes en la orina de macho sin tratar.

Este resultado contradice otros estudios presentes en la literatura que muestran la atracción que las hembras *Mus musculus* muestran hacia los estímulos de macho (Moncho-Bogani et al., 2002, 2004; McCarthy et al., 2018; Nomoto y Lima, 2015; Drickamer, 1989; Mossman y Drickamer, 1996). Sin embargo, es un resultado consistente en los tres experimentos de preferencia realizados, replicando el mismo diseño experimental con pequeños cambios en el contexto experimental en cada uno de ellos. Por ejemplo, los experimentadores fueron distintos en los tres, aunque en todos los casos se siguieron pautas de manejo (handling) de los animales que redujeran al máximo las fuentes de ansiedad que pudieran alterar los resultados (Hurst y West, 2010). Las cajas experimentales fueron distintas en los experimentos primero y tercero (250mm x 500mm x 300mm) respecto al segundo (150mm x 895mm x 300mm).

Finalmente, al respecto de la atracción por orina de macho, en nuestro **experimento de activación neuronal** mediante marcaje de la proteína c-Fos tampoco encontramos evidencia estadísticamente significativa en el comportamiento de los animales que indique atracción hacía la misma. La hipótesis de trabajo formulada fue la siguiente:

$$\left(6. T_{\text{♂noT}} > [T_{\text{♂siT}} \ \& \ T_N] \right)$$

significando que el tiempo cerca de la orina de macho no tratado será superior al tiempo cerca de la orina de macho tratado y del estímulo neutro. Así, la hipótesis de trabajo en este experimento referida a la capacidad de la orina de macho de provocar atracción no puede ser corroborada por los datos. Por lo tanto, podemos concluir la existencia de una relación más compleja de lo que la literatura pueda llegar a aparentar respecto a la atracción de que provocan las quimioseñales presentes en la orina de ratón macho. Otros factores deberían de ser estudiados a este respecto.

La segunda hipótesis experimental con la que trabajamos en los estudios de preferencia la hemos formulado como sigue:

$$\left(2. T(\text{noV})_{\text{♂siT}} \leq T(\text{noV})_{\text{♀}} \right)$$

indicando esta fórmula que los animales de la muestra exploraran lo mismo o menos los componentes no volátiles de la orina de macho tratado con LPS respecto a la orina de hembra. Así pues, los datos de todos los experimentos mantienen la hipótesis de igualdad en la condición de partículas no volátiles de la orina, proporcionando evidencia estadística para la hipótesis. Sin embargo, esta hipótesis de partida fue construida a condición de la veracidad de la primera, anteriormente expuesta, en la que se esperaba un efecto atractivo innato de los componentes no volátiles de la orina de macho sin tratar. Por lo tanto, para demostrar la capacidad de reducir la atracción o provocar un comportamiento de evitación en especímenes hembra *Mus musculus* ante señales de enfermedad, los componentes no volátiles de la orina de macho tratado con LPS deberían de ser menos explorados que los componentes no volátiles de la orina de hembra.

Concluimos por lo tanto que la hipótesis no ha sido cumplida al no encontrar evidencia estadística de que los componentes no volátiles provoquen esta conducta de evitación

a patógenos descrita como dependiente del OVN en la literatura (Boillat et al., 2015) y encontrada con diferentes modelos para provocar un estado de infección (Penn et al., 1998; Lanuza et al., 2014; Kavaliers y Colwell, 1995a; 1995b; Kavaliers et al., 2003; Kavaliers, Colwell y Choleris, 1998; Arakawa, Cruz y Deak, 2011; Kavaliers y Choleris, 2018; Kavaliers, Ossenkopp y Choleris, 2020; Ehman y Scott, 2001; 2002). Además, complementando este resultado nos encontramos con los resultados del **experimento de activación neuronal con orina de ratón**. Para este experimento la hipótesis experimental referida a la orina de macho tratado con LPS fue:

$$\left(7. T_{\text{siT}} \leq T_N \right)$$

es decir, los ratones hembra de nuestra muestra pasarán igual o menos tiempo cerca de la orina de macho tratado con LPS que del estímulo neutro (*i. e.* solución salina). Sin embargo, esta hipótesis es dependiente de la hipótesis explicada anteriormente sobre la orina de macho sin tratar, sugiriendo que nos encontramos en la misma situación. Así pues, los datos obtenidos en el análisis conductual nos llevan a concluir que la

hipótesis nula es confirmada al no haber efectos significativos en las variables conductuales.

Concluimos, por lo tanto, que la orina de macho tratado con LPS no posee la capacidad de activar el denominado sistema inmune conductual (Schaller, 2011; Schaller y Park, 2011; Kavaliers et al., 2020). Esta condición se repite tanto en experimentos de preferencia como en experimentos en los que se compara la conducta frente a un solo estímulo.

Además, este resultado parece ser independiente de la cepa de *Mus musculus* que utilizamos para realizar el experimento. Los RPF encargados de la detección de péptidos formilados derivados de bacterias en ratones (Rivière et al., 2009) y la presencia de receptores de esta familia en el OVN sugiere que estos se encargan de la detección de quimioseñales de enfermedad (Liberles et al., 2009). Boillat y su equipo (2015) realizaron una serie de experimentos en los que señalaban al OVN como centro sensorial clave para la evaluación y puesta en marcha de conductas de evitación de conoespecíficos con enfermedad en un modelo usando LPS. Sin embargo, nosotros no hemos encontrado este efecto cuando hemos permitido a

nuestros ratones el acceso tanto a volátiles como a no volátiles de orina de macho tratado con LPS.

La siguiente hipótesis de trabajo que formulamos para los experimentos de preferencia de orina fue la siguiente:

$$\left(3. T(\text{noV})_{\delta_{siT}} < T(\text{noV})_{\delta_{noT}} \right)$$

transcribiendo la formulación simbólica de la hipótesis, el tiempo que los ratones pasarán cerca de los componentes no volátiles de la orina de macho tratado con LPS será menor respecto el tiempo que pasarán cerca de los componentes no volátiles de la orina de macho no tratado.

Esta hipótesis parte de la premisa de la veracidad de la primera. Al ser atractivos los componentes no volátiles de la orina de macho no tratado la orina de macho tratado con LPS debería de ser evitada por los ratones hembra de nuestra muestra. Estas dos ideas se extraen directamente de los artículos antes citados que han pasado los criterios de revisión por pares para ser publicados. Sin embargo, no hemos encontrado evidencia a este respecto en nuestros experimentos con orina, proporcionando estos, a nuestro parecer, una sólida

base para negar la veracidad de estas ideas respecto a la capacidad feromonal de las quimioseñales de enfermedad y atractivas que hipotéticamente tiene la orina de macho *Mus musculus* para las hembras de esta especie, al menos en nuestras condiciones experimentales.

La cuarta y la quinta hipótesis de los estudios con orina fueron las siguientes:

$$\left(\begin{array}{c} 4. T(V)_{\delta noT} = T(V)_{\delta siT} \\ y \\ 5. [T(V)_{\delta noT} \& T(V)_{\delta siT}] > T(V)_{\delta} \end{array} \right)$$

es decir, nosotros hipotetizamos para los tres experimentos de orina en la fase de exposición solo a volátiles que: (4) el tiempo que los sujetos de nuestra muestra pasarán cerca de los volátiles de macho no tratado con LPS será igual al tiempo que pasarán cerca de los volátiles de macho tratado; y (5) El tiempo que pasarán cerca de los volátiles de la orina de macho (tratado y sin tratar con LPS) será mayor que el tiempo que estos pasarán cerca de la orina de hembra.

La primera hipótesis deriva de los estudios que concluyen la existencia de RPF en el órgano vomeronasal (Liberles et al., 2009; Rivière et al., 2009) y la dependencia del buen funcionamiento de este para el desarrollo de la conducta de evitación de congéneres con enfermedad (Boillat et al., 2015) sugiriendo este hecho que es necesaria la acción del OVN (es decir, es necesario que los receptores sensitivos entren en contacto con los componentes no volátiles de la orina) para generar la conducta de evitación ante enfermedad. Por otro lado, teniendo en cuenta el carácter aprendido de la tendencia a explorar los componentes volátiles de la viruta de macho (Moncho-Bogani et al., 2002) y que los ratones hembra de nuestra muestra han estado previamente en contacto con machos de su misma especie durante su estabulación en la casa de crianza (Janvier), desarrollamos la quinta hipótesis en la que comprendíamos que los componentes volátiles de la orina provocarían que nuestra muestra estuviese más tiempo en la zona de los volatines de macho que en los de hembra.

Los resultados obtenidos en nuestras pruebas no dan apoyo empírico a ninguna de las dos hipótesis. Para la comprobación de la cuarta hipótesis podemos observar que

pese a que en la condición experimental donde se usan los estímulos de orina de macho tratado frente a la orina de macho sin tratar la hipótesis nula no se rechaza (i.d., indicando que los sujetos pasan tiempos similares en los dos estímulos), si miramos las otras dos condiciones experimentales encontramos datos que lo matizan.

Así pues, en la condición experimental en la que se enfrentan la orina de hembra con la orina de macho sin tratar no encontramos preferencia en la condición en la que solo se permite el acceso a volátiles. Esto, aparte de negar la quinta hipótesis presentada (*id est*, los componentes volátiles de la orina de macho no son explorados más que los componentes volátiles de la orina de hembra), en conjunto con el resultado que muestra que los ratones hembra pasan de forma estadísticamente significativa mayor tiempo cerca de los componentes volátiles de orina de macho tratado al ser enfrentados a los mismos componentes de la orina de hembra, nos muestran una desigualdad en la capacidad de motivar la presencia de hembras cerca de los componentes volátiles según el tratamiento recibido por los machos. Es decir, la cuarta hipótesis queda rechazada al no ser experimentalmente iguales

los componentes volátiles de los dos tipos de orina de ratón macho.

A continuación, discutiremos las hipótesis referidas al estudio de la activación neuronal mediante el marcaje de la proteína c-Fos. La fórmula de la primera de ellas es la siguiente:

$$\left(8. A(\text{BOA})_N < [A(\text{BOA})_{\text{♂siT}} \ \& \ A(\text{BOA})_{\text{♂noT}}] \right)$$

es decir, el número de células marcadas en la capa granular de BOA del grupo expuesto a estímulo neutro será menor que en número de células las marcadas en los grupos expuestos a orina. Esperamos, por lo tanto, una activación en esta región ante las quimioseñales no volátiles presentes en la orina de ratón macho ya que las células granulares del BOA tienen una función inhibitoria sobre las mitrales, activándose las primeras en respuesta a la activación de las últimas para ejercer un control local en el bulbo de la información sensorial (Balu, Pressler y Strowbridge, 2007; Chen et al., 2000; 2002; Mori, 1999). El BOA recibe conexiones directas del OVN (Spehr et al., 2006), que como explicamos en el apartado de la introducción es encargado de detectar las señales químicas presentes en el ambiente de

carácter no volátil (Chamero et al., 2012; Døving y Trotier, 1998) y es importante para el desarrollo de conductas sexuales típicas de hembras en ratones (Kimchi, Xu y Dulac, 2007; Pankevich, Baum y Cherry, 2004).

Como podemos observar en los resultados expuestos anteriormente, no encontramos diferencias significativas en el marcaje neuronal entre los diferentes grupos experimentales. Es decir, los resultados no nos permiten apoyar la hipótesis de partida, ya que nuestros resultados indican que la activación neuronal es independiente del estímulo presentado ya que no existen diferencias significativas en el marcaje de la proteína c-Fos de este núcleo.

La siguiente hipótesis referida a la neuroanatomía de los circuitos referidos a las conductas aversivas se centra en los núcleos posteroventral de la amígdala medial y al dorsomedial del hipotálamo ventromedial. La fórmula es la siguiente:

$$\left(\begin{array}{c} 9. \quad A(\text{MePV/VMHDM})_{\text{siT}} > \\ [A(\text{MePV/VMHDM})_{\text{noT}} \ \& \ A(\text{MePV/VMHDM})_N] \end{array} \right)$$

esto es, habrá un mayor número de células marcadas en los núcleos estudiados relacionados con conductas aversivas en el grupo expuesto a orina de macho tratado con LPS que los grupos no expuestos a esta orina. Esta hipótesis tiene su fundamento en la proyección del MePV con el VMHDM y la implicación de ambos ante la exposición a estímulos que señalan una amenaza hacia la supervivencia del animal (Choi et al., 2005; Silva et al., 2013; Perez-Gómez et al., 2015; Pardo-Bellver et al., 2012). Sin embargo, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en el marcaje de c-Fos en estos núcleos, siendo esta bastante similar entre los ratones hembra expuestos a estímulo neutro, orina de macho tratado y orina de macho sin tratar. Concluimos que la evidencia obtenida no nos permite apoyar la hipótesis anteriormente formulada, confirmando por lo tanto la hipótesis nula al no encontrarse afectado el marcaje de estos núcleos por el tipo de estímulo empleado

La última hipótesis de los experimentos usando como estímulo orina de ratón fue:

$$\left(\begin{array}{c} 10. \quad A(\text{MePD/VMHVL})_{\delta_{noT}} > \\ [A(\text{MePD/VMHVL})_{\delta_{siT}} \& A(\text{MePD/VMHVL})_M] \end{array} \right)$$

queriendo expresar con esta fórmula que las preparaciones histológicas de los animales hembra expuestos a orina de macho sin tratar presentarán un mayor conteo de células marcadas en los núcleos relacionados con conductas apetitivas que los expuestos a estímulo neutro y a orina de macho tratado con LPS. Como se comentó en el apartado de la introducción, el MePD se relaciona con conductas reproductivas (Choi et al., 2005; Wu y Tollkuhn, 2017; Fujiwara, Nitta y Chiba, 2016; Hosokawa & Chiba, 2010) y el VMH-VL posee un papel en el desarrollo de las conductas sexuales de las hembras (Blaustein, 2008; Flanagan-Cato, 2011). No obstante, nuestros resultados no aportan apoyo empírico a la hipótesis anterior al no existir diferencias significativas entre los grupos experimentales en ninguno de los núcleos referentes a esta hipótesis.

En conclusión, respecto al **experimento de activación neuronal**, el estudio inmunohistoquímico se corresponde con los resultados obtenidos en el estudio conductual. Al no haber obtenido diferencias significativas entre los grupos cabía esperar

encontrarnos con resultados similares al comprobar los efectos de las variables independientes sobre los datos del conteo de marcaje neuronal.

Conclusiones y Discusión

En general, nuestros estudios de orina de *Mus musculus* suponen a nuestro parecer una evidencia empírica sólida que desmonta los resultados obtenidos en la literatura que han generado las hipótesis antes construidas, al menos en lo referido al uso de orina como estímulo motivador de conductas de atracción o de evitación de enfermos con enfermedad. Los primeros tres protocolos presentados evalúan en un test de preferencia como las hembras reaccionan ante los componentes volátiles y no volátiles de la orina. Nuestros sujetos, en los tres experimentos, no encuentran más atractiva la orina de macho sin tratar respecto a los estímulos presentados como rivales en el test de preferencia pese a contener esta las proteínas urinarias mayores que provocan según la literatura atracción, incluidas entre ellas la D (Hurst y Beynon, 2004; Roberts et al., 2010; 2012). En el caso de nuestra orina, constatamos mediante una electroforesis la presencia de proteínas en el rango de la D

en las orinas de macho no tratado con LPS y macho tratado utilizadas, como nuestro equipo había realizado anteriormente en un artículo publicado con un modelo de enfermedad con *Aspicularis tetraptera* (Lanuza et al., 2014). A su vez, esta prueba mostró la ausencia de la banda correspondiente a la D en la orina de hembras. Por lo tanto, no parece probable que exista un problema en la capacidad de la orina utilizada en los experimentos presentados en esta tesis para provocar atracción.

Por otro lado, tampoco hemos encontrado el comportamiento de evitación a señales de enfermedad en ninguno de los tres experimentos realizados en la condición de exposición a no volátiles. Consideramos que este estudio presenta evidencia sólida de que la orina extraída a las cuatro horas después de la inyección de LPS no es suficiente para provocar respuestas de evitación en ratones hembra. Este hecho se repite en dos cepas (CD1 y C-57), comprobando así que este resultado no ha sido debido a la pérdida del gen que codifica el receptor de patógenos Fpr3 (Stempel et al., 2016).

Al respecto de los componentes volátiles encontramos como resultado significativo en los tres experimentos (cercano a la significación en el primero, pero significativo en los otros dos)

una tendencia a pasar más tiempo en cerca de los componentes volátiles de la orina de macho LPS al enfrentarla con los componentes volátiles de la orina de hembra en el test de preferencia, pero no al enfrentar macho sano con macho tratado con LPS. Explicamos este hecho basándonos en componentes volátiles novedosos que puedan atraer la atención de manera continuada de nuestra muestra. Los sujetos hembra de nuestra muestra fueron estabulados cerca de machos adultos antes de ser enviadas a nuestro laboratorio de experimentación en la Universidad de Valencia, haciendo que éstas adquiriesen experiencia con la orina de macho sin tratar. Sin embargo, los volátiles de la orina de macho tratado con LPS representan una novedad para ellos al nunca haber sido expuestos a ellos. Ante esta explicación, no obstante, surge la observación de que esta tendencia a estar cerca de los componentes no volátiles de la orina de macho tratado con LPS desaparece cuando estos son enfrentados en el test de preferencia a los mismos componentes de la orina de macho sin tratar. Además, los componentes volátiles de esta última orina no tienen la capacidad de generar atracción al enfrentarlos con orina de hembra, dando a entender de que estos carecen del poder de atraer la exploración en

nuestra muestra. De hecho, se ha demostrado que los componentes volátiles de la orina de ratón macho solo son atractivos después de aprender el patrón individual de estos después de haber entrado en contacto directo con la orina (Roberts et al., 2018). Por lo tanto, para que los ratones hembra de nuestra muestra presenten atracción por estos volátiles deberían de haber estado en contacto con los mismos machos en la casa de cría. Esta convivencia resulta poco probable, por lo que este hecho repetido en los tres experimentos permanece aún por explicar.

Todo lo comentado anteriormente queda reforzado por la fase conductual y el estudio de la expresión de c-Fos realizado sobre orina de macho tratado y sin tratar con LPS ya que las hipótesis de ambos experimentos se entrelazan como hemos visto en el apartado anterior.

Finalmente, comentar que uno de las limitaciones de este estudio puede haber sido la falta de control sobre el ciclo estral de los sujetos experimentales. En un estudio previo nuestro equipo mostró que independientemente de las hormonas del ciclo estral los ratones hembra mostraban preferencia por viruta de macho *Mus musculus* (Moncho-Bogani et al., 2004; 2002).

Nomoto y Lima (2015), por su parte, encontraron que ratones hembra preferían hacer contacto nasal con machos en vez de con hembras independientemente de si estaban en estro o en diestro. Sin embargo, existen otros estudios en la literatura que han encontrado un efecto de las hormonas gonadales en las conductas de atracción hacia estímulos de macho en roedores (e.g.: McArthy et al., 2018; Xiao et al., 2004). Así pues, para comprobar si los resultados se debían a que nuestros ratones hembra no se encontraban en la fase de estro, diseñamos el siguiente experimento.

Experimentos con Viruta

El primero de los experimentos realizados, como ya adelantamos en el apartado anterior fue el **experimento de viruta vs orina/estro vs no estro**. En éste separamos una muestra de 24 sujetos hembra *Mus musculus* de la cepa C-57 en cuatro grupos:

	Orina	Viruta
Estro	n ₁ = 8	n ₂ = 8
No Estro	n ₃ = 8	n ₄ = 8

Tabla 12: Muestra de la distribución de la muestra (N=24) en los cuatro grupos experimentales (n=8) extraído de diseños 2x2 con las variables experimentales tipo de estímulo (viruta vs orina) y fase del ciclo estral (estro vs no estro).

Para provocar el inicio de la fase estral utilizamos el método usado por Roberts y su equipo (2010) aprovechando el efecto Whitten de las feromonas de ratón macho (Whitten, 1956). El test de preferencia consistió en la colocación de estímulo de macho en un lado de la caja de experimentación (250mm x 500mm x 300mm) enfrentada a estímulo de hembra colocada en el contrario.

En el siguiente experimento de viruta usamos como estímulo **viruta ensuciada por un macho tratado con LPS durante 4 horas**. La muestra consistió en diez ratones hembras que fueron expuestas en tres ensayos distintos a viruta limpia vs viruta limpia; viruta limpia vs viruta de macho tratado con LPS; y viruta limpia vs viruta de macho no tratado.

Finalmente, el mismo diseño experimental que en el procedimiento anterior fue repetido en el siguiente protocolo de **viruta de macho tratado con LPS durante 12 horas**. Las diferencias entre estos radican en que la muestra de 16 ratones la mitad eran hembras y la otra mitad machos y, por otro lado, el tiempo en que los machos tratados con LPS estuvieron en contacto con la viruta usada de estímulo fue de doce horas.

Interpretación de los Resultados

Como en el apartado anterior, para discutir los resultados obtenidos utilizaremos la formulación de las hipótesis experimentales realizadas para cada uno de los procedimientos. Así, en el procedimiento **de viruta vs orina/estro vs no estro**, la primera hipótesis formulada es:

$$\left(\begin{array}{c} 11. \quad T(Vr) > T(Or) \end{array} \right)$$

es decir, el tiempo que los animales de nuestra muestra se encuentran cerca de él estímulo de viruta será estadísticamente mayor que el tiempo que exploran el estímulo de orina. Como podemos observar en los resultados, los datos nos aportan

diferencias estadísticamente significativas para dar confirmación empírica a la hipótesis. Así, en este protocolo experimental nuestros ratones hembra han encontrado más interesante de explorar, en general, el estímulo de viruta manchada que la orina de *Mus musculus*. Este resultado puede deberse a una mayor abundancia de quimioseñales presentes en la viruta manchada, ya que ésta ha estado en contacto con los animales durante varios días y contiene secreciones y excreciones que van más allá de la orina.

Por otro lado, presentamos a continuación la siguiente hipótesis de trabajo:

$$\left(\begin{array}{c} 12. \quad T(E) = T(\text{noE}) \end{array} \right)$$

esto es, el tiempo en que los sujetos de nuestra muestra estarán cerca de los estímulos será igual en los grupos en los que hemos provocado el estro como en los que no. El análisis estadístico de los datos nos aporta evidencia contraria a la afirmación de esta hipótesis, al ser únicamente el grupo no expuesto a viruta de macho en la caja de estabulación para provocar su entrada en

estros los que presentan diferencias estadísticamente significativas entre la exploración de la viruta de hembra frente a la viruta de macho. Sin embargo, cabe comentar que la exploración del grupo Estro/Viruta da resultados casi significativos, con unas marcadas diferencias en la exploración, aunque no lleguen a pasar el criterio de $\alpha = 0.05$, siendo este resultado contradictorio con lo encontrado por parte de la bibliografía. Por otro lado, los resultados respecto a los estímulos de orina sí que otorgarían evidencia positiva para esta hipótesis, dando a entender que la exploración de la orina no se ve afectada por el estado en el ciclo estral de los ratones hembra.

Comentaremos las siguientes dos hipótesis del estudio con viruta y orina simultáneamente. Estas fueron formuladas como sigue:

$$\left(\begin{array}{l} 13. \quad T(\text{Vr})_{\text{♂}} > T(\text{Vr})_{\text{♀}} \\ \quad \quad \quad \& \\ 14. \quad T(\text{Or})_{\text{♂}} > T(\text{Or})_{\text{♀}} \end{array} \right)$$

Id est, (13) el tiempo en que nuestra muestra pasará cerca del estímulo de viruta ensuciada por un macho será mayor el tiempo que pasarán cerca de la viruta ensuciada por una hembra y (14)

el tiempo que nuestros ratones pasarán cerca de la orina de macho será mayor que el tiempo que pasarán cerca de la orina de hembra. En este caso encontramos resultados estadísticamente significativos en los grupos expuestos a viruta, dando evidencia a la formulación de la hipótesis 13 de que las señales que posee la viruta de macho inducen más a la exploración que la viruta de hembra, como ya encontramos en estudios anteriores en nuestro laboratorio (Moncho-Bogani et al., 2002, 2004). Por otro lado, no encontramos evidencia para la hipótesis 13 al confirmar las herramientas estadísticas utilizadas la hipótesis de igualdad entre el tiempo que pasan los animales de nuestra muestra cerca de la orina de hembra y la orina de macho, contradiciendo algunos estudios de la literatura.

El siguiente experimento de viruta que realizamos fue el **experimento con viruta de macho tratado con LPS durante 4 horas**. Sin embargo, debido a la similitud de las hipótesis formuladas hablaremos simultáneamente de la hipótesis 19 del **experimento con viruta de macho tratado durante 12 horas**. Así, las primeras hipótesis fueron formuladas como sigue:

macho no tratado tienden a acercarse a 1 (**Tabla 13**), queriendo decir que en estos experimentos la viruta de macho normal no provoca atracción al ser colocada en la caja de experimentación frente a un estímulo neutro. Asimismo, encontramos al observar la media de la condición de viruta de macho tratado con LPS que las medias tienden a alejarse de 1, incluso por encima de las medias de la condición de macho no tratado con LPS. Esto nos indica una tendencia a explorar el estímulo de viruta con señales de enfermedad al este ser enfrentado a viruta neutra, siendo esto contrario a la literatura que muestra conductas de evitación de enfermedad (Penn et al., 1998; Lanuza et al., 2014; Kavaliers y Colwell, 1995a; 1995b; Kavaliers et al., 2003; Kavaliers, Colwell y Choleris, 1998; Arakawa, Cruz y Deak, 2011; Kavaliers y Choleris, 2018; Kavaliers, Ossenkopp y Choleris, 2020; Ehman y Scott, 2001; 2002) pero en la línea de lo encontrado en los experimentos con orina de ratón, donde encontrábamos una tendencia a estar cerca de los componentes volátiles de la orina de macho tratado con LPS al ser ésta enfrentada con los componentes volátiles de orina de hembra.

Condición	LPS I		LPS II	
	♂noT	♂siT	♂noT	♂siT
M	1,02	1,17	1,16	1,26
EEM	0,10	0,16	0,16	0,16

Tabla 13: Media (M) y error estándar de la media (EEM) de las ratios en las condiciones de viruta de macho no tratado con LPS (♂noT) y viruta de macho tratado con LPS (♂siT) en los experimentos de viruta de LPS I y II.

La hipótesis que explicamos a continuación hace referencia únicamente al experimento de **viruta manchada durante cuatro horas** por macho tratado. Su formulación es la siguiente:

$$\left(18. \quad T_{\text{♂siT}} \leq T_N \right)$$

es decir, el tiempo que pasarán los ratones hembra cerca del estímulo de macho tratado con LPS durante cuatro horas será menor al que pasan cerca del estímulo neutro. Los resultados obtenidos en las pruebas estadísticas nos dan un efecto no significativo de la variable “Tipo de estímulo”, mostrando entonces que no hay diferencias entre grupos. Como explicábamos en la hipótesis anterior, de hecho, la tendencia observada en nuestra muestra es a explorar más la viruta

muestra indican que la hipótesis de igualdad entre condiciones se mantiene al no haber efectos significativos de las variables estudiadas. Consideramos, no obstante, que pese a no haber alcanzado los criterios de significación la estadística descriptiva nos aporta información que merece la pena discutir sobre las tendencias de conducta de machos y hembras ante los estímulos experimentales. Como podemos observar en la **Tabla 14**, existen diferencias en las tendencias de las medias de los ratios entre los ratones machos y los ratones hembra. En el caso de la hipótesis anterior, en concreto, los machos exploran ambos tipos de viruta con la misma tendencia de atracción, aunque con una ligera tendencia a explorar más la viruta de macho no tratado. Sin embargo, las hembras presentan una tendencia a preferir la viruta de macho tratado con LPS.

Condición	Machos		Hembras	
	♂noT	♂siT	♂noT	♂siT
M	1,26	1,17	1,03	1,38
EEM	0,21	0,29	0,16	0,39

Tabla 14: Media (M) y error estándar de la media (EEM) de los ratios de machos y hembras en las condiciones de viruta de macho no tratado con LPS (♂noT) y viruta de macho tratado con LPS (♂siT) en el experimento de viruta de LPS II.

Continuamos con las siguientes hipótesis que hacen referencia a las **diferencias conductuales entre los dos sexos** de la muestra. La primera de ellas hace referencia a la **viruta de macho no tratado (22)** y la última al comportamiento ante **viruta de macho tratado con LPS (23)**, siendo su formulación como sigue:

$$\left(\begin{array}{l} 22. \quad T(\♂)_{\delta noT} \leq T(\♀)_{\delta noT} \\ \quad \quad \quad \& \\ 23. \quad T(\♀)_{\delta siT} = T(\♂)_{\delta siT} \end{array} \right)$$

id est, (22) el tiempo que los machos de nuestra muestra pasarán cerca de la viruta de macho sin tratar será igual o inferior al tiempo que las hembras pasen cerca del mismo; y, por último, (23) el tiempo que los ratones hembra pasarán cerca de la viruta de macho tratado con LPS durante 12 horas será igual al que pasen los ratones macho de nuestra muestra. Como en el caso anterior, las pruebas paramétricas realizadas no arrojan resultados significativos, pero si observamos los estadísticos descriptivos (**Tabla 14**) podemos observar que respecto a la hipótesis 22 no solo no es correcta esta tendencia, sino que los ratones macho tienden a explorar más que las hembras el

estímulo de macho sano al tener una ratio 0,23 puntos superior al de las hembras con un error estándar de la media similar. Por otro lado, la hipótesis 23 tampoco consigue confirmación empírica en este análisis especulativo de los estadísticos descriptivos, existiendo una diferencia entre ambos sexos de 0,21 en las ratios del tiempo que pasan cerca de la viruta de macho tratado con LPS.

Conclusiones y Discusión

En este apartado hemos observado que los ratones hembra de nuestra muestra tienden a explorar más la viruta sucia por individuos de la especie *Mus musculus* que la orina de individuos de la misma especie. Esto puede ser debido a la mayor cantidad de quimioseñales (e.g. orina, heces, pelo, etc.) que posee la viruta respecto a la orina. Para comunicarse intrasexual y entresexualmente los machos y las hembras de ratón usan diversos tipos de estímulos como la orina, fluidos genitales u otras secreciones (Hurts, 1990a, 1990b, 1990c; Hurst y Beynon, 2004), por lo que cabe pensar que usar viruta ensuciada por ratón tendrá más potencia de señalización que el

uso de orina, y por lo tanto de provocar comportamientos de exploración o atracción.

Asimismo, concluimos, como en estudios anteriores de nuestro equipo (Moncho-Bogani et al., 2002, 2004) y en otros de otros laboratorios (Nomoto y Lima, 2015) que las fluctuaciones de las hormonas gonadales propias del ciclo estral en ratones no afectan a su exploración por las quimioseñales de los estímulos de macho, contradiciendo así trabajos que apuntan a lo contrario. Por otro lado, cabe destacar el posible papel que el aprendizaje (esto es, el contacto previo con hembras en estro) puede tener en el desarrollo de la preferencia por quimioseñales como se ha visto en ratas (Carr et al., 1965; Le Magnen, 1951; Lydell y Doty, 1972) o en *Canis familiaris* (Doty y Dunbar, 1974). Sin embargo, una de las limitaciones que posee el experimento de **Orina vs Viruta/ Estro vs no Estro** consistió en el método de provocar la fase estral en la muestra, extraído de Roberts et al., 2010. Este método tiene la ventaja de ser menos invasivo para los sujetos de la muestra pues un mejor control de la fase estral de las ratonas supondría ovariectomizar a las ratonas y controlar las hormonas sexuales (e.g. Moncho-Bogani et al., 2004; McCarthy et al., 2018; Dey et al., 2015). Para sustentar

mejor esta conclusión un método de control de las variables hormonales debería de ser utilizado.

La conclusión final de los experimentos realizados en este apartado es que las señales presentes en la viruta manchada por LPS en los modelos de 4 horas y 12 horas no es suficiente para generar un comportamiento de evitación. Así, tratando de utilizar viruta manchada, que habíamos comprobado en el experimento de viruta frente a orina presentado al principio del apartado con mayor capacidad de provocar atracción que la orina, no hemos sido capaces tampoco encontrar pruebas de que el modelo de enfermedad usando LPS pueda activar el sistema inmune conductual. Este modelo, pese a la literatura que ha generado (Boillat et al., 2015), no encuentra apoyo empírico en ninguno de nuestros experimentos realizados.

Experimento con Animal Anestesiado

En el experimento usando un modelo de animal anestesiado tratado con LPS expusimos a ocho ratones hembra y ocho ratones macho a un test de preferencia en el que tenían a cada lado de la caja de experimentación un animal anestesiado con Ketamina (100g/ml) y Metomidina (0,5mg/ml). Por cada

situación experimental uno de estos animales anestesiados fue tratado con LPS (1mg/kg; 0,2mg/ml en NaCl al 9%) en torno a 12 horas antes del protocolo de experimentación mientras que el otro solo recibió la inyección anestésica.

Interpretación de los Resultados

A continuación, comentaremos las hipótesis de trabajo que describimos al principio de esta parte de la tesis al respecto de este experimento. Así, la hipótesis 24 fue formulada utilizando la muestra completa mientras que las hipótesis experimentales 25 y 26 son variaciones de la misma especificando según el sexo de la muestra:

$$\left(\begin{array}{l} 24. \quad T_{noT} > T_{siT} \ \& \ T_N \\ \quad \quad \quad \& \\ 25. \quad T(\♂)_{noT} > T(\♂)_{siT} \ \& \ T(\♂)_N \\ \quad \quad \quad \& \\ 26. \quad T(\♀)_{noT} > T(\♀)_{siT} \ \& \ T(\♀)_N \end{array} \right)$$

esto es, el tiempo en que los ratones de nuestra muestra pasarán cerca del animal anestesiado no tratado será mayor al tiempo que pasarán cerca del animal tratado con LPS y del estímulo neutro. Así pues, la evidencia experimental no permite

corroborar ninguna de las anteriores hipótesis. Las pruebas de inferencia estadística utilizada nos muestran que ninguna de las variables analizadas tiene efectos significativos sobre la conducta de las ratonas. Como podemos observar en las ratios de la **Figura 42**, todas ellas indican una tendencia a permanecer cerca de ambos animales anestesiados, si bien con una tendencia a explorar más a los animales tratados. En cuanto a las diferencias por sexo, no encontramos diferencias estadísticamente significativas, aunque la ratio de los machos parece indicar una tendencia a explorar más que las hembras al animal tratado con LPS.

Por otro lado, las ratios del estímulo neutro (una placa de Petri vacía) en el total de la muestra nos indican una tendencia a explorar ambos lados de la caja de experimentación por igual. Sin embargo, parece que existe cierto sesgo por parte de las hembras a explorar uno de los lados más que el otro, sesgo que atribuimos al azar o a condiciones inocuas de la situación experimental. Al observar los videos de las grabaciones de la tercera sesión de habituación usadas para las mediciones encontramos que los animales simplemente se pasan más tiempo en un lado realizando conductas de cuidado sin mostrar

interés concreto por ninguna característica de la caja de experimentación.

Conclusiones y Discusión

Nuestros resultados van en contra de la idea de que los ratones tratados con LPS generen señales de enfermedad que afecten a la conducta de otros congéneres activando el SIC. Existen dos estudios que estudian en ratones las conductas de evitación de enfermedad utilizando para ello especímenes tratados con LPS vivos. En primer lugar, el estudio de Boillat et al. (2015) comentado en la introducción de esta parte de la tesis, en que se realizaron dos experimentos con este modelo: 1) presentando solo a un macho tratado con LPS o con control anestesiado; y 2) presentando en un test de preferencia un animal tratado con LPS y un animal control. Los machos de la muestra utilizada mostraron un comportamiento estadísticamente significativo de evitación hacia los machos tratados con LPS.

Por otro lado, el estudio realizado por Kwon et al. (2021), en el que en la parte conductual del mismo diseñaron una situación experimental en la que, para medir los cambios en la

conducta copulatorio de macho, presentaron individualmente a una muestra de machos a una hembra tratadas con LPS, control o sin tratar en una caja de experimentación. Los resultados del análisis de las variables conductuales aportaron efectos significativos en la reducción de las cópulas realizadas por parte de los machos expuestos a hembras tratadas con LPS.

Nuestro estudio pretendía replicar los efectos encontrados por el equipo de Rodriguez (Boillat et al., 2015) en una muestra de machos y hembras utilizando un animal anestesiado como estímulo más completo que la orina de animal tratado con LPS utilizada en experimentos anteriores. Sin embargo, no pudimos replicar los resultados de activación del SIC encontrados ni por estos ni por el equipo de Choi (Kwon et al., 2021). Una diferencia que presenta nuestro estudio respecto a estos dos estudios reside en la cantidad de tiempo entre la inyección intraperitoneal de LPS y el test. En el caso de Boillat et al. (2015) fue de cuatro horas y en el de Kwon de dos horas, mientras que nosotros aumentamos el tiempo de exposición a LPS a 12 horas. Para la obtención de la orina de macho tratado con LPS seguimos el protocolo del equipo de Rodríguez, ya que como comentábamos en la introducción habían obtenido resultados estadísticamente

positivos utilizando también orina de LPS. El aumento a 12 horas pretendía aumentar la afectación del estado de enfermedad del animal para intentar aumentar la potencia de las posibles señales de enfermedad. De hecho, el comportamiento de enfermedad encontrada en los ratones pasadas 12 horas de la inyección era una muestra de un fuerte efecto de la misma. Así pues, parece que el funcionamiento de posibles señales de enfermedad que activan el SIC de conespecíficos con este modelo no es afectado positivamente por aumentar el tiempo de la exposición del animal emisor a un estado de enfermedad.

Experimento con D y con PF

El último experimento que vamos a presentar en la parte II sobre el modelo de LPS es en el que utilizamos la proteína urinaria principal 20 (D) y f-Met-Leu-Phe (PF). En este procedimiento se usaron 16 animales *Mus musculus* de la cepa C-57 que fueron expuestos a los estímulos antes mencionados en diferentes test.

Interpretación de los Resultados

A continuación, comentaremos las hipótesis de trabajo que comentamos al principio de la esta parte de la tesis al respecto de este experimento. Así, la primera hipótesis fue formulada como sigue:

$$\left(T_D > T_{PF} \ \& \ T_N \right)$$

id est, el tiempo que estarán cerca del estímulo de D será superior al tiempo que pasen cerca del estímulo PF y del estímulo neutro (solución salina). En nuestro experimento no hemos encontrado evidencia empírica de que la D provoque mayor exploración que el estímulo neutro o que los PF, contradiciendo así la literatura publicada sobre los efectos de tipo feromonal en la conducta atribuidos a esta proteína urinaria principal (Roberts et al., 2010, 2012, 2018; Liu et al., 2017; Martin-Sanchez et al., 2015).

Finalmente, la última hipótesis de la parte II de la tesis fue construida de la siguiente manera:

$$\left(T_{PF} < T_N \right)$$

es decir, los animales de nuestra muestra pasarán menos tiempo explorando el estímulo PF que el estímulo neutro. El sentido de esta hipótesis es que esperamos que los PF, como análogos de señales de enfermedad (Liberles et al., 2009; Rivière et al., 2009; Demir et al., 2020) generasen conductas de evitación y activasen el sistema inmune comportamental, permitiéndonos observar en los ratones de la muestra la intención de no exponerse a estos. Sin embargo, no encontramos evidencia empírica para esta hipótesis, encontrando que la hipótesis de igualdad se mantiene.

Conclusiones y Discusión

En los experimentos realizados en este apartado no encontramos ningún efecto conductual de la PUP 20 sobre la conducta de los animales de nuestra muestra. Este resultado se encuentra en la misma línea que los resultados de los experimentos con orina. La orina de macho normal y parasitado presenta cantidades similares de PUP 20 al ser la producción de esta y otras PUPs dependientes de andrógenos (Lanuza et al., 2014; Amstrong et al., 2005). Atendiendo entonces a nuestros

resultados concluimos que no hemos encontrado evidencia empírica para un efecto atractivo para las hembras de la D o de las PUPs contenidas en la orina de especímenes *Mus musculus*.

Finalmente, en nuestro experimento de D y PF hemos comprobado que los PF utilizados en nuestro experimento no tienen la capacidad para generar una respuesta de evitación de enfermedad. Otros investigadores han encontrado la activación de específica del RPF3 en el OVN ante la secuencia de péptidos formilados f-MKKFRW presente en la proteína bacteriana MgrB (Bufe et al., 2019). La activación del RPF3 es suficiente para iniciar conductas de evitación y que ratones con modificaciones genéticas que generan disfunción en este no activan conductas del SIC. Además, en el estudio de Bufo y su equipo (2019), pese a encontrar al contrario que nosotros conductas de evitación de conoespecíficos ante animales anestesiados tratados con LPS, no encontraron activación los RPF3 en esta conducta. Concluyen, pues, que otros quimiorreceptores están implicados en la modulación de esta conducta.

Conclusiones:

1. Primero, queda constatado la capacidad atractiva de la viruta manchada por un ratón macho en hembras de la misma especie, independientemente de la fase del ciclo estral en que se encuentren.
2. Por otro lado, en los experimentos de preferencia de orina, nuestro diseño experimental nos indica una atracción hacia los componentes volátiles de la orina de macho tratado con LPS. Esta preferencia se muestra cambiando diferentes condiciones experimentales como el tamaño de la caja (250mm x 500mm x 300mm vs 895mm x 150mm x 300mm), la cepa (C57 vs CD1) o el experimentador encargado del manejo de los animales.
3. La viruta manchada con macho tratado con LPS no parece provocar rechazo o reducción en la exploración de la viruta respecto a la viruta manchada por macho sin tratar.

4. Así mismo, tampoco usando directamente machos anestesiados tratados con LPS encontramos un efecto significativo sobre la conducta de las ratonas al colocarlas en un test de preferencia con machos sin tratar.

Parte III: Estudios con Kairomonas

Introducción:

“As soon as there was life, there was danger”

Joseph E. LeDoux

Con esta transformación de la frase del poeta estadounidense Ralph Waldo Emerson el conocido investigador de los circuitos amigdalinos que median la adquisición del aprendizaje pavloviano de conductas condicionadas de supervivencia defensiva Joseph E. LeDoux pretende enfatizar, en un artículo de reciente publicación (2022), la ineludible relación que existe entre la evolución y la conducta. Las conductas defensivas, cuya intención es defender la vida de seres vivos, son una consecuencia de la necesidad de supervivencia y reproducción que es un producto inseparable del hecho de vivir. Así, desde seres unicelulares hasta las ramas celularmente más complejas de vertebrados, presentarían un Sistema de Supervivencia Defensiva (SSD) relativamente inconsciente que los llevaría a evitar los elementos nocivos del ambiente.

Así pues, protozoos unicelulares son capaces de reaccionar acercándose o alejándose a estímulos externos según sean beneficiosos o posiblemente dañinos (Jennings, 1906). Esta conducta de acercamiento o evitación también se ha encontrado en bacterias (Vladimirov y Sourjik, 2009) y en ambos casos se puede considerar como una forma de comportamiento similar desde un punto de vista evolutivo al de organismos más complejos (LeDoux, 2022). Todos los organismos tienen que obtener alimentos, evitar el daño, sobrevivir y reproducirse.

Los pequeños mamíferos son especies en constante peligro de depredación por parte de otros mamíferos, aves o reptiles. Estos, en coevolución con sus depredadores, han desarrollado una serie de conductas específicas de especie (Apfelbach et al., 2005) dependientes de las características corporales que los individuos poseen (LeDoux, 2022). Así, los roedores poseen su propio repertorio de conductas defensivas motivadas por la detección sensorial del peligro de depredación. Al tratarse de una especie macrosmática, la detección de quimioseñales olfativas es su principal forma de evaluar la presencia de especies amenazantes, siendo capaces estos olores de iniciar una serie de cambios fisiológicos y

Parte III: Estudios con Kairomonas

comportamentales adaptativos (Dielenberg y McGregor, 2001; Apfelbach et al., 2005). Las conductas adaptativas que motivan las señales de depredador (*i.e.* las kairomonas que mencionábamos en el apartado introductorio de esta tesis) inician una serie de conductas estereotipadas que son usadas en investigación para la medición de SSD y se denominan “respuestas defensivas”. Estas respuestas se dan tanto en laboratorio como en ambientes naturales (Dielenberg y McGregor, 2001; Apfelbach et al., 2005; Carobrez, Teixeira y Graeff, 2001; Fendt, 2006) y consisten en conductas de evitación, huida, parálisis, conducta de exploración de riesgo (en la se acerca el hocico durante un corto periodo de tiempo aplanando la espalda para mantener las patas traseras alejadas del posible peligro).

Kairomonas

Tanto los ratones como las especies carnívoras que los depredan son macrosmáticos, señalando que las quimioseñales olfativas presentes en el medio juegan un papel importante en su supervivencia. Estas especies, en su relación de presa-depredador, han coevolucionado a lo largo de la filogenia (Abrams, 2000; Dietl y Kelley, 2002) y podemos encontrar en la literatura algunos estímulos que parecen activar de manera innata el sistema neuronal de supervivencia defensiva en la especie *Mus musculus* (véase **Tabla 15**).

<i>Molécula</i>	<i>Fuente</i>	<i>Recept</i>	<i>Órgano Sensorial</i>	<i>Conducta</i>
<i>Pheniletilamina</i>	Orina de depred.	RATA4	EOP	Evitación
<i>Trimetiltiazolina</i>	Heces de Zorro	Desc.	EOP	Evitación
<i>MUP-13</i>	Orina de Rata	Desc.	OVN	Defensiva
<i>Feld-4</i>	Saliva de Gato	Desc.	OVN	Defensiva

Tabla 15: Tabla explicativa de las principales quimioseñales que procedentes de depredadores y que provocan una respuesta adaptativa en ratones. Modificado de Ihara, Yoshikawa y Touhara, 2013.

Parte III: Estudios con *Kairomonas*

La orina de depredador, utilizada por la mayoría de estas especies para marcar el territorio (Gese y Ruff, 1997; Mellen, 1993), produce en roedores conductas de evitación y activación del SSD. Así, Fendt (2006) expuso a una muestra de ratas a orina de depredadores (gatos monteses, pumas, zorros, coyotes y lobos) y de animales herbívoros (hembras de caballos y vacas) encontrando un efecto estadísticamente significativo de la orina de depredador para las conductas defensivas medidas (e.g. conducta de evitación). La molécula a la que se atribuye estas conductas defensivas es la 2-Pheniletilamina, presente en grandes cantidades en la orina de animales carnívoros (Ferrero et al., 2011). Los receptores para los volátiles de la orina de depredador, los RATA, han sido encontrados en el EOP de ratones, así como en el de humanos (Liberles y Buck, 2006), activando la 2-Pheniletilamina los receptores RATA-4 (véase **Tabla 15**; Ferrero et al., 2011). Sin embargo, en la orina de lobos (*Canis lupus*), se ha encontrado que moléculas de la familia de las Pirazinas son suficientes para provocar conductas defensivas en ratones, activando estas el BOA (Osada et al., 2015, 2017, 2014)

Aunque los zorros son considerados como depredadores generalistas (Hanski et al., 1991), los ratones representan un gran porcentaje de las presas de las que éstos se alimentan comparados con otros depredadores (Leckie et al. 1998; Díaz-Ruiz et al. 2013). Las heces de zorro (*Vulpes vulpes*) fueron descritas en 1980 con la capacidad de iniciar conductas de evitación en roedores (Vernet-Maury, 1980), en concreto una molécula volátil presente en éstas: 2,5-dihidro-2,4,5-trimetilthiazoline (TMT). Así, la investigación ha encontrado que este compuesto provoca la aparición de conductas de supervivencia defensiva ante depredadores tales como parálisis, huida y la evitación del estímulo (e.g. Storsberg et al., 2018; Fendt et al., 2018; Homiack et al., 2017; Holmes y Galea, 2002). No obstante, en otros estudios no se ha encontrado este efecto al exponer a ratas a TMT. En un estudio del equipo de Agmo en la Universidad de Tromsø en Noruega expusieron a una muestra de ratas a una serie de estímulos aversivos en un entorno seminatural formado por una caja de experimentación grande con diferentes compartimentos que intentan proporcionar un entorno más completo y cercano al estado salvaje (Le Moëne y Agmo, 2018). Entre estos estímulos

se encontraba el TMT, que pretendían usar para comprobar su efecto en la frecuencia de las conductas de cópula y paracopulatorias en ratas. Los autores no encontraron un efecto significativo de esta molécula.

Por otro lado, la activación de las conductas típicas del sistema de supervivencia defensiva en roedores ha sido constatada para los estímulos de gato presentados usando collares que han estado durante cierto tiempo colocados en el cuello de estos (McGregor et al., 2002; Staples et al., 2008), usando orina (Voznessenskaya, 2014) y usando saliva (Papes et al., 2010). La proteína Feld4, análoga a las PUP en ratas y ratones, es un alérgeno presente en grandes cantidades en la saliva de los gatos (Smith et al., 2004; Satyaraj et al., 2019; Grönlund et al., 2010) y es detectada por las neuronas sensitivas en el OVN (Papes et al., 2010) provocando respuestas defensivas. Por otro lado, la PUP-13 presente en la orina de rata, también se ha comprobado su capacidad de provocar conductas defensivas en ratones activando el OVN (Papes et al., 2010).

Circuito de Supervivencia Defensiva

Para estudiar la neuroanatomía de las conductas defensivas para la supervivencia del individuo podemos encontrar dos enfoques experimentales mayoritarios: el uso de paradigmas de condicionamiento pavloviano y la exposición directa a estímulos procedentes de animales depredadores para iniciar conductas instintivas (incondicionadas) relacionadas con el SSD (LeDoux, 2022; Canteras y Blanchard, 2008). De ambos modelos se han desprendido dos circuitos neuronales relacionados, pero diferentes entre sí, con los núcleos neuronales del complejo amigdalino poseyendo un papel preponderante (Canteras y Blanchard, 2008; Martínez-García y Lanuza, 2018; LeDoux, 2022). Así, lesiones en el núcleo central de la amígdala, que tiene un papel tanto en la conducta condicionada como en la incondicionada ante estímulos que provocan SSD, provoca grandes impedimentos para el desarrollo del condicionamiento, pero menores ante la conducta

innata ante depredadores (De Oca y Fanselow, 2004; Li et al., 2004).

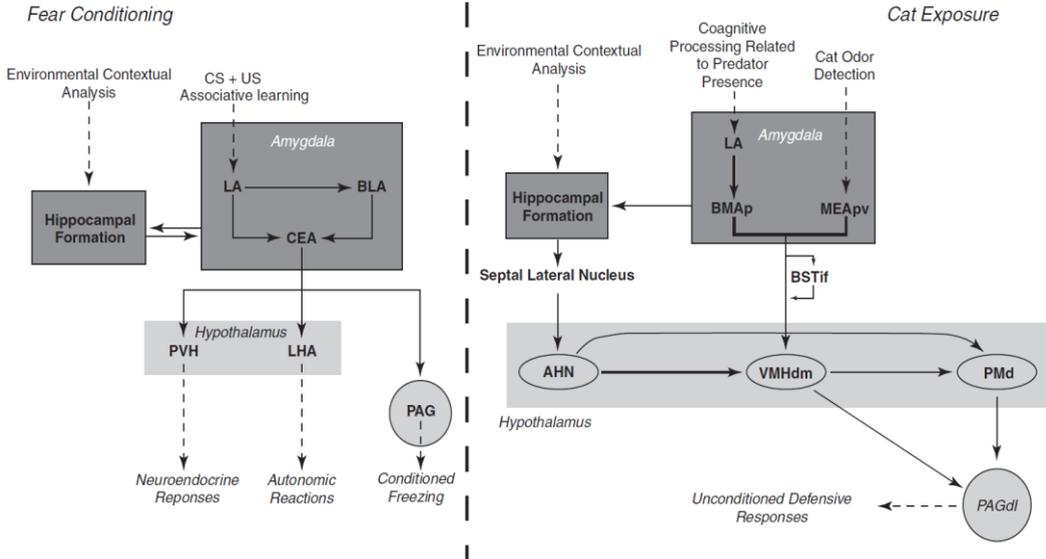


Figura 43: Representación de los circuitos neuronales involucrados en el condicionamiento de conductas de supervivencia defensivas (izquierda) y de conductas incondicionadas ante exposición a estímulos de gato (derecha). Abreviaturas: AHN= Hipotálamo Anterior; BLA= Amígdala Basolateral; BMAp= Núcleo Basomedial de la Amígdala, parte posterior; BSTif= Núcleo del Lecho de la Estría Terminal, núcleo interfascicular; CEA= Núcleo Central de la Amígdala; CS= Estímulo Condicionado; LA= Núcleo de la Amígdala Lateral; LHA= Área Hipotalámica Lateral; MEApv= Amígdala Medial Posterodorsal; PAGdl= Sustancia Gris Periacueductal, parte dorsolateral; PMd= Núcleo Premamilar, parte dorsal; PVH= Hipotálamo Paraventricular; US= Estímulo Incondicionado; VMHdm= Núcleo Hipotalámico Ventromedial, parte Dorsomedial. Modificado de Canteras y Blanchard, 2008

Como podemos observar en la **Figura 43**, el **condicionamiento de conductas defensivas de supervivencia** parece requerir del correcto funcionamiento de

tres núcleos de la Amígdala. En primer lugar, en la Amígdala Lateral (AL) parece ser necesaria para que se desarrollen tanto la adquisición como el recuerdo de la asociación de estímulos amenazantes. Así, al aplicarle lesiones (electrolíticas o excitotóxicas) o inactivación farmacológica se evita el desarrollo de este aprendizaje aprendizaje (LeDoux, 2000; Gale et al., 2004; Cain y LeDoux, 2008). Por otro lado, la Amígdala Central es, mediante sus conexiones con el Hipotálamo y la SGP (LeDoux et al., 1988; De Oca et al., 2004), importante para la expresión de conductas como la parálisis condicionada o la activación del sistema autonómico, así como la creación, almacenamiento y consolidación del condicionamiento (Goosens y Maren, 2001; Wilensky et al., 2006). Finalmente, la Amígdala Basolateral tiene un papel aún incierto en este proceso de aprendizaje (Cain y LeDoux, 2008), aunque la inactivación de éste mediante la inyección del agonista de los receptores GABA muscimol supone un retraso en la aparición de la misma conducta (Müller y Fendt, 2006).

Las **conductas incondicionadas que provoca la presentación de estímulos de depredador** también requieren la activación del Circuito de Amigdalino de Defensa (LeDoux,

2022) y está presente en la gran mayoría de las especies de vertebrados (Martínez-García y Lanuza, 2018; Suryanarayana, Robertson y Grillner, 2022). A este respecto, en roedores, la Me desempeña un papel preponderante al ser la encargada de recibir los inputs del BOA (McGregor et al., 2004). La realización de lesiones citotóxicas en este núcleo provoca una reducción significativa de las conductas incondicionadas ante estímulos procedentes de gato (Li et al., 2004) y la molécula derivada de heces de zorro TMT (Müller y Fendt, 2006) y se ha comprobado mediante el marcaje de la proteína c-Fos la activación, en especial de la MePV, ante olores de este mismo depredador (Dielenberg, Hunt y McGregor, 2001). Además, otros núcleos activos que se han encontrado activos en la amígdala antes estímulos de depredador son la porción posterior de la Amígdala Basomedial y el nivel caudal de la AL, siendo probable que estas áreas posean una función de integración sensorial de otros estímulos no olfativos procedentes de depredadores (Shi y Casell, 1999; McDonald, 1998).

Finalmente, los núcleos VMH-DM, la parte dorsal del Núcleo Premamilar y el Hipotálamo Anterior forman lo que se ha denominado como el Circuito Defensivo del Hipotálamo Medial

(Canteras, 2008). Estos núcleos se encuentran altamente interconectados (Canteras, 2002), recibiendo el VMH la mayor parte de la información procedente de la Amígdala, el Hipotálamo Anterior, mediante sus aferencias desde el Núcleo Septal Lateral podría recibir la información contextual procedente de la formación hipocampal (Petrovich, Canteras y Swanson, 2001) y el Núcleo Premamilar, conectado con ambos, proyectaría a la SGP junto con el VMH (Canteras, 2008). La zona dorsal del Núcleo Premamilar es la región hipotalámica que en mayor medida responde a las amenazas, y su lesión provoca los mayores déficits en el SSD (Markham et al., 2004).

Por último, la SGP recibe la mayor parte de las aferencias de estos tres núcleos hipotalámicos, siendo indispensable para el desarrollo de las conductas defensivas tanto incondicionadas como condicionadas mediante aprendizaje pavloviano. En concreto, mediante marcaje de la proteína c-Fos se ha encontrado una alta activación neuronal las regiones dorsolateral y dorsomedial del PAG ante estímulos incondicionados de depredador (Dielenberg, Hunt y McGregor, 2001; Canteras y Goto, 1999) mientras que la región

ventrolateral parece implicada en el condicionamiento (Carrive et al., 1997)

Hipótesis Experimentales

En este apartado nos disponemos a enumerar las hipótesis experimentales que hemos desarrollado para trabajar sobre los cinco experimentos de esta tercera parte. Así pues, en los primeros tres experimentos usamos como estímulo aversivo diferentes secreciones de varios donantes de la especie *Felis catus*: en el primero, secreción de la glándula perianal; en el segundo, saliva; en el tercero, trozos de tejido donde un donante estuvo durmiendo. Las hipótesis fueron las siguientes:

1. El tiempo que los sujetos pasan en la zona del **estímulo de glándula perianal** será inferior al que pasan en la zona del estímulo neutro.
2. El tiempo en que los animales de nuestra muestra estarán cerca del estímulo compuesto de **saliva de gato** será inferior al tiempo que estarán ante el estímulo neutro.

3. El tiempo en que los animales de la muestra pasarán cerca del **lecho de gato** será inferior al tiempo que pasarán ante el estímulo neutro.

	H_i	Fórmula
Felis silvestris catus	1	$T_{GPA} < T_N$
	2	$T_{SLV} < T_N$
	3	$T_L < T_N$

Tabla 16: Tabla resumen para las hipótesis de trabajo para los experimentos de preferencia con estímulos de individuos de la especie *Felis silvestris catus*. Los colores señalan el tipo de estímulo: el color rojo los de gato; el color negro el estímulo neutro. Símbolos: T= tiempo; GPA= Estímulo de glándula perianal; SLV= Saliva de gato; L= Lecho de gato; N= Estímulo neutro.

El siguiente experimento realizado utilizó viruta sucia de conejo y de rata como estímulos experimentales. Las hipótesis experimentales fueron las siguientes:

4. Los sujetos experimentales pasarán menos tiempo de manera estadísticamente significativa ante el estímulo de rata que ante el estímulo neutro.
5. A su vez, no pasarán más tiempo ante el estímulo de conejo que ante el estímulo neutro.

	H_i	Fórmula
Rata y Conejo	4	$T_{RAT} < T_N$
	5	$T_{ORYC} < T_N$

Tabla 17: Tabla resumen para las hipótesis de trabajo para Los experimentos de preferencia con viruta de rata y de conejo. Los colores señalan el tipo de estímulo: el color rojo los de rata; el color verde los de conejo; el color negro el estímulo neutro. **Símbolos:** T= tiempo; RAT= Viruta de rata; ORYC= Viruta de conejo; N= estímulo neutro.

Finalmente, el quinto experimento realizado se trata del **experimento de preferencia con trimetilpirazina** (molécula presente en la orina de lobo). La hipótesis de trabajo fue la siguiente:

- Los animales de nuestra muestra pasarán menos tiempo cerca del estímulo de trimetilpirazina que del estímulo neutro de manera estadísticamente significativa.

	H_i	Fórmula
Trimetilpirazina	6	$T_{PIR} < T_N$

Tabla 18: Tabla resumen para la hipótesis de en el experimento con trimetilpirazina. El color rojo señala la pirazina; el color negro el estímulo neutro. **Símbolos:** T= tiempo; GPA= Estímulo de glándula perianal; PIR= Trimetilpirazina; N= Estímulo neutro.

Metodología:

Estímulos de *Felis catus*:

Animales y Estabulación

Fueron realizados tres experimentos utilizando estímulos procedentes de especímenes de la especie *Felis silvestris catus*. Para el primero de ellos, en el que usamos estímulo procedente de la glándula perianal, utilizamos seis ratones machos de la cepa CD-1 con 10 semanas de vida. Para el segundo experimento (saliva de *Felis silvestris catus*) fueron utilizados 11 ratones hembra de la cepa C-57 con 8 semanas de vida. Finalmente, para el tercer experimento consistente en la presentación de lecho de gato, fueron usadas cinco ratones hembra de la cepa C-57.

Todos los animales carecían de experiencia previa con estímulos derivados de gato y les fue proporcionada comida y agua *ad libitum*. Las condiciones de estabulación, determinadas por el animalario de la Universidad de Valencia, fueron adecuadas a nivel de bienestar animal (e.g.: temperatura y humedad adecuadas, espacio acústico no estresante, etc.).

Parte III: Estudios con *Kairomonas*

El trato realizado a todos los sujetos experimentales se ha realizado acorde a los estándares éticos reflejados en La Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 y su trasposición a la legislación española (Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero). A continuación, presentamos una tabla con todos los animales usados en los procedimientos de la Parte III de la presente tesis doctoral con los códigos correspondientes de aprobación por el comité ético:

	<i>N</i>	<i>Cepa</i>	<i>Sexo</i>	<i>Edad</i> ¹	<i>Código</i> ²
<i>Glándula Perianal</i>	6	CD1	♂	10	A1495042802173
<i>Saliva de Gato</i>	11	C-57	♀	8	A20191115164620
<i>Lecho de Gato</i>	5	C-57	♀	12	A20191115164620
<i>Est. de Rata y Conejo</i>	16	C-57	♀	8	A1536748473993 ³
<i>Piracina</i>	10	C-57	♀	10	A20191115164620

Tabla 19: Tabla mostrando las características de los sujetos usados en los experimentos presentados en la Parte III sobre *Kairomonas*. ¹Edad en semanas. ²Código de aprobación por el Comité de Ética.

Estímulos

Glándula Perianal

Las glándulas perianales consisten en dos sacos cerca de la pared muscular del ano de muchos carnívoros (Gorman & Trowbridge, 2019) cuya función es la secreción de un líquido aceitoso de fuerte olor que facilita la defecación al mismo tiempo que sirve de marca territorial (Asa, Mech & Seal, 1985; Drea et al., 2002) y fuente de información que permite el reconocimiento entre individuos (Miyazaki et al., 2018; Burgener et al., 2009).

En este estudio fue extraído el líquido de la glándula perianal de un gato doméstico por un profesional veterinario en su consulta mediante una gasa médica. Así, la gasa quedó impregnada del estímulo y conservada a 4°C hasta el día de su utilización. Para su presentación, fue troceado en varias partes para distribuirlo entre los animales de la muestra.

Saliva de *Felis catus*

Se ha encontrado la capacidad de la saliva de especímenes de *Felis catus* para provocar conductas de evitación en ratones (Papes, Logan y Stowers, 2010). En nuestro caso usamos algodón hidrófilo impregnado de saliva de un gato

Parte III: Estudios con Kairomonas

doméstico como estímulo para el protocolo con saliva. La obtención de éste se realizó mediante un veterinario en su consulta con un espécimen macho sano y cautivo que pasaba consulta. Para impregnarlo el veterinario depositó el algodón el mayor tiempo posible en la cavidad bucal del animal.

Después de su obtención, el algodón fue troceado y mantenido a 4°C hasta el momento de la fase experimental del procedimiento.

Lecho de Felis catus

El estímulo para el procedimiento experimental usando lecho de gato fue obtenido mediante donación de un particular dueño de un espécimen de *Felis silvestris catus*. El animal del cual fue obtenido el estímulo se trataba de un macho esterilizado de 5 años y 5 meses de edad. Su alimentación consistía en pienso estándar para gatos esterilizados Ultima (Affinity Petcare S.A., L'Hospitalet de Llobregat, España) y paté para gatos adultos DeliKuit (Deurerer Petcare France, ZAC de la Boulbène, Francia). No poseía ninguna condición veterinaria relevante para el experimento.

El substrato donde se impregnó el estímulo de gato consistió en una camiseta común (composición 100% Algodón). Sobre esta camiseta el animal donante durmió durante una semana todos los días al menos ocho horas diarias. Al octavo día el estímulo fue recogido, recortado y guardado en un congelador a -20°C hasta el momento de la experimentación.

Protocolos de preferencia

Experimento de Preferencia con Est. de Glándula Perianal

La prueba de preferencia fue realizada en la caja de metacrilato opaco de dimensiones de 250mm x 500mm x 300mm utilizada en los experimentos descritos en la Parte II. El día de la exposición los sujetos experimentales fueron colocados en el lado de la caja contrario al estímulo de gato extraído de la glándula perianal. Para evitar posibles sesgos por la ubicación espacial del sujeto o del estímulo realizamos un contrabalanceo de estos: la mitad de los animales fueron colados al inicio del ensayo en un lado de la caja y la otra mitad en el contrario; lo mismo fue realizado con los estímulos experimentales de gato. El estímulo fue presentado dentro de un bote de cristal de 45mm de diámetro y 45mm de altura permitiendo que los sujetos

tuvieron acceso completo al mismo. Por otro lado, el estímulo neutro consistió en un bote de las mismas dimensiones en el que se colocó una gasa médica con solución salina (0,9%).

La figura siguiente ilustra el protocolo experimental:

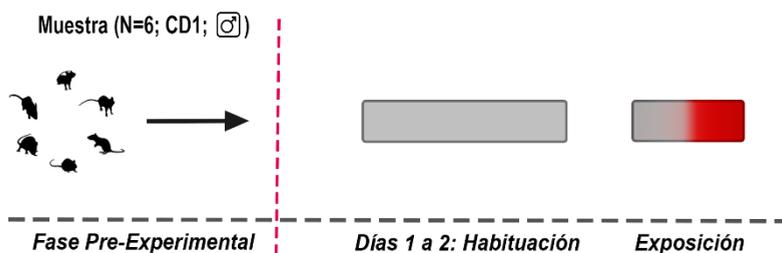


Figura 44: Ilustración gráfica del protocolo experimental. En la Fase Experimental del procedimiento fueron realizados dos días de habituación y uno de exposición, donde fue presentado a los animales estímulo de glándula perianal (rojo) y estímulo neutro (gris).

Todos los sujetos pertenecen al mismo grupo experimental, siéndoles presentados a todos los animales el estímulo de glándula perianal. Los días de habituación fueron iguales al de la experimentación, colocando dos estímulos neutros en cada lado de la caja. El día de la exposición se colocó en uno de los lados el bote con el estímulo experimental y se dejó al ratón explorar con libertad durante los 10 minutos que duró la grabación de la prueba.

Experimento de Preferencia con Saliva

Usamos la misma caja de experimentación que en el anterior experimento. El estímulo de saliva de gato fue colocado en un lado de la caja en la zona central de una placa de Petri rodeado de viruta limpia. El estímulo neutro, consistente en un trozo de algodón hidrófilo de las mismas dimensiones que el utilizado para contener la saliva, se colocó de igual manera en una placa de Petri de igual tamaño en el lado contrario de la caja de experimentación. Una ilustración de la situación experimental la encontramos en la siguiente imagen.



Figura 45: Representación de la situación experimental. En cada lado de la caja fueron colocados los estímulos, en este caso el experimental (situado a la izquierda) y el neutro (situado a la derecha). El sujeto fue colocado en el lado contrario a donde se encontraba la saliva de gato. Esta situación espacial del animal y el estímulo se invirtió en la mitad de la muestra.

En la siguiente figura ilustramos el protocolo experimental que fue realizado:

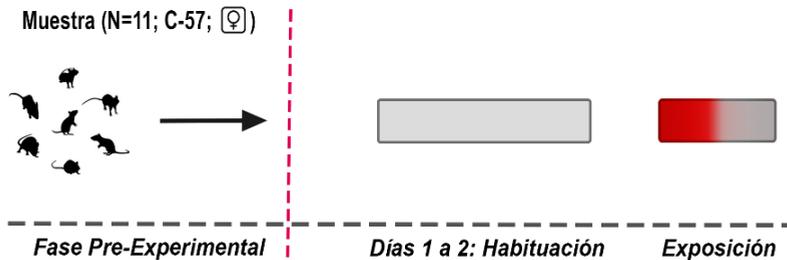


Figura 46: Ilustración gráfica del protocolo experimental. En la Fase Experimental del procedimiento fueron realizados dos días de habituación y uno de exposición, donde fue presentado a los animales estímulo de saliva de gato doméstico (rojo) y estímulo neutro (gris).

Como podemos observar, el experimento constó de dos fases. En la de habituación, con una duración de dos días, se realizó una sesión por animal y día imitando las características de la situación experimental el día de la exposición. En la fase de exposición los animales fueron expuestos a un protocolo de preferencia enfrentando estímulo neutro con el estímulo de saliva de gato. Cada test, tanto en la fase de habituación como en la fase de exposición, tuvo una duración de 300s (5 min).

Experimento de Preferencia Lecho de Gato

En el caso del protocolo de preferencia por lecho de gato fue presentado cada estímulo, tanto el neutro como el experimental, en la parte central de una placa de Petri. Estas placas fueron colocadas una en cada lateral de la caja de experimentación (250mm x 500mm x 300mm).

En la siguiente figura se ilustra el procedimiento experimental seguido:

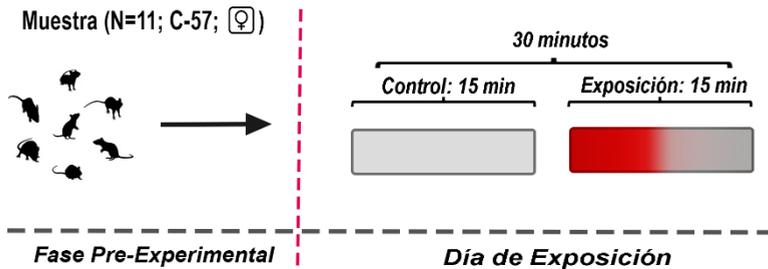


Figura 47: Ilustración gráfica del protocolo experimental. En la Fase Experimental del procedimiento fue realizado un único ensayo de 30 minutos dividido en dos fases: la primera, de 15 minutos, de Control y la segunda, de otros 15 minutos, de exposición. A los animales les fue presentado estímulo de lecho de gato doméstico (rojo) y estímulo neutro (gris).

Como podemos observar, cada prueba experimental constó de 1800s (30 min) y estuvo dividida en dos fases de 900s (15 min). La primera parte fue utilizada como fase de

Parte III: Estudios con Kairomonas

habitación, colocando en las placas de Petri estímulo neutro. Finalmente, en la fase de exposición, se retiró uno de los estímulos neutros y se sustituyó por lecho de gato mientras el sujeto experimental aún estaba en la caja. Para evitar un sesgo de lateralidad la disposición espacial de los estímulos fue contrabalanceada.

Estímulo de *Rattus norvegicus*:

Muestra y Estabulación

Para el experimento en el que fueron usados viruta de rata y viruta de conejo usamos un total de 16 hembras *Mus musculus* de la cepa C-57 con ocho semanas de edad en el momento de realizar el protocolo experimental. Su estabulación fue realizada en las instalaciones del animalario de la Universidad de Valencia y el cuidado de las mismas fue llevado a cabo por su equipo. El alimento y el agua fue administrada *ab libitum*. La temperatura y la humedad se mantuvieron en niveles cómodos para los animales.

Estímulo

Viruta de Rata

En diversos estudios se ha comprobado la actividad predatoria de las ratas al estar en presencia de individuos de la especie *Mus musculus* (Yang et al., 2004; O'Boyle, 1974; van Hemel, 1975). En nuestro estudio decidimos usar viruta sucia de *Rattus norvegicus* de la cepa Wistar como estímulo olfativo con la finalidad de provocar respuestas defensivas en nuestra muestra. La viruta fue obtenida de ratas macho del animalario

Parte III: Estudios con Kairomonas

de la Universidad de Valencia en edad reproductiva. La viruta fue recogida a la semana de ser colocada en la caja de experimentación. Durante este periodo no se realizaron procedimientos de ningún tipo sobre los donantes.

Viruta de Conejo

La viruta fue proporcionada por un donante *Oryctolagus cuniculus domesticus* del animalario de la Universidad de Valencia. La viruta fue impregnada y ensuciada por el sujeto durante al menos una semana, momento en el cual se separó una parte y se almacenó hasta el día de su uso en el protocolo experimental.

Protocolo de Experimentación

Los estímulos experimentales fueron enfrentados en cada test de preferencia a un estímulo neutro, cada uno en un lado de la caja de experimentación (dimensiones= 250mm x 500mm x 300mm). El estímulo neutro consistió en la misma cantidad de viruta limpia que la del estímulo experimental. En mitad de la caja fue colocada una barrera abierta que delimitaba ambos lados de la caja.

En la **Figura 48** mostramos el protocolo experimental:

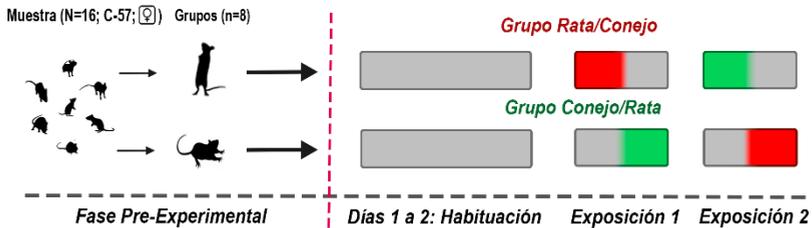


Figura 48: Ilustración gráfica del protocolo experimental. En la Fase Experimental del procedimiento fueron realizados dos días de habituación y dos de exposición, donde se les presento a todos los animales viruta de conejo frente a estímulo neutro (verde y gris) o bien viruta de rata frente a estímulo neutro (rojo y gris). El cambio en la lateralidad de los colores en la fase de exposición se ha realizado para indicar el contrabalanceo dentro de la caja respecto de los estímulos.

El protocolo experimental fue dividido en dos fases: la fase de habituación, en la que se presentaba a los animales la situación experimental, pero sin los estímulos para que se acostumbraran a los aspectos básicos de ésta; y la fase de exposición, en la que fueron presentados bien viruta sucia de conejo frente a viruta limpia del mismo tipo que está o bien viruta sucia de rata frente a viruta limpia igual a la ensuciada por las ratas donantes. La mitad de la muestra fue expuesta a estímulo de rata el primer día de exposición y a estímulo de conejo el segundo mientras que la otra mitad siguió el orden contrario. La duración de los ensayos fue de 900s (15 min).

Estímulo de *Canis lupus*: Trimetilpirazina:

Muestra y Estabulación

Para este experimento fueron usados 10 ratones hembra de la cepa C-57 estabulados en el animalario de Burjassot de la Universidad de Valencia. En el momento de la experimentación contaban con 10 semanas de edad, siendo *naïve* a los estímulos que fueron presentados.

El agua y el pienso fueron suministrados *ad libitum*. Las condiciones ambientales (i.d. temperatura, humedad y ruido ambiente) se mantuvieron dentro de un rango cómodo para los animales. El mantenimiento, el cuidado y la experimentación se fue realizado bajo los estándares éticos aceptados en los protocolos aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Valencia (ver **Tabla 19**).

Estímulos: 2,3,5- Trimetilpirazina

Se ha observado en algunos estudios que la orina de lobo (*Canis lupus*) y algunos de sus componentes poseen la capacidad de provocar conductas de evitación en ratones

(Osada et al., 2014, 2015, 2017). En concreto, estos componentes fueron 2,3-Dietilpirazina, 3-etilo-2,5-Dimetilpirazina, 3-etilo-2,5-Dimetilpirazina y 2,3,5-Trimetilpirazina (Osada et al., 2017). De estos cuatro componentes seleccionamos uno, la 2,3,5- Trimetilpirazina, para realizar nuestro protocolo experimental.

Así pues, el estímulo que utilizamos consistió en 2,3,5-Trimetilpirazina (Sigma Aldrick, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) a una proporción 1:10 con H₂O₂.

Protocolo de Experimentación

En este experimento la caja de experimentación poseía unas dimensiones de 250mm x 500mm x 300mm. Para acentuar las diferencias entre los lados de la caja fue colocada una pared de metacrilato transparente con una apertura cuadrada (5cm x 5cm) en el medio para facilitar el acceso a cada lado. La trimetilpirazina fue colocada con un volumen de 10µl en medio de una placa de Petri rodeado de viruta limpia de ratón, idéntica a la usada para la estabulación de la muestra. El estímulo neutro

consistió en 10 μ l de solución salina con la misma presentación que la trimetilpirazina.

Como podemos observar en la siguiente figura, el procedimiento experimental constó de una fase de habituación, de tres días y una de exposición al estímulo. En la fase de habituación la situación experimental fue idéntica a la fase de exposición salvo por el uso de un estímulo neutro en cada lado de la caja. Por otro lado, el día de exposición uno de los dos estímulos fue el estímulo experimental (*id est*, 2,3,5-trimetilpirazina) en vez del estímulo neutro. Para evitar sesgos en los datos debido a la colocación del estímulo y del animal dentro de la caja se contrabalanceó la colocación de éstos en la mitad de la muestra.

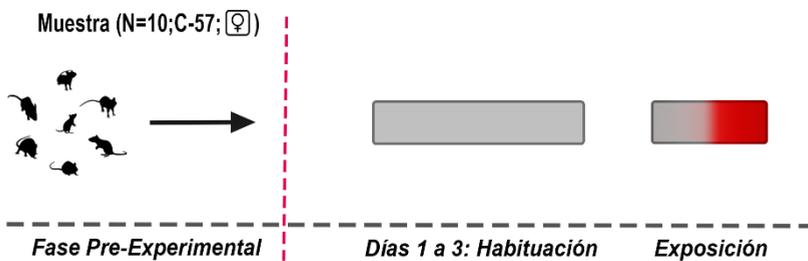


Figura 49: Ilustración gráfica del protocolo experimental. En la Fase Experimental del procedimiento fueron realizados tres días de habituación y uno de exposición, donde les fue presentado a los animales el componente de la orina de lobo 2,3,5-Trimetilpirazina (rojo) frente a estímulo neutro (gris).

Cada ensayo, tanto en la fase de habituación como en la de exposición, tuvo una duración de 600s (10 minutos).

Procesamiento de Datos:

Todos los experimentos que presentamos a continuación tienen en común que las grabaciones de conducta fueron analizadas usando el programa "Smart v3." (Panlab) y que para el análisis estadístico de los datos extraídos de éste fue usado el software "IBM SPSS Statistics v23.0". Antes de realizar pruebas de análisis de datos para evaluar los efectos estadísticos de las VIs sobre las VDs fueron hechos los correspondientes test para comprobar la homogeneidad de varianza (i.d., test de Levene y test de esfericidad de Mauchly) y el ajuste a la normalidad de los datos (test de Kolmogorov-Smirnov). Solo nombraremos estos test en el caso de que estos supuestos para las pruebas paramétricas hayan sido incumplidos.

En el experimento con **estímulo de glándula perianal** la VD consistió en el tiempo en segundos que el animal pasó cerca del estímulo. El diseño experimental constó de dos VI intrasujetos: la variable día de experimentación con las condiciones control y exposición; y la variable tipo de estímulo, con las condiciones neutro y experimental. Para evaluar estadísticamente los datos se realizó una Anova de medidas repetidas.

En el experimento en el que fue usado **estímulo de saliva de gato** como estímulo experimental la VD consistió en la ratio entre el tiempo que pasaba el animal en la zona de la caja donde estaba situado el estímulo experimental y el lado del estímulo neutro. El protocolo consta de una variable intrasujetos denominada tipo de estímulo con dos condiciones (neutro; experimental) y para evaluar sus efectos estadísticos se realizó una Anova de medidas repetidas.

Respecto al experimento con **estímulo de lecho de gato** la VD consistió en la ratio entre el tiempo que el animal ha estado en la zona del lecho de gato y en la zona del estímulo neutro. El diseño experimental tiene una VI intrasujetos que llamamos tipo de estímulo con dos condiciones (neutro; experimental) y se ha

realizado una Anova de medidas repetidas para evaluar su efecto sobre la VD.

Respecto al experimento con **estímulo de rata y conejo** la VD consistió en la ratio entre el tiempo que el animal ha estado en la zona del estímulo experimental y en la zona del estímulo neutro. El diseño experimental tiene una variable intrasujeto de tres condiciones que hemos llamado tipo de estímulo (Neutro; Viruta de Conejo; Viruta de Rata). Para analizar el efecto estadístico de las variables fue realizada una Anova de medidas repetidas.

El experimento con **estímulo de orina de lobo (2,3,5-Trimetilpirazina)** tuvo una VD que consistió en la ratio entre el tiempo que el animal ha estado en la zona del estímulo experimental y en la zona del estímulo neutro. El diseño experimental tiene una variable intrasujeto de dos condiciones que llamamos tipo de estímulo (neutro; experimental) y se ha realizado una Anova de medidas repetidas para evaluar los efectos estadísticos.

Resultados:

Resultados Estímulos de *Felis catus*:

Experimento con Est. de Glándula Perianal

En el siguiente experimento fue utilizado como estímulo experimental un trozo de gasa médica impregnada de secreción de la glándula perianal de un ejemplar de *Felis catus*. Los resultados del experimento se presentan en la siguiente **Figura**:

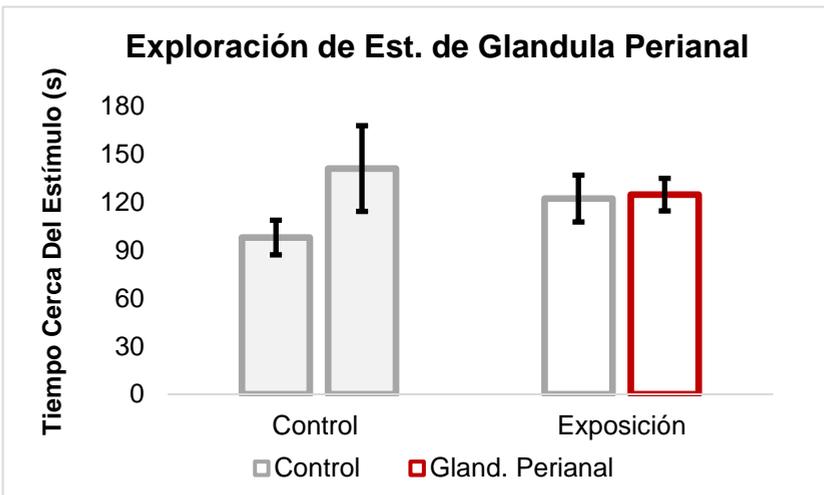


Figura 50: Representación de los resultados de la exposición a estímulo de glándula perianal (en rojo) y estímulo neutro (en gris) en las fases del procedimiento de control y exposición. La variable dependiente es el tiempo que el animal pasa cerca de los estímulos. Las barras de error estándar representan el error de la media. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales.

Al realizar una Anova de medidas repetidas encontramos que ninguna de las variables independientes que hemos evaluado han arrojado resultados estadísticamente significativos sobre el tiempo que el animal pasa cerca del estímulo. Así, ni la VI momento de exposición ($F_{1,3} = 0,022$; $p = 0,892$) ni la variable tipo de estímulo ($F_{1,3} = 4,106$; $p = 0,136$) así como su interacción ($F_{1,3} = 0,142$; $p = 0,731$) nos arrojan una p por debajo del criterio de significación. Concluimos por ello que, según nuestros datos, ni el día de presentación del estímulo ni la secreción obtenida de la glándula perianal de un gato tienen un efecto sobre el tiempo que el animal pasa cerca de los estímulos experimentales (es decir, cerca del estímulo neutro o cerca de la secreción de glándula perianal).

Experimento con Saliva de Gato

En el siguiente experimento fue utilizado un trozo de algodón hidrófilo impregnado de saliva de *Felis catus*. Los resultados del experimento se presentan en la siguiente figura:

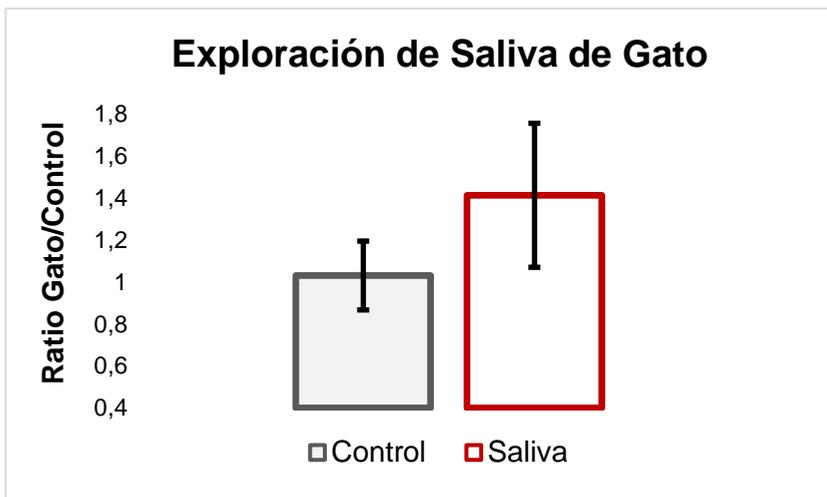


Figura 51: Representación de los resultados de la exposición a estímulo de saliva de gato y estímulo neutro en las fases del procedimiento de control (habituaación; en gris) y exposición (en rojo). La variable dependiente es la ratio entre el tiempo que el animal pasa en la zona de los estímulos. Las barras de error representan el error estándar de la media. Se presentan las ratios respecto al estímulo neutro frente al que fueron presentados de tal manera que si el sujeto experimental pasa más tiempo en la zona del estímulo el resultado será >1 . No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales.

Los resultados de las herramientas estadísticas utilizadas arrojan un resultado cercano a la significación estadística para

la variable tipo de estímulo ($F_{1,10} = 4,988$; $p = 0,050$). Sin embargo, la ratio de esta variable está organizado de tal manera que un resultado mayor a uno indique que la exploración es mayor en el estímulo de saliva de gato frente al neutro. Como podemos observar, la barra de la exploración de la saliva de gato se sitúa por encima de este uno (Media=1,414), indicando una tendencia a explorar más el estímulo experimental de depredador que el estímulo neutro.

Experimento con Lecho de Gato

En el siguiente experimento fue utilizado un tejido en el que un sujeto *Felis catus* había realizado sus periodos de sueño durante al menos una semana. Los resultados del experimento se presentan en la siguiente figura:

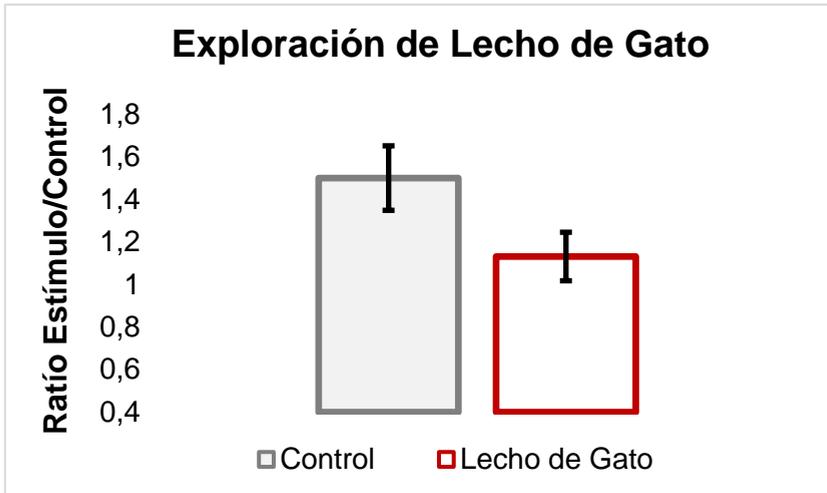


Figura 52: Representación de los resultados de la exposición a estímulo de lecho de gato y estímulo neutro en las fases del procedimiento de control (habituaación; en gris) y exposición (en rojo). La variable dependiente es la ratio entre el tiempo que el animal pasa en la zona de los estímulos. Las barras de error representan el error estandar de la media. Se presentan las ratios respecto al estímulo neutro frente al que fueron presentados de tal manera que si el sujeto experimental pasa más tiempo en la zona del estímulo el resultado será >1 . No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales.

Los resultados de la Anova de medidas repetidas realizada sobre los datos de la ratio entra ambos estímulos en el test de preferencia nos indican unos resultados no significativos para la variable tipo de estímulo ($F_{1,4}=1,641$; $p= 0,269$). Por lo tanto, podemos decir que el estímulo de lecho de gato utilizado en el protocolo no afecta a la conducta de los animales de nuestra muestra.

Resultados con Lecho de Rata:

En el siguiente experimento fueron usados como estímulos experimentales viruta ensuciada por rata y viruta ensuciada por conejo. A continuación, se presentan gráficamente los resultados del experimento:

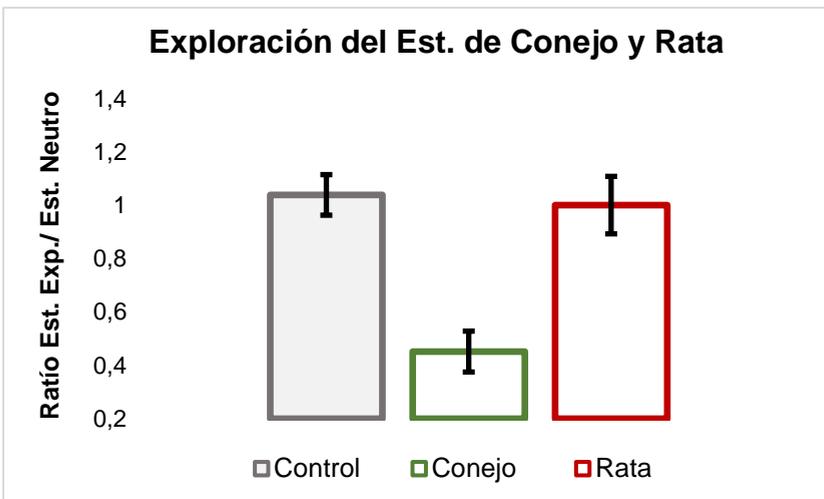


Figura 53: Análisis de la conducta de la exposición de los ratones hembra a estímulo de conejo (verde), estímulo de rata (rojo) y a estímulo neutro (gris). Se presentan las ratios respecto al estímulo neutro frente al que fueron presentados de tal manera que si el sujeto experimental pasa más tiempo en la zona del estímulo experimental el resultado será >1 . Las Barras de Error representan el error estándar de la media. La variable dependiente es la ratio entre el tiempo que el animal pasa cerca de los estímulos en segundos (s). No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales.

Los resultados de las pruebas de análisis de datos realizadas nos arrojan unos resultados no significativos para la variable tipo de estímulo ($F_{2,12} = 3,587$; $p = .060$). Cabe destacar, por otro lado, la media de la ratio del tiempo pasado en la condición estímulo de rata ($M = 1,00117$). Ésta, cercana a uno, nos indica que nuestra muestra está la misma cantidad de tiempo en la zona del estímulo neutro que en la zona de la viruta sucia de rata, mostrando una falta de conducta defensiva hacia la viruta sucia de rata.

Resultados con Trimetilpirazina:

A continuación, se representan los resultados de las pruebas conductuales ante Trimetilpirazina, una molécula encontrada en la orina de lobo (*Canis lupus*) que la literatura muestra con capacidad para producir conductas aversivas en ratones (Osada et al., 2014, 2015, 2017).

En la siguiente **Figura 54** se presentan los resultados de la medición de la conducta de la muestra:

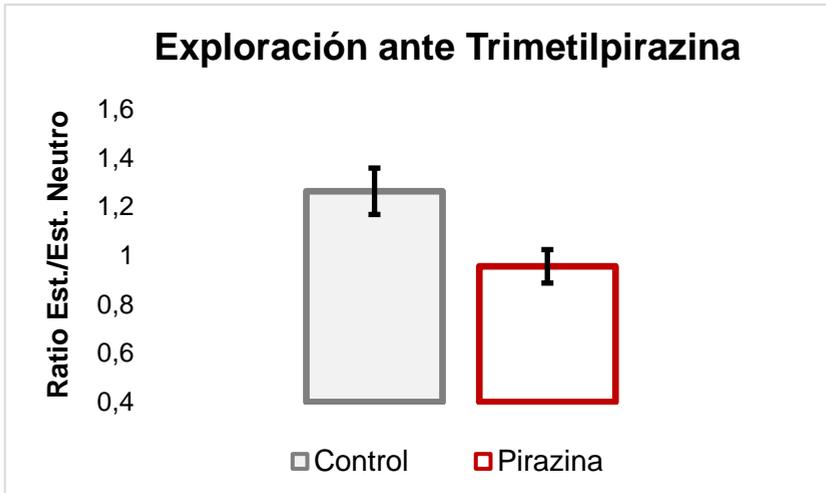


Figura 54: Representación de los resultados de la exposición a estímulo *trimetilpirazina* y estímulo *neutro* en las fases del procedimiento de control (habitación; en gris) y exposición (en rojo). La variable dependiente es la ratio entre el tiempo que el animal pasa en la zona de los estímulos. Se presentan las ratios respecto al estímulo neutro frente al que fueron presentados de tal manera que si el sujeto experimental pasa más tiempo en la zona del estímulo el resultado será >1. Las barras de error representan el error estandar de la media. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones experimentales.

En nuestro caso encontramos que la Anova de medidas repetidas realizada nos muestra que la variable tipo de estímulo no tiene ningún efecto estadísticamente significativo sobre la conducta de preferencia de lugar mostrada por los animales de nuestra muestra ($F_{1,9} = 1,386$; $p = 0,269$).

Discusión:

Siguiendo la línea de la discusión de la parte II, en la discusión de este apartado empezaremos haciendo una breve descripción de los experimentos realizados dividiéndolos en tres apartados: 1) experimentos con estímulos de gato, donde expondremos los resultados de los experimentos realizados con secreción de glándula perianal, con saliva de gato y con lecho de gato; 2) experimentos con estímulo de rata y conejo; y los estímulos de lobo, donde expondremos los resultados obtenidos usando 2,3,5- Trimetilpirazina. La valoración de los resultados se realizará siguiendo las hipótesis formuladas en el apartado correspondiente al inicio de este apartado de la tesis.

Finalmente, extraeremos las conclusiones y realizaremos una discusión de los mismo en el subapartado correspondiente, dando una visión de conjunto e integrando nuestras conclusiones con literatura disponible en el momento.

Experimentos con Estímulo de Gato

En este apartado vamos a comentar los resultados de los tres experimentos realizados utilizando estímulos de *Felis catus*. En total, hemos realizado tres experimentos utilizando tres fuentes diferentes de material orgánico usado potencialmente como quimioseñal: 1) estímulo de glándula perianal; 2) algodón hidrófilo impregnado con saliva de gato; y 3) lecho de gato.

En el experimento de estímulo de glándula perianal, la secreción fue extraída por un veterinario en su consulta utilizando a un gato doméstico. Una muestra de ratones macho de la cepa CD-1 fue expuesta en un test de preferencia a este estímulo y a estímulo neutro, colocados cada uno en un lado de la caja. El estímulo neutro consistió en un trozo de gasa impregnada con solución salina.

El segundo experimento, en el que se usó saliva de gato, consistió en un test de preferencia en el que fue colocado el estímulo experimental y el estímulo neutro cada uno en lado de la caja de experimentación. El estímulo fue recogido por un veterinario en su consulta a un espécimen.

Finalmente, el tercer experimento consistió en un test de preferencia en el que se presentaba, a una muestra de ratones hembra, un trozo de tejido sobre el que había dormido un espécimen sano de *Felis catus*. Al otro lado en caja de experimentación se situó el estímulo neutro, consistente en un trozo de tejido limpio de las mismas características.

Interpretación de los Resultados

En este subapartado discutiremos las hipótesis experimentales elaboradas para los estímulos de gato. Así pues, las tres hipótesis son las siguientes:

$$\left(\begin{array}{l} 1. \quad T_{GPA} < T_N \\ \quad \quad \quad \& \\ 2. \quad T_{SLV} < T_N \\ \quad \quad \quad \& \\ 3. \quad T_L < T_N \end{array} \right)$$

es decir, (1) el tiempo que los sujetos pasan en la zona del estímulo de glándula perianal será inferior al que pasan en la zona del estímulo neutro; (2) el tiempo en que los animales de nuestra muestra estarán cerca del estímulo de saliva de gato

será inferior al tiempo que estarán junto al estímulo neutro; y (3) el tiempo en que los animales de la muestra pasarán cerca del lecho de gato será inferior al tiempo que pasarán ante el estímulo neutro.

Para la comparación de los resultados en la exploración hemos utilizado, para la primera hipótesis, el tiempo en segundos que los animales pasan cerca del estímulo. Por otro lado, para comparación de los resultados de referidos a las hipótesis dos y tres, hemos utilizado la ratio del tiempo que los sujetos experimentales pasan cerca de los estímulos, indicando si esta es mayor que uno una preferencia por explorar el estímulo experimental procedente de los gatos donantes.

Los resultados de las pruebas estadísticas realizadas no nos permiten confirmar ninguna de las hipótesis formuladas. En el caso de la **hipótesis 1**, ninguna de las VI ni su interacción ni su interacción tiene un efecto estadísticamente significativo sobre el tiempo que los ratones macho de la muestra pasan explorando los estímulos. De hecho, si observamos los datos en bruto del día de la exposición (véase **Figura 50**) nos encontramos con que no existe tendencia a evitar el estímulo de

glándula perianal, sino que tiene un efecto similar al estímulo neutro.

La **hipótesis dos** referida a la exploración del estímulo de saliva de gato, tampoco puede ser confirmada por los datos obtenidos en nuestro experimento. El efecto estadístico de la VI nos indica un efecto cercano al criterio de significación estadística ($p= 0,050$). No obstante, aunque podamos hablar de una tendencia a encontrar un efecto de las condiciones experimentales, si observamos los datos en bruto nos encontramos con una ratio mayor que uno en el día de experimentación del experimento (**Figura 51**) en la que fueron presentados el estímulo de saliva de gato al lado contrario que el estímulo neutro ($M= 1,41$; $EEM= 0,34$). Las ratios de los experimentos de esta parte de la tesis están pensadas de tal manera que aquellas mayores de uno indican que la muestra pasa un mayor tiempo cerca del estímulo de depredador. Por lo tanto, la tendencia estadística que encontramos indicaría que nuestro estímulo tiene un efecto incitador a la exploración, al contrario, de la hipótesis formulada.

Finalmente, los resultados referidos a la **tercera y última hipótesis** del apartado tampoco dan apoyo empírico a la

hipótesis de trabajo. Así pues, podemos decir que ninguno de los estímulos experimentales presentados como estímulos que provocan conductas defensivas incondicionadas han confirmado su efectividad para este fin en nuestros experimentos.

Conclusiones y Discusión

Las glándulas perianales son utilizadas por muchos carnívoros como una forma de marcar el territorio y de realizar comunicación intraespecie gracias a sus componentes volátiles que emiten un fuerte olor acre (Miyazaki et al., 2018). Aunque parece que el marcaje mediante secreciones de las glándulas perianales de los gatos puede proporcionar información sobre el sexo, el estado reproductivo o servir como marca de identificación individual (Feldman, 1994) existe poca investigación sobre el papel de éstas en la quimiocomunicación entre gatos (Miyazaki et al., 2018). De hecho, no hay investigación empírica en el momento de realizar esta tesis sobre el papel de esta secreción en la comunicación interespecie.

En el experimento presentado en esta tesis no encontramos evidencia de que las secreciones de las glándulas

perianales motiven conductas propias del SSD en individuos de la especie *Mus musculus*. La observación de las grabaciones de la conducta hacia el estímulo no muestra ninguna conducta típica defensiva por parte de ninguno de los ratones sometidos al test de preferencia.

Curiosamente, la secreción de la glándula perianal tiene un olor muy fuerte (Miyazaki et al., 2018) que en humanos provoca reacciones de asco como se puede juzgar por las expresiones faciales de los sujetos que se exponen a ellas. Se podría esperar, por lo tanto, por las similitudes entre los receptores olfativos de los humanos y de los roedores (Mandairon et al., 2009), que los sujetos de nuestra mostraran conductas de evitación o rechazo ante la presencia del estímulo. Otro estímulo aversivo con un componente oloroso aversivo es el caso ampliamente descrito en la literatura de las heces de zorro y la TMT (Vernet-Maury, 1980; Fendt et al., 2018; Homiack et al., 2017; Holmes y Galea, 2002; Storsberg et al., 2018) que motiva la aparición de conductas de supervivencia defensiva o evitación hacia la secreción de la glándula perianal. Su fuerte olor y la ausencia de una evidencia sólida respecto a las conductas que motiva la TMT ha generado el debate sobre su

papel como kairomona, señalando su activación de las vías nasales del nervio trigémino un papel como olor aversivo más que activados del SSD (Jacquot et al., 2006; Hacquemand, Jacquot y Brand, 2010). Sin embargo, nuestro estudio no ha encontrado ninguna conducta de evitación de nuestra muestra al exponerla a la secreción de glándula perianal que sea paralela a las conductas encontradas por los estímulos provenientes de heces de zorro.

El segundo estímulo utilizado en este grupo de experimentos consistió en el uso de un trozo de algodón medicinal manchado con saliva de gato. Se ha comprado la presencia en grandes cantidades de la proteína Fel d4 en esta saliva, aunque aparte de ser producida por las glándulas salivares también es producida en menor proporción por las glándulas sebáceas (Satyaraj et al., 2019; Grönlund et al., 2010; Smith et al., 2004). Esta glicoproteína, considerada como la causante de la mayoría de los casos de alergia a los gatos en seres humanos (Ukleja-Sokołowska et al., 2016; Bjerg et al., 2015), fue encontrada como principal iniciador de las conductas del SSD al estimular a los receptores de las neuronas del OVN (Papes et al., 2010; Dielenberg y McGregor, 1999; Vazdarjanova

et al., 2001). Sin embargo, nuestro experimento no ha encontrado la presencia de conductas defensivas ante el estímulo impregnado de saliva. Aunque los resultados expuestos en el apartado correspondiente solo tienen en cuenta la conducta exploratoria y de evitación de los sujetos de nuestra muestra, la observación de las grabaciones no muestra en ningún animal otras conductas del SSD como la parálisis momentánea y la evaluación del riesgo. De hecho, como comentábamos anteriormente, la ratio extraída de la medición de la VD nos indica una tendencia a encontrar atractivo el estímulo de gato frente al control.

Por otro lado, mediante la conducta de aseo individual de los gatos, la proteína Feld1 se transfiere al pelaje. Muchos estudios han encontrado la presencia de comportamientos defensivos en roedores ante trozos de pelaje (Vazdarjanova et al., 2001) o trozos de collares de un tejido absorbente (Dielenberg y McGregor, 1999; Rodríguez et al., 2020; Gross y Canteras, 2012). Bajo estas observaciones decidimos usar un estímulo más complejo para intentar iniciar conductas defensivas ante depredador: lecho de gato. Para ello usamos una camiseta utilizada durante una semana como cama por un

donante castrado. Los ensayos conductuales realizados no arrojan diferencias significativas respecto a la exploración del estímulo control. Además, como en los experimentos anteriores, tampoco encontramos la activación de conductas defensivas en nuestra muestra.

Cabe la posibilidad de que este estímulo funcione mediante sensibilización del sistema inmune de los roedores más que como una señal que provoque una respuesta innata de supervivencia defensiva. Aunque en el estudio de Papes et al. (2010) u otros (McGregor et al., 2002; Staples et al., 2008) los sujetos utilizados no habían sido expuestos previamente a los estímulos de gato cabe la posibilidad de que condiciones aleatorias de estabulación en la casa de cría o en el animalario del centro de investigación puedan haber expuesto inadvertidamente a Feld1 e iniciado el aprendizaje del sistema inmune de los roedores.

Finalmente, la presencia de Feld4 parece ser andrógeno dependiente (Ziolenka et al., 1994). Como los donantes de nuestros estímulos eran gatos domésticos, estos probablemente estarían castrados ya que es una práctica aconsejada ampliamente por los veterinarios, comprometiendo así los

efectos como kairomonas de nuestras muestras. Sin embargo, el estudio del equipo de Vervloet (Ziolenka et al., 1994) no se centra en la producción por parte de las glándulas salivares de esta proteína, sino que se centra en su presencia en el sebo de la piel, siendo este mayor en gatos machos que en hembras (Ohman et al., 1983). Además, la producción por parte de las glándulas sebáceas de Feld4 se ha demostrado independiente de la producción por parte de las glándulas salivares (Dabrowski et al., 1990), que como comentábamos anteriormente consistiría la principal fuente de esta proteína en gatos. El hecho de que una posible kairomona sea andrógeno dependiente posee un inconveniente lógico a nivel evolutivo, ya que las hembras de gato son también depredadoras y un compuesto producido tanto por machos como por hembras es mejor candidato a señal de interespecie de depredador que una que solo afecte a un sexo.

Experimento con Estímulo de Rata y Conejo

En este experimento expusimos a una muestra de ratones hembra a dos estímulos experimentales en ensayos

diferenciados: 1) viruta ensuciada por ratas macho del animalario de la Universidad de Valencia de la cepa Wistar y 2) viruta ensuciada por un espécimen de conejo (*Oryctolagus cuniculus domesticus*) proporcionada por el mismo animalario.

La presentación de los estímulos fue realizada mediante test de preferencia en las que los sujetos de la muestra fueron depositados en la caja de experimentación con la viruta sucia y, en el lado contrario, viruta limpia de las mismas características (Figura 53).

Resultados e Interpretación

En el caso de los estímulos de rata y de conejo dos hipótesis de trabajo fueron formuladas:

$$\left(\begin{array}{l} 4. \quad T_{RAT} < T_N \\ \quad \quad \quad \& \\ 5. \quad T_{ORYC} < T_N \end{array} \right)$$

id est, (4) los sujetos experimentales pasarán menos tiempo de manera estadísticamente significativa ante el estímulo de rata

que ante el estímulo neutro; y a su vez, (5) no pasarán más tiempo ante el estímulo de conejo que ante el estímulo neutro.

Los resultados de nuestro experimento nos muestran una tendencia a la significación por la VI tipo de estímulo ($p= 0.60$), indicándonos un posible efecto de las virutas sucias utilizadas. Sin embargo, las ratios de la exploración del estímulo experimental frente al estímulo neutro nos permitirían confirmar solo la hipótesis cinco referida al estímulo de conejo al presentar un valor inferior a 1 ($M= 0.451$). Sin embargo, la ratio que representa la exploración del estímulo de rata no motiva la aparición de conductas de evitación, siendo igualmente explorada que la viruta limpia ($M=1,064$). Así pues, ni la estadística ni las ratios nos aportan apoyo empírico para rechazar la hipótesis nula de la hipótesis referida al estímulo de olores de rata, aunque la ratio y las pruebas de comparación de medias nos indican una tendencia rechazarla en el caso de la hipótesis referida al estímulo de olores de conejo.

Conclusiones y Discusión

Las ratas son mamíferos omnívoros que presentan conductas predatorias sobre animales más pequeños, incluidos

sus parientes lejanos de la especie *Mus musculus* (Yang et al., 2004; O'Boyle, 1974; van Hemel, 1975). Al ser animales utilizados ampliamente en investigación, su convivencia en animalarios ha motivado en parte el estudio sobre los efectos que la presencia de las ratas tiene sobre la conducta de los ratones para desarrollar guías prácticas de manejo (Greene, Redding y Birkett, 2014; Alvarado et al., 2013; National Research Council, 2010).

Ha sido planteado que la conducta predatoria de ratas a ratones no es una conducta predatoria, sino una conducta agresiva sujeta a aprendizaje (Garbatani et al., 1983). Sin embargo, parece que la sola exposición visualización de ratas por parte de los ratones al estar en la misma habitación produce cambios conductuales y fisiológicos relacionadas con respuestas puntuales de estrés (Arndt et al., 2010; Anisman et al., 2001). También se ha encontrado una reducción en la ingesta de azúcar y un aumento de las conductas relacionadas con la ansiedad cuando los ratones están estabulados durante largos periodos con ratas (Calvo-Torrent, Brain y Martinez, 1999).

Sin embargo, existe otro grupo de resultados en la literatura que pone en duda la existencia de estresante/defensivo de los estímulos de rata. Así, Baumans y su equipo (Meijer, van Loo y Baumans, 2009) colocaron en la misma habitación ratones estabulados con ratas sin encontrar efectos en la fisiología de la muestra de ratones. En otro estudio en el que se estabulaban en una habitación a unos ratones donde tenían a la vista a ratas estabuladas y con acceso a los componentes volátiles de las mismas tampoco encontraron efectos en el peso corporal o la respuesta de cortisol (Greene, Redding y Birkett, 2014). Por otro lado, tampoco se han encontrado efectos sobre la reproducción o el desarrollo de los ratones de la muestra (Prichett-Corning, Chang y Festing, 2009)

Sin embargo, una de las limitaciones de los estudios de estabulación conjunta de estos animales es que no se permite el acceso a los estímulos no volátiles de rata. De hecho, un estudio de 2010 determinó la importancia del OVN para el desarrollo de conductas del SSD ante ratas y, en concreto, la importancia de la PUP13 de las ratas, de naturaleza no volátil, para que los ratones produzcan conductas defensivas (Papes et al., 2010). No obstante, en nuestro experimento expusimos a un grupo de

ratones a viruta ensuciada durante al menos una semana por ratas macho adultas, permitiendo el contacto directo con esta. Esta viruta, además de estar manchada por orina, está impregnada de heces y de otros estímulos (de naturaleza química volátil y no volátil) potencialmente capaces de ejercer un papel como kairomona. Sin embargo, no encontramos ninguna tendencia a evitar el contacto con el estímulo ni a desarrollar conductas como la congelación o la evaluación del riesgo típicas de la conducta de supervivencia defensiva. Además, otros estudios no han encontrado, como nosotros, la ejecución de conductas defensivas ante la exposición a olores de rata (Alvarado et al., 2013) o directamente un espécimen en un test de campo abierto (Greene, Redding y Birkett, 2014).

Una explicación a la falta de resultados en algunos experimentos puede ser la habituación al estímulo de rata por parte de los ratones gracias a la cohabitación en la casa de cría (Greene, Redding y Birkett, 2014; Prichett-Corning, Chang y Festing, 2009). Las conductas de agresión de ratas hacia ratones pueden ser completamente eliminadas si las ratas conviven con ratones en momentos tempranos de su vida (Denenberg, Paschke y Zarrow, 1968). Parece que la reactividad

de los ratones expuestos a ratas también ésta sujeto a aprendizaje (Yang et al., 2004). En nuestros experimentos los animales estaban estabulados en el animalario de la Universidad de Valencia. Aunque cada especie tiene una habitación diferente para guardar las cajas de estabulación, la experimentación con ambas especies compartía muchas veces espacios físicos. Por lo tanto, es probable que los animales de nuestra muestra se hubiesen habituado a los estímulos de rata, siendo estos menos efectivos en el ensayo conductual. Sin embargo, esto sería cierto para el papel de las posibles quimioseñales volátiles, puesto no se dio la condición tal que el contacto directo fuera posible. Aun siendo posible esto último, nuestros datos seguirían contradiciendo la existencia de kairomonas de tipo no volátil en la orina de rata y la dependencia del OVN para el desarrollo de conductas defensivas ante estos estímulos, como sugieren otros estudios (Papes et al., 2010).

Por otro lado, en el caso de la viruta sucia de conejo, encontramos que la tendencia que muestran nuestros animales responde más bien a una cualidad repulsiva de la misma. La evitación que encontramos está libre de conductas defensivas de supervivencia y los conejos mantienen una estricta dieta

vegetariana, por lo que deducimos que no cumple un efecto como kairomona. Finalmente, el hecho de que haya sido capaz de generar evitación de manera tan consistente da validez experimental a nuestro diseño como motivador de conductas de evitación cuando el estímulo es efectivo.

Experimento con Estímulo de Lobo

En este apartado discutiremos los resultados del último experimento de la tesis en el que usamos 2,3,5- Trimetilpirazina como estímulo activador de conductas relacionadas con el SSD. En este experimento se presentó en el centro de una placa de Petri, rodeado por viruta limpia para hacerlo más atractivo, 10 microlitros del estímulo. La muestra fue expuesta en un test de preferencia al estímulo neutro y al lado contrario al estímulo experimental (**Figura 54**).

Resultados e Interpretación

Para este experimento desarrollamos la siguiente hipótesis experimental:

$$\left(6. \quad T_{PIR} < T_N \right)$$

es decir, (6) los animales de nuestra muestra pasarán menos tiempo cerca del estímulo de trimetilpirazina que del estímulo neutro de manera estadísticamente significativa.

Los resultados del análisis de la conducta de los ratones no aportan evidencia experimental para la confirmación de la hipótesis 6. Concluimos, por lo tanto, que el estímulo de Trimetilpirazina no tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la conducta de los ratones de nuestra muestra.

Conclusiones y Discusión

Los efectos de la orina de *Canis lupus* sobre el SSD en roedores han sido encontrados en varios experimentos (Fendt, 2006; Osada et al., 2015), así como en otras especies (Severud et al., 2011; Parsons y Blumstein, 2010). El equipo de Kashiwayanagi (Osada, Miyazono y Kashiwayanagi, 2017) determinó que la presencia de pirazinas en la orina de éste era suficiente para motivar conductas defensivas en ratones de la cepa C57. En concreto la 2,3-dietilpirazina, 3-etil-2,5-dimetilpirazina, 3-etil-2,5-dimetilpirazina y 2,3,5-Trimetilpirazina fueron capaz de iniciar las conductas defensivas de parálisis, reducción en la actividad locomotora, conducta de evaluación de

riesgos y conductas de evitación. De entre estas cuatro pirazinas decidimos utilizar la trimetilpiracina por contar con más respaldo experimental en ratones por parte del mismo grupo experimental (Osada et al., 2013).

Sin embargo, en nuestro estudio con ratones hembra C57, misma cepa y sexo que la usada por el equipo de Kashiwayanagi (Osada et al., 2017), no hemos encontrado ninguna de estas respuestas defensivas mencionadas anteriormente. No existe un cuerpo amplio de literatura científica usando orina de lobo o estos componentes derivados de análogos de la pirazina como estímulo de depredador en roedores, probablemente por la disponibilidad de estímulos derivados de depredadores más directos a estos. La dieta de los miembros de la especie de *Canis lupus*, pese a contener también roedores, tiene en mayor proporción miembros de especies pertenecientes al orden *ungulata* (e.g. cabras, ciervos, ovejas, etc.; Torres et al., 2015; Capitani et al., 2004; Mengüllüoğlu et al., 2019). Por lo tanto, es más probable que las conductas defensivas innatas de los ratones se hayan desarrollado a lo largo de la filogenia mediante mecanismos evolutivos dirigidos hacia depredadores más

habituales, siendo así menos probable que las quimioseñales derivadas de lobo sean kairomonas.

Nuestros resultados, por lo tanto, están en línea con la idea de que las pirazinas encontradas por el equipo de Kashiwayanagi, en concreto la 2,3,5-Trimetilpirazina, no pueden ser conceptualizadas como kairomonas en la relación que mantienen los lobos con los ratones. Es probable que la orina de lobo provoque activación del SSD por un componente derivado de la dieta de animales carnívoros, como la 2-Pheniletilamina, que activaría los receptores RATA-4 del OVN (Ferrero et al., 2011; Fendt, 2006)

Conclusiones

1. No encontramos comportamientos de defensa en ante estímulos procedentes de gato como extracciones de la glándula perianal, saliva de gato o un tejido en abundante contacto con un gato.
2. Tampoco la viruta ensuciada por rata durante una semana es suficiente para iniciar conductas defensivas en la especie *Mus musculus*.

3. Finalmente, la molécula aislada 2,3,5-Trimetilpirazina tampoco parece tener capacidad para activar el sistema de supervivencia defensiva.

Parte IV: Discusión General

Discusión Metodológica

En este apartado de la discusión vamos a analizar los aspectos prácticos de la parte técnica de los experimentos. Así pues, haremos una exposición razonada de elementos básicos como la especie y la cepa elegida para realizar la tesis, el número de sujetos experimentales, los test conductuales realizados, los comportamientos evaluados y, finalmente, los estímulos utilizados.

En primer lugar, vamos a hablar de la **especie de animal utilizada** para llevar a cabo la experimentación y las características de la cepa, que tienen que satisfacer los objetivos que la investigación persigue. En nuestro caso, la elección de una especie de roedores viene dada por la capacidad de trasladar los resultados a otros mamíferos que tienen este conjunto de especies. Así, los roedores suponen un 42 % del total de especies de mamíferos conocidos (Macdinald, 2007) y su conducta motivada está mediada por procesos neuronales que implican las mismas estructuras que en seres humanos: principalmente la amígdala y el hipotálamo. Otro motivo existente para la elección de roedores para realizar estudios

neuroanatómicos es su practicidad a como animal de laboratorio. Los roedores, en especial las cepas desarrolladas especialmente para su uso experimental, representan el uso mayoritario de animales en investigación (80% de los procedimientos), siendo el ratón (73%) y la rata (6,5%) los protagonistas de la mayoría de los procedimientos (Great Britain, 2016). El alto uso de la especie *Mus musculus* se justifica por las características biológicas de los mismos: su pequeño tamaño permite una fácil estabulación y manejo por parte de los trabajadores del animalario y del personal investigador; sus características reproductivas proporcionan un alto número de crías que en un corto periodo de gestación y un rápido destete (21 días) alcanzan la madurez sexual a las ocho semanas desde el parto (Tirindelli et al., 2007). Otro de motivo práctico son los referidos a la investigación previa llevada a cabo por el laboratorio de acogida de la tesis, por lo que el conocimiento previo de los integrantes y la logística de las instalaciones (e.g. jaulas de estabulación, cajas de experimentación, set up quirúrgico, etc.) ya se encontraba enfocada para la investigación en ratones. En definitiva, por estas razones prácticas y de

similitud con el objeto de estudio seleccionamos a la especie *Mus musculus* como animal de laboratorio.

Las cepas elegidas para los experimentos fueron, como se ha comentado a lo largo de la tesis, la CD1 y la C57. La principal diferencia entre ambas cepas es que una pertenece a una línea no consanguínea (*outbred*) y la otra, respectivamente, a una consanguínea (*inbred*). Las principales diferencias entre estas clases de líneas hacen referencia a la estabilidad e igualdad genética de sus miembros. Además, las cepas consanguíneas sufren la “Depresión endogámica”, que consiste en una disminución de la fertilidad durante el desarrollo de este tipo de líneas. Así pues, decidimos usar la cepa CD1 para los estudios de atracción a estímulos sexuales por plantearse como sujetos más activos y más adecuados para responder a los estímulos feromonales. Llegado el momento, decidimos usar la cepa consanguínea C57 para aumentar la reactividad ante estímulos de depredador y feromonas en general (al tener una conducta más cercana a las cepas salvajes o *Wild Types* respecto a estos estímulos; Dell’Omo, Fiore y Alleva, 1994) y ante la observación de que era más ampliamente utilizada en la literatura científica. Además, la tendencia a la homogeneidad genética de las cepas

consanguíneas es un factor que mejora la capacidad de reproductibilidad de los experimentos, permitiéndonos así obtener resultados conductuales similares a los encontrados en la literatura.

Los sujetos de la especie *Mus musculus* son animales altriciales, es decir, tienen que pasar un periodo de desarrollo postnatal para alcanzar la madurez adulta. Referido a nuestro caso, es un factor a tener en cuenta que el sistema nervioso y el sistema olfativo del ratón tardan al menos ocho semanas en alcanzar la madurez sexual (Tirindelli et al., 2009; Doty y Kamath, 2014). Por ello, como se pueden observar en las **Tablas 8 y 19**, la edad mínima de los ratones de nuestra muestra es de ocho semanas, alargando la edad máxima a 30 semanas (Aproximadamente 6 meses). Los ratones se reproducen durante todo su ciclo vital, siendo este de aproximadamente 12/18 meses (Great Britain, 2016). Por lo tanto, en los experimentos en los que usamos los grupos de mayor longevidad, no vemos comprometidos los resultados obtenidos debidos al factor edad al ser los estímulos presentados de carácter sexual mientras estos todavía son biológicamente capaces para la reproducción.

En nuestra muestra hemos usado preferentemente sujetos hembra para explorar el papel inhibitor de la conducta sexual que las señales de enfermedad en orina de macho *Mus musculus* poseen pese a la presencia de D en estas (Lanuza et al., 2014). Sin embargo, en otros experimentos, con otros objetivos diferentes explicados en los respectivos apartados (e.g. reproducir resultados existentes en la literatura), hemos combinado una muestra de hembras con una muestra de machos. Pese a las diferencias que existen entre machos y hembras en las conductas sociales y sus roles ecológicos (Wahlsten y Crabbe, 2007), los resultados de nuestros experimentos no han arrojado diferencias significativas en la conducta ante estímulos de enfermedad o estímulos de macho sin tratar con LPS.

Los **test** consistieron en test de preferencia o de estímulo único. Estos test son adecuados para favorecer la exploración de los estímulos presentes en la situación experimental y medir la respuesta a los mismos. Las cajas experimentales utilizadas eran, aproximadamente, el doble de largas que de anchas (250mm x 500mm x 300mm) permitiendo la colocación de estímulos aversivos en un extremo de la caja y dando espacio a

los sujetos experimentales de alejarse y refugiarse en el otro extremo. Además, una pared de metacrilato transparente con un hueco en la parte central inferior para permitir el paso fue colocada en el centro para ayudar a delimitar las zonas y favorecer la “sensación” de seguridad. Esta disposición experimental es adecuada para evaluar **el comportamiento de evitación** al registrar el tiempo que los animales pasan en un lado u otro de la caja de experimentación. Los animales usan la información del espacio referida a los riesgos o beneficios para dirigir su conducta (Lima, 1998) y la conducta de evitación ha sido usada en ratones ampliamente para evaluar la aversión a estímulos de depredador y de congéneres con señales de enfermedad (e.g. Apfelbach et al., 2005; Boillat et al., 2015; Papes et al., 2010). Sin embargo, la evaluación del comportamiento de evitación tiende a ser muy inespecífica, y por sí misma no nos habla del estado interno del individuo evaluado. Por ello, es aconsejable complementar esta medición con el registro de otras conductas más específicas. En el caso de la evaluación de las respuestas ante estímulos de depredador tenemos las denominadas conductas defensivas (e.g. parálisis, comportamiento de evaluación del riesgo, etc.). En los

experimentos presentados en la parte III de esta tesis realizamos de manera manual la medición de estas conductas, que no han sido incluidas en el análisis de los resultados por su extremadamente baja incidencia.

Respecto al método automático de medición de la conducta mediante el software “Smart v3.0” (Panlab, Barcelona, España), creemos que este posee importantes limitaciones a la hora de interpretar la información respecto a la evaluación manual por un observador. Por ello realizamos las mediciones manualmente en segundas evaluaciones de las grabaciones experimentales para confirmar las realizadas por el Smart y obtener información más precisa de las respuestas de nuestros animales a los estímulos presentados.

Finalmente, en esta tesis hemos utilizado **estímulos** que varían de más a menos complejidad como quimioseñal. Como estímulos complejos hemos usado animales anestesiados, viruta ensuciada por animales en sus cajas de estabulación, orina de ratón y los componentes químicos aislados de Darcina (PUP20 recombinante), Péptidos Formilados (f-Met-Leu-Phe) y 2,3,5- Trimetilpirazina. La ventaja de usar estímulos complejos es el aumento de la potencia de la señal, además de respetar

mejor las condiciones ecológicas naturales. Como desventaja podemos encontrar un aumento del ruido que suponen otras señales presentes en el mismo substrato. Por otro lado, las señales químicas aisladas tienen el defecto de carecer de intensidad de señal y su falta de validez ecológica, puesto que son compuestos artificiales que nunca se presentan de la misma forma en ambientes naturales respecto a cómo se presentan en el laboratorio. Esta tesis, por lo tanto, ha realizado ambas aproximaciones experimentales, dando fiabilidad a los resultados extraídos al repetir los mismos resultados con ambos tipos de estímulos.

Discusión Filosófica: Hiperrealidad de la Darcina

Desde el punto de vista del constructivismo científico, las ciencias no actúan tan solo descubriendo la realidad, si no que al mismo tiempo que van absorbiendo partes de la misma (como si las “tragara”; Bueno, 1992) las transforma creando nuevas realidades que muchas veces van más allá del mundo directamente accesible a nuestros sentidos, o como diría el filósofo español Gustavo Bueno, del *mundus abspectabilis*. Así

pues, las ciencias construyen y amplían el mundo, construyendo hiperrealidades, que son ampliaciones de la realidad que afecta a partes de la realidad no dadas a escala corporal pero que están conectadas con esta (Madrid, 2018). Ejemplos de estas ampliaciones de la realidad construidas por la ciencia son los números reales, los antibióticos, los organismos genéticamente manipulados, la noción de población en estadística, el oxígeno o el electrón (Bueno, 1992).

La creación de hiperrealidades viene acompañada con el desarrollo técnico que permite su observación y manipulación. En el caso del electrón, nuestra capacidad de manipularlo y observar sus efectos es indispensable para hablar de la existencia real de estos. Así, sin el tubo de rayos catódicos utilizado por Thomson en 1897 o el experimento de la gota de aceite de Millikan en 1909, no podríamos hablar de la existencia de estas partículas subatómicas con más rigor de lo que podríamos hablar del eter hipotetizado por el pensamiento griego y medieval. Siguiendo al filósofo Ian Hacking, los electrones existen porque podemos rociarlos para experimentar con ellos (Hacking, 1996; Madrid, 2018). De hecho, la existencia y uso de aparatos como el microscopio electrónico de barrido

inventado por Erns Ruska en 1936 es una prueba definitiva de como una hiperrealidad se amplía al *mundus abspectabilis* que comentábamos anteriormente, dando validez científica a esa creación teórica imperceptible.

Podemos ilustrar la creación y descubrimiento de hiperrealidades con el siguiente ejemplo: el descubrimiento del tecnecio (su nombre proviene de la palabra griega technètos que significa “artificial”). La existencia de este elemento químico de la tabla periódica fue predicha con precisión por Dmitri Mendeleiev denominándolo Elemento 43 ya que éste debía colocarse en el puesto vacante que dejaban el molibdeno (Elemento 42) y el rutenio (Elemento 44) en la tabla. Sin embargo, no fue hasta el desarrollo de la tecnología de fisión en que la creación de este elemento fue posible ya que no existe en la naturaleza debido a su gran inestabilidad. En 1936, Emilio Segré lo detectó como un subproducto de la fisión del uranio, confirmando así la predicción de Mendeléyev. El tecnecio demostró ser una hiperrealidad cuando se le pudo otorgar realidad material y pudimos producirlo y usarlo. Actualmente lo producimos en grandes cantidades con fines médicos, siendo el

radioisótopo más usado en la práctica diagnóstica (Emsley, 2001)

De la misma manera que la física de partículas y la química elemental, las ciencias biológicas han aportado por su lado hiperrealidades como lo pueden ser las células, las bacterias, los virus o los cromosomas. Ante un posible escepticismo ante estas realidades, Carlo Madrid (2018, pp. 236) comenta:

A finales del XIX, los biólogos podían ser antirrealistas con respecto a las bacterias, los virus o los cromosomas; pero, hoy día, cuando son diariamente manipulados en laboratorios de medio mundo, resulta difícil no ser realista para con ellos.²

En el caso que nos ocupa en esta tesis nos encontramos con entidades hiperreales como las feromonas y las kairomonas. Tal y como las hemos definido, estas son moléculas utilizadas en la comunicación intra (feromonas) o interespecie (kairomonas) que provocan una respuesta más o menos estereotipada en el individuo receptor (Karlson y Luscher, 1959;

² El texto continúa comentando esta anécdota: “Así, cierto gobernador brasileño del Partido Positivista, crecido en la estela de la doctrina de Comte, no creía en la realidad de los gérmenes, por su inobservabilidad, y, sin embargo, murió de viruela por no querer vacunarse contra ella en torno a 1890.

Wyatt, 2014a). La primera feromona descrita en la literatura fue el Bombicol en 1959 por el premio nobel de química Adolph Butenandt y la colaboración de éste con Peter Karlson condujo al desarrollo del concepto clásico de feromona (Karlson y Luscher, 1959; Hecker y Butenandt, 1984; Butenant, 1959). Esta feromona es secretada por los sáculos laterales abdominales de la hembra de la mariposa de la seda (*Bombyx mori*) y al ser detectada por las células olfatorias de los machos de esta especie induce la atracción sexual del macho (Xu et al., 2012; Sakurai, Namiki y Kanzaki, 2014; Christensen, Mustaparta y Hilderbrand, 1989). Como hiperrealidad, se considera una quimioseñal de gran potencia, se conocen los comportamientos estereotipados que provoca en los machos (Hecker y Butenandt, 1984), puede ser utilizada con fines prácticos (e.g. atraer a machos hacia trampas) y su estructura química ha sido caracterizada (Butenandt, Beckmann y Hecker, 1961). Esta confluencia de hechos y su poder practico para actuar sobre la realidad hace del bombicol una feromona real, dándole a ésta estatus de construcción científica demostrada.

En nuestro caso hemos probado tanto estímulos complejos (viruta sucia u orina) como estímulos simples

(moléculas aisladas). Las moléculas que hemos estudiado están en proceso de validarse experimentalmente como hiperrealidades biológicas (véase **Figura 55**). Más en concreto, la Darcina (PUP20), desde su descripción como feromona (Roberts et al., 2010; 2012) ha ido acumulando evidencia experimental para justificar el nombre que el equipo de Hurst le otorgo al nombrarlo como el personaje de la novela *Orgullo y Prejuicio*. Sin embargo, nuestros resultados no apoyan los encontrados en el resto de estudios publicados. Como comenta Carlos Madrid:

Para manejarnos con la realidad empleamos analogías y esquemas operatorios familiares, pero reconocer su importancia no es incompatible con criticarlos allá donde su justificación se convierte en metafísica, como cuando se aplican al mundo entero. (2018, pp. 365)

Nosotros interpretamos el nombre mismo de esta proteína urinaria como una analogía a la función que se le atribuye. Pero consideramos que su universalización (“[...] criticarlos allá donde su justificación se convierte en metafísica, como cuando se aplican al mundo entero”) aún está por ser demostrada. Si la comparamos con la feromona extraída de la hembra de *Bombyx*

mori anteriormente comentada, a nuestro parecer, aún quedan bastantes pasos para caracterizar a la Darcina como una feromona sexual. A continuación, realizaremos una crítica teniendo en cuenta los resultados negativos presentados en esta tesis.

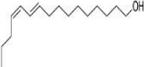
Hiperrealidad	Representación	Demostración
Electrón		Tubo de rayos catódicos Experimento de Millikan Microscopio electrónico
Átomo		Centrales Nucleares Hiroshima (6/08/1945) Experimentos CERN
Bombicol		Estructura química Utilización práctica Tradición Experimental
PUP20 (Darcina)		Estructura Química Evidencia incompleta Sin uso práctico

Figura 55: Representación de las hiperrealidades comentadas en el texto, con su representación gráfica y su demostración como efectiva en el mundo real. Nótese que la representación gráfica es un trazo en un papel que realizamos para aumentar la realidad de aquello que estudiamos al escapar a nuestra capacidad visual (el *mundus abspectabilis*). A su vez, señalar que la representación de la PUP20 hace referencia a una PUP genérica de ratón. En el apartado de demostración se ha intentado enfatizar la falta de estatus científico como realidad de la PUP20

Primero de todo, desde un punto de vista metodológico, nosotros hemos analizado la posición de los especímenes de ratón en la caja experimental en un test de preferencia (véase **Figura 20**) que enfrentaba estímulo neutro con D. Como comentamos en el apartado anterior de esta discusión, la conducta de evitación/atracción es un indicador robusto, aunque inespecífico, de interés hacia el estímulo. Sin embargo, por esa inespecificidad, debemos de mirar con más detalle la conducta del animal y los datos. En el artículo publicado en 2010 en el que el equipo de Jane Hurst bautizo a la PUP20 como Darcin, llamado *Darcin: a male pheromone that stimulates female memory and sexual attraction to an individual male's odour* (Roberts et al., 2010), utilizaron un test de comportamiento en el que median el tiempo en segundos que los ratones hembra pasaban bajo el estímulo olfativo. El estímulo olfativo estaba colocado a una altura que permitía el contacto directo con las quimioseñales no volátiles del mismo. Los resultados son estadísticamente significados, aunque consideramos que los tiempos que muestran las gráficas ponen en duda la robustez del resultado.

Así, los ensayos conductuales realizados en este artículo son de 600 segundos. Los tiempos aproximados extraídos de las gráficas de exploración a la PUP20 recombinante frente a un estímulo control son de 9,5s y 5,5s respectivamente. Si lo convertimos a porcentaje de tiempo explorado respecto del total del ensayo encontramos que la exploración es de 1,6% hacia la r-PUP20 frente a un 0,92% del estímulo control, una diferencia de 0,7% en la exploración.

En otro artículo de publicación más reciente en la revista *Nature* titulado *The pheromone darcin drives a circuit for innate and reinforced behaviours* (Demir et al., 2020), casi 10 años después del bautizo de Darcin y en colaboración con Jane Hurst, se encontró que entre las conductas estereotipadas que promueve la exposición a D están el cambio en la conducta de vocalización (en el número total de vocalizaciones y su frecuencia acústica) y en la conducta de marcaje con orina (con mayor número de marcas y de menor tamaño que en la zona del estímulo control). Sin embargo, para llegar a estos resultados tuvieron que exponer a los animales a ensayos en cajas de experimentación durante un tiempo de 50 a 100 minutos. Nosotros sacamos la conclusión, teniendo en cuenta estos

artículos, que el poder como feromona de la D es limitado, cuestionando entonces la conceptualización realizada sobre la misma y su estatus como realidad científica.

Otro concepto metodológico que debería de cuestionarse es la validez de constructo de las variables conductuales que analizamos. Los mamíferos tienen un amplio repertorio conductual, y muchas de estas conductas pueden hacer referencia a varios estados internos. Un ejemplo intuitivo lo podemos encontrar en los seres humanos. El manual de diagnóstico de enfermedades mentales está desarrollado en base a síntomas posibles, algunos de ellos coincidentes entre trastornos y otros pertenecientes a la conducta normal. Así, en una de las reuniones para el desarrollo de criterios diagnósticos entre el DSM II-TR (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) y el DSM III de la Asociación Americana de Psiquiatría hubo criterios sintomáticos descartados de entre los propuestos porque los expertos psiquiatras reunidos argumentaban padecerlos personalmente (Davies, 2014). Ampliando el ejemplo, en los seres humanos hay conductas depresivas que tradicionalmente se han colocado en el ámbito

de la moral, como las conductas de inactivación por depresión que han sido (y son) tratadas como vagancia y falta de voluntad.

En el caso de la experimentación con *Mus musculus* encontramos conductas de mayor a menor especificidad. Así, en la tercera parte de la tesis, dedicada a las conductas del sistema de supervivencia defensivo, describimos las conductas defensivas de parálisis y la conducta de evaluación del riesgo. Sin embargo, en el caso de la atracción sexual no encontramos ningún comportamiento tan saliente como estos. De hecho, la variable dependiente (VD) de los experimentos que miden atracción suele ser el tiempo que el animal pasa cerca de un estímulo atractivo. Esta VD, sobre todo cuando es medida con métodos automatizados de análisis de conducta, puede dar a entender una atracción que no existe y no estar determinada por la situación experimental creada. Así, un animal podría estar más tiempo en una zona por el simple hecho de ser valorada como una zona más segura por el mismo o evaluarla con más probabilidades de escape de la estresante situación experimental.

Además, la validez ecológica de estas observaciones es un factor que compromete la interpretación de los resultados.

Siguiendo a Gustavo Bueno (Bueno, 1992) en su idea de la verdad sintética en la ciencia, para que una realidad biológica se consolide debe de existir coherencia en la intersección de las observaciones de las distintas ciencias biológicas. Es decir, en el caso de la validez etológica, las respuestas conductuales encontradas en el laboratorio deberían de ser corroboradas por observaciones etológicas realizadas en entornos lo más naturales posibles. Bueno comenta que el conocimiento primero que encontramos en las verdades de manera intelectual (*Ordo cognitum*) ya asentadas muchas veces lo obtenemos mediante las sensaciones (*Ordo essendi*). Así, el etólogo actúa como el médico que parte de los síntomas para diagnosticar una enfermedad. Comenta Bueno (2016):

“¿Cuáles son los primeros indios de una crisis? ¿cuáles son los primeros síntomas de una enfermedad? Calor, Dolor, Rubor, Tumor”. El tumor será la causa de los otros síntomas; pero no por ello es el primer conocido del proceso, porque acaso el primer síntoma es dolor, aunque también este puede ser una falsa alarma, y, en realidad, su condición de síntoma cierto depende de la realidad de tumor, que acaso en el primer momento ni siquiera existe”

Podemos decir pues que el análisis de la conducta por parte del investigador pertenece al *ordo essendi* y que investigaciones posteriores nos harán comprobar lo apropiado de alcanzar un conocimiento verdadero. El papel que el análisis automatizado puede llegar a tener sobre la conducta burdifica un correcto análisis, convirtiendo así las conclusiones extraídas de esta en un *Primum cognitum* no veraz que afectará a las conclusiones del estudio.

La ciencia, desde un punto de vista material y no metafísico, es una actividad humana que posee una serie de contextos sociales que van modulando la actividad de los científicos. Sin caer en el antirrealismo derivado de la sociología del conocimiento científico (véase Madrid, 2018), podemos hablar siguiendo al sociólogo de la ciencia Bruno Latour que el asentamiento de entidades científicas (*id est*, hiperrealidades, como el fermento del ácido láctico descubierto por Louis Pasteur en 1857) requiere de un proceso histórico de “estabilización de la entidad” que ha de superar el “drama ontológico” de la construcción científica (Latour, 2001). Es decir, siguiendo el ejemplo de Pasteur, es necesario un laboratorio con una determinada tecnología (contextos determinantes de los

descubrimientos científicos ya que son *sine qua non*), unos ingredientes (en este ejemplo, la levadura de cerveza), de acciones practicas (gestos propios de la experimentación en un laboratorio de química) y de observaciones de los resultados, entre otros. Pero, además, es necesaria una comunidad científica, una Academia de las Ciencias, una sociedad, etc. Siguiendo a Carlos Madrid (2018, pp. 248)

“El bricolaje científico articula proposiciones y cosas en una red, que cuando se estabilizan otorga una existencia relativa (no eterna) al fermento. Y esta articulación se hace, obviamente, en la historia, pues se radia a partir de un lugar o de un tiempo concretos.”

Así, retomando el estatus científico de la PUP20, debemos de ser conscientes de que su reconocimiento actual en la ciencia puede ser debido a factores sociológicos que han de compensarse (es decir, estabilizarse) con el paso del tiempo. Existen, pues, entretejidos con la investigación científica, dos sesgos que pueden enturbiar las conclusiones extraídas de los resultados experimentales. En primer lugar, el fetichismo de la mercancía y la tendencia a la publicación de resultados positivos en las revistas científicas de revisión por pares. Así, el fetichismo

de la mercancía, que es la focalización a la materialización en forma de producción de literatura científica y el factor de impacto de la misma provocaría un sesgo en los propios resultados y una exageración en sus conclusiones (Madrid, 2018). Por ejemplo, la exageración de la diferencia encontrada en los experimentos del artículo de Roberts y colaboradores (2010) y el bautizo hiperbólico de la PUP20, literaturizando una proteína presente en la orina de ratón con el nombre de un personaje de novela romántica inglesa de principios del siglo XIX. Por otro lado, el sesgo de confirmación crearía un efecto en la literatura científica que mostraría una confirmación general de los efectos conductuales de la Darcina al complicarse la publicación (*i. e.* la socialización) de resultados científicos contrarios a la hipótesis de la PUP20 como feromona sexual en ratones.

En conclusión, respecto a la Darcina no podemos mantenerla como entidad motivadora principal de la conducta de atracción en ratones, al contrario de lo que fue propuesto por Hurts y su equipo en 2010 o como su pomposo nombre nos daría a entender. Como diría Gustavo Bueno (1992), “no hay descubrimiento sin justificación”, esto es, no hay descubrimiento sin comprobación ulterior. Nosotros proponemos, a la vista de

nuestros resultados, que esta justificación ulterior de las características de la D no existe o en el mejor de los casos muestra un panorama incompleto de la PUP20. Asimismo, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el resto de experimentos presentados, habría que revisar el estatus otorgado actualmente a las señales de enfermedad y a las kairomonas que hemos usado como estímulos.

Múltiples determinantes de la Conducta Sociosexual

La conducta social requiere, siguiendo la metáfora que asemeja los sistemas nerviosos con un ordenador, la realización de una toma de decisiones (O'Connell y Hofmann, 2012) en la que se realiza la integración de diferentes fuentes de información sobre los estados internos del sujeto y las amenazas/beneficios sobre la homeostasis del organismo (véase **Figura 1**; Chen y Hong, 2018). Así, la conducta de reproducción en roedores requiere la integración sensorial de varios tipos de estímulos para que se produzca: estímulos olfativos como las quimioseñales propias de cada sexo; estímulos auditivos como

las ultravocalizaciones específicas del cortejo sexual (Portfors, 2007); estimulación háptica previa al inicio de la copula. Esta necesidad de integración de señales debe de estar coordinada, en las conductas sociales, por al menos dos individuos que interactúan en un mismo medio.

En esta tesis nos hemos centrado en las quimioseñales olfativas que inician conductas de atracción y o de evitación. Pero nuestros experimentos han sido diseñados bajo la hipótesis de que el estímulo mismo bastaba para el desarrollo de estas conductas. Sin embargo, nuestros resultados son negativos para las hipótesis principales que manejábamos. En el apartado anterior hablábamos sobre el estatuto ontológico de la PUP20, la Darcina, como feromona. En la literatura podemos encontrar casos similares en los que se pensaba que una sola molécula podía controlar la conducta sexual de alguna especie. Es el caso de la llamada Copulina, presente en las secreciones vaginales en la especie *Macacus rhesus* y que inicia comportamientos de cópula en machos (Michael y Keverne, 1968; 1970). Sin embargo, el comportamiento de cópula no se extingue ante la extirpación de los bulbos olfativos, indicando que la copulina no sería más que una señal más dentro de un amplio repertorio de

señales que son integradas por los machos de los monos Rhesus antes de iniciar la conducta reproductiva.

Pero también existen una serie de variables internas propias del sujeto que modulan el desarrollo o no de determinadas conductas. Uno de estos factores es la madurez de los individuos. En el caso de los ratones, se ha comprobado que la misma molécula puede conducir a diferentes conductas según se ha dado la madurez sexual. En el caso de los ratones macho, no es hasta la pubertad que responderán con conductas agresivas ante estímulos procedentes de otros machos, sin responder a estos previamente a los cambios organizativos de las hormonas durante este periodo (Sano et al., 2016; Sisk y Zerh, 2005). En los seres humanos, durante la fase del ciclo vital denominada adolescencia, se producirán cambios comportamentales que presentan un aumento de búsqueda de sensaciones y toma de riesgos (Compas, Connor-Smith y Jaser, 2004; Balzer et al., 2015). Desde un punto de vista neuroanatómico se ha encontrado en humanos y otros primates una reducción en la actividad de la corteza insular y un aumento de la actividad del sistema de refuerzo y de la actividad dopaminérgica durante la etapa de la adolescencia (Bashkatov

y Garipova, 2022). A esto se hay que sumarle los cambios durante este periodo vital en el funcionamiento de la corteza prefrontal, relacionada con diversos aspectos de la conducta socio-sexual, incluido las conductas de evitación de enfermedad (Lesnack et al., 2022).

Así pues, un mismo individuo puede tener diferentes conductas ante los mismos estímulos (o ante la misma situación experimental) dependiendo de variables como el sexo, el estado reproductivo o incluso experiencias previas que hayan supuesto aprendizaje (Stowers & Liberles, 2016; Anderson, 2016; Chen y Hong, 2018). Se ha comprobado que las preferencias sexuales por olores del sexo opuesto pueden ser modificadas incluso en la edad adulta (véase Martínez-García et al., 2008). De hecho, la preferencia de olores de hembras en estro parece que es en parte resultado del contacto con estas en edad adulta por parte de ratones machos (Carr, Loeb y Dissinger, 1965; Doty y Dunbar, 1974; Le Magnen, 1951).

Un ejemplo de efecto complejo sobre la conducta lo encontramos en la relación de los estrógenos y las reacciones de estrés y ansiedad en roedores (Le Moëne y Agmo, 2018). Se ha encontrado un efecto de los estrógenos en roedores

ovariectomizados en situaciones experimentales ansiogénicas como el laberinto elevado en cruz, aumentando estos el tiempo que los sujetos pasaban en los brazos abiertos del mismo (Nomikos y Spyraiki, 1988) o en el centro de una caja de experimentación abierta (Walf y Frye, 2007). Aunque se ha interpretado, por lo tanto, un efecto tranquilizador del estrógeno, otros estudios no han encontrado este efecto en situaciones similares (Martinez-Mota et al., 2000; Walf y Frye, 2008) o han encontrado aumento de las respuestas de ansiedad (Mora, Dussaubat y Díaz-Véliz, 1996). Es decir, parece que la modulación de la ansiedad por parte del estrógeno presenta de por sí una relación compleja, abriendo la puerta a la existencia de otros factores que influyan en esta relación. De hecho, se ha propuesto como hipótesis que el efecto ansiolítico de los estrógenos dependería de la percepción del ambiente como seguro o amenazante, siendo ansiolítico en el primer tipo y ansiogénico en el segundo (Mora, Dussaubat y Díaz-Véliz, 1996). Sin embargo, esta hipótesis aún requiere de confirmación (Le Moëne y Agmo, 2018).

Kavaliere y su equipo apuntan a la importancia de los estrógenos en la conducta social de roedores (Ervin et al., 2015).

Así, mantienen la hipótesis de que los receptores de estrógenos ER α , ER β y GPER1 tendrían un papel en las conductas de evitación a enfermedad (entre otros comportamientos sociales mediante su presencia en la Me (Lymer et al., 2018) y la influencia en la síntesis y liberación de oxitocina en ésta por parte de los receptores ER β y GPER1 (Kavaliers et al., 2022; Ervin et al, 2015; Aspesi y Choleris, 2022). Por otro lado, la progesterona también ha sido relacionada con la expresión de comportamientos sociosexuales, mostrando incluso diferencias de sexo al haber sido implicada en un aumento de la evitación de patógenos y sustancias tóxicas en la llamada Teoría de la Compensación Profiláctica (Fessler, Eng y Navarrete, 2005; Fleischman y Fessler, 2011) mostrando en mujeres un aumento de estas conductas en los momentos del ciclo menstrual de mayores niveles de progesterona. Además, en ratones hembra, la administración de progesterona aumenta la evitación de machos que presentan síntomas de infección, aunque el reconocimiento social también se vio afectado (Kavaliers et al., 2021)

Sin embargo, nuestros resultados en el estudio de viruta controlando las fases del ciclo estral presentados en la Parte II

de esta tesis ponen en entredicho la afirmación de que las hormonas relacionadas con el ciclo estral son necesarias para la presencia de conductas de atracción hacia feromonas masculinas, como ya encontramos en otros experimentos (Moncho-Bogani et al., 2002 y 2004). Por otro lado, también hay evidencia contraria a la hipótesis del efecto de la progesterona en la conducta de evitación de hembras hacia machos con enfermedad (Stern y Shiramizu, 2022). En conclusión, la influencia que posee la fluctuación de las hormonas durante el ciclo estral en la conducta social, así como de sus mecanismos neuronales de acción, requiere mayor investigación con un desarrollo de hipótesis sobre su influencia que recoja la multicausalidad que la conducta social de los mamíferos posee.

Por otro lado, desde un punto de vista evolutivo, las feromonas son sustancias usadas para la comunicación intraespecie. Probablemente, cuanto más podamos definir una especie como social, mayor información transmitirá a través de éstas. En esta tesis hemos tratado en las partes II y III de cómo afectan las feromonas, las señales de enfermedad y las señales de depredador (kairomonas) en la conducta de individuos de la especie *Mus musculus*. Aunque el sentido

para la supervivencia del organismo de la respuesta a las kairomonas está claro, consideramos que la explicación del significado adaptativo de la evitación de conoespecíficos con enfermedad (Penn et al., 1998), no lo está tanto. Así, la enfermedad no está definida como un todo o nada (McWhinney, 1987) y no sería óptimo que la respuesta ante la presencia de señales de enfermedad también lo sea. En un entorno natural, el contacto con patógenos es mayor, aumentando así la probabilidad de padecer en cierto grado un estado de salud comprometido. La evitación inmediata de estos congéneres enfermos no graves no es necesariamente una buena opción. Por ello, creemos que en el caso unas hipotéticas feromonas de enfermedad el procesamiento neuronal es más complejo y proponemos un modelo más probabilístico que determinista para valorar sus mecanismos actuación. En el caso de la detección de congéneres que padecen algún grado de enfermedad, consideramos que, al contrario que la respuesta de evitación desencadenada por señales de depredador, existiría un umbral en el cual se necesitaría una alta activación de las neuronas receptoras

para provocar una respuesta de evitación. En el caso contrario, las señales de enfermedad serían una especie de señal informativa no aversiva que no evitaría el acercamiento y así, en un entorno natural, nos encontraríamos con un mecanismo que no es “todo o nada”, sino más bien una cuestión de grado en la que debajo del umbral de activación el estímulo no sea más que una señal de individualidad que favorezca el reconocimiento.

Los resultados obtenidos en los experimentos expuestos en esta tesis pueden señalar problemas de validez ecológica debido a la artificialidad del entorno experimental. El entorno natural donde tienen lugar las interacciones entre los individuos de la especie *Mus musculus* es muy diferente al contexto creado para la comprobación de las hipótesis conductuales desarrolladas en esta tesis. Ecológicamente, los ratones conviven en un ambiente donde la interacción entre señales (como las feromonas y las kairomonas) y los individuos que las secretan y los que las detectan, así como sus conductas, son muy complejos. Como podemos observar en el caso de nuestros experimentos con el estímulo complejo viruta de macho, en los que al enfrentar la viruta de macho sano contra el estímulo de

viruta manchada por hembra en el test de preferencia los sujetos de la muestra tienden a pasar más tiempo cerca del primero (véase **Figura 38**), pero sin embargo al enfrentar en otro experimento viruta de macho sano con un estímulo neutro (viruta del mismo tipo, pero limpia) esta atracción desaparece (véase las ratios de las **Figuras 40 y 41**). Una posible explicación de estos resultados dispares es que estas señales tendrían diferentes significados para los individuos dependiendo de factores contextuales externos (competición con otras señales; estacionalidad de las conductas; etc) y de factores internos (estados motivacionales que priman sobre la conducta objetivo, etc).

Los resultados de esta tesis apuntan a la necesidad de comprender la conducta animal como el resultado de diversos y complejos procesos de evaluación (automáticos o dirigidos) de estímulos procedentes del exterior y estados motivacionales internos. Al analizar estas conductas en el laboratorio intentando controlar las variables para reducir el error probablemente estemos creando nuevas fuentes de incertidumbre que aumentan la varianza estadística haciendo los resultados obtenidos menos confiables. No sabemos entonces si lo que

observamos en nuestros animales de experimentación es la conducta que queremos estudiar o una “representación” de lo que debería ser. Como concluyen Kavaliers y su equipo (2022):

“Investigations of the proximate neural and neuromodulatory mechanisms associated with pathogen avoidance under naturalistic and semi-naturalistic environments, such as those examining sickness behaviour and sexual and neuroendocrine responses, are needed [8,104,105]. A related question is how might a changing environment impact on neuromodulatory mechanisms and pathogen avoidance? Endocrine disruptors, pollutants and climate change may alter both hormonal levels (e.g. sex steroids and glucocorticoids) and sensory perception and integration.”

La perspectiva de experimental de Le Moëne y Agmo (2018), de la universidad de Tromso en Noruega consiste en la idea de que para el entendimiento del funcionamiento de variables que influyen en la conducta social (como la influencia de las hormonas del ciclo estral en la conducta copulatoria) hay que aumentar la validez externa de los experimentos. Para ello realizan experimentos de laboratorio en los que intentan imitar

las condiciones naturales en las que los animales desarrollan en la naturaleza la conducta objetivo de medición. Por ejemplo, en el caso de las conductas reproductivas en ratas, ellos diseñaron una situación experimental en la que hay grupos con varios machos y hembras y lugares donde las ratas hembra puedan esconderse de otros miembros del grupo. Denominan a este ambiente experimental “diseño de ambiente seminatural” (Le Moëne y Ågmo, 2018; Chu y Ågmo, 2014; Chu y Ågmo, 2015b; Chu y Ågmo, 2015a; Chu y Ågmo, 2016). Así, concluyen respecto al análisis que se suele realizar en los experimentos de conducta animal:

“The frequency or duration of behavioural items give only a rudimentary description of behavior. Behavior patterns are displayed in a continuous flow, and the sequence of behavior is completely ignored in frequency and duration analysis [...] In nature, rats live and copulate in groups, and most of their activities are localized within the well-know home range. These characteristics are preserved in the seminatural environment but entirely absent in most other test” (pp. 175)

Concluimos, por lo tanto, que hasta que los experimentos no sean llevados a cabo en estados naturales no podremos

hablar de haber desenvuelto el entresijo que supone la conducta social en animales, ya no digamos en los seres humanos. Se requiere, por lo tanto, de un nivel de validez externa alto para poder sacar conclusiones generales que nos permitan trasladar los resultados a futuros trabajos que nos ayuden a entender la conducta social de los seres humanos.

Conclusiones Generales

- 1.** Los resultados nos indican un efecto nulo de los estímulos utilizados. Los modelos de viruta y orina con Lipopolisacárido de *Escherichia coli* 0111:B4 en orina o viruta, así como de kairomonas de gato, rata y lobo que hemos utilizado no han tenido efecto sobre la conducta en un análisis cualitativo (conductas estereotipadas de la especie como la parálisis por miedo (“Freezing”) o la exploración del riesgo (“Risk assesment”)) ni tampoco en la variable cuantitativa que hemos utilizado en este doctorado “Tiempo en el área del estímulo”.
- 2.** Por otro lado, en los experimentos de preferencia de orina, nuestro diseño experimental nos indica una atracción hacia los componentes volátiles de la orina de macho tratado con LPS. Esta preferencia se muestra cambiando diferentes condiciones experimentales como el tamaño de la caja (250mm x 500mm x 300mm vs 895mm x 150mm x 300mm),

la cepa (C57B/6JR vs SWISS RjOrl: SWISS) o el experimentador encargado del manejo de los animales.

- 3.** A la vista de nuestros resultados en el experimento de usando Darcina y Péptidos Formilados y de la metodología utilizada tanto por nosotros como en experimentos de otros laboratorios, consideramos que la PUP20 no se asienta en unos pilares metodológicas adecuadas para justificar su estatus como hiperrealidad con capacidades de feromona.
- 4.** Asimismo, los resultados obtenidos en los experimentos en los que usamos kairomonas de gato, rata y 2,3,5-Trimetilpirazina nos permiten justificar la existencia como hiperrealidad de señales intraespecie en las fuentes de quimioseñales utilizadas.
- 5.** Finalmente, la conducta en general, y sociosexual en particular, está influida por una multitud de factores que se relacionan de forma compleja en roedores y en otros mamíferos. En base a esto, señalamos la importancia de la intersección de varios niveles de

Parte IV: Discusión General

análisis (e.g. etológico U bioquímico U evolutivo U molecular, etc.) llegando más allá del contexto del laboratorio para elaborar conclusiones certeras sobre conductas complejas.

Referencias

- Abe, T., & Touhara, K. (2014). Structure and function of a peptide pheromone family that stimulate the vomeronasal sensory system in mice. *Biochemical Society transactions*, 42(4), 873–877. <https://doi.org/10.1042/BST20140051>
- Abrams, P. A. (2000). The Evolution of Predator-Prey Interactions: Theory and Evidence. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 31, 79–105. <http://www.jstor.org/stable/221726>
- Agustín-Pavón, C., Martínez-García, F., & Lanuza, E. (2014). Focal lesions within the ventral striato-pallidum abolish attraction for male chemosignals in female mice. *Behavioural Brain Research*, 259, 292–296. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2013.11.020>
- Alcock, J. (2009) *Animal Behavior: an evolutionary approach*. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Alexander, R. D. (1974). The Evolution of Social Behavior. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 5(1), 325–383. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ES.05.110174.001545>
- Alvarado, C., Udawatta, M., Bryda, E. & Hagan, C. (2013). What is that smell? Investigating the potential impact of shared behavior space in a rat and mouse facility. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 52(5), 678.

- Anderson D. J. (2016). Circuit modules linking internal states and social behaviour in flies and mice. *Nature reviews. Neuroscience*, 17(11), 692–704. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.125>
- Anderson, D. J., & Adolphs, R. (2014). A framework for studying emotions across species. *Cell*, 157(1), 187–200. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.003>
- Anisman, H., Hayley, S., Kelly, O., Borowski, T., & Merali, Z. (2001). Psychogenic, neurogenic, and systemic stressor effects on plasma corticosterone and behavior: mouse strain-dependent outcomes. *Behavioral neuroscience*, 115(2), 443–454.
- Apfelbach, R., Blanchard, D. C., Blanchard, R. J., Hayes, R. A., & McGregor, I. S. (2005). The effects of predator odors in mammalian prey species: a review of field and laboratory studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(8), 1123–1144. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.05.005>
- Arakawa, H., Kelliher, K. R., Zufall, F., & Munger, S. D. (2013). The Receptor Guanylyl Cyclase Type D (GC-D) Ligand Uroguanylin Promotes the Acquisition of Food Preferences in Mice. *Chemical Senses*, 38(5), 391–397. <https://doi.org/10.1093/CHEMSE/BJT015>
- Arakawa, H., Cruz, S., & Deak, T. (2011). From models to mechanisms: odorant communication as a key determinant of social behavior in rodents during illness-associated states. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 35(9),

1916–1928.

<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.03.007>

Arndt, S. S., Lohavech, D., van't Klooster, J., & Ohl, F. (2010). Co-species housing in mice and rats: effects on physiological and behavioral stress responsivity. *Hormones and behavior*, 57(3), 342–351. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.01.003>

Armstrong, S. D., Robertson, D. H. L., Cheetham, S. A., Hurst, J. L. & Beynon, R. J. (2005). Structural and functional differences in isoforms of mouse major urinary proteins: a male-specific protein that preferentially binds a male pheromone. *Biochemical Society*, 391, 343–350. <https://doi.org/10.1042/BJ20050404>

Asa, C. S., Mech, L. D., & Seal, U. S. (1985). The use of urine, faeces, and anal-gland secretions in scent-marking by a captive wolf (*Canis lupus*) pack. *Animal Behaviour*, 33(3), 1034–1036. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(85\)80043-9](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(85)80043-9)

Aspesi, D., & Choleris, E. (2022). Neuroendocrine underpinning of social recognition in males and females. *Journal of neuroendocrinology*, 34(2), e13070. <https://doi.org/10.1111/jne.13070>

Aunger, R., & Curtis, V. (2013). The Anatomy of Motivation: An Evolutionary-Ecological Approach. *Biological Theory* 2013 8:1, 8(1), 49–63. <https://doi.org/10.1007/S13752-013-0101-7>

Axel, R. (2005). Scents and sensibility: a molecular logic of olfactory perception (Nobel lecture). *Angewandte Chemie*

(*International ed. in English*), 44(38), 6110–6127.
<https://doi.org/10.1002/anie.200501726>

Bacchini, A., Gaetani, E., & Cavaggioni, A. (1992). Pheromone binding proteins of the mouse, *Mus musculus*. *Experientia*, 48(4), 419–421.
<https://doi.org/10.1007/BF01923448>

Balzer, B. W., Duke, S. A., Hawke, C. I., & Steinbeck, K. S. (2015). The effects of estradiol on mood and behavior in human female adolescents: a systematic review. *European journal of pediatrics*, 174(3), 289–298.
<https://doi.org/10.1007/s00431-014-2475-3>

Balu, R., Pressler, R. T. & Strowbridge, B. W. (2007). Multiple Modes of Synaptic Excitation of Olfactory Bulb Granule Cells, 27(21), 5621–5632.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4630-06.2007>

Barrios, A. W., Núñez, G., Sánchez-Quinteiro, P., & Salazar, I. (2014). Anatomy, histochemistry and immunohistochemistry of the olfactory subsystems in mice. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8, 63.
<http://doi.org/10.3389/fnana.2014.00063>

Bashkatov, S. A., & Garipova, M. I. (2022). On the age-specific neurochemical and endocrine biomarkers of temperament traits in adolescents. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 43, 118–124.
<https://doi.org/10.1016/J.COBEHA.2021.09.002>

Beauchamp, G. K., & Yamazaki, K. (2003). Chemical signalling in mice. *Biochemical Society transactions*, 31(Pt 1), 147–151. <https://doi.org/10.1042/bst0310147>

- Beaton, E. A., Khan, A., & deCatanzaro, D. (2006). Urinary sex steroids during sexual development in female mice and in proximate novel males. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*, 38(8), 501–506. <https://doi.org/10.1055/s-2006-949521>
- Been, L. E., Gibbons, A. B., & Meisel, R. L. (2019). Towards a neurobiology of female aggression. *Neuropharmacology*, 156, 107451. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.11.039>
- Bergan, J. F., Ben-Shaul, Y., & Dulac, C. (2014). Sex-specific processing of social cues in the medial amygdala. *eLife*, 3, e02743. <https://doi.org/10.7554/eLife.02743>
- Bernard, L. C. (2012). Evolved individual differences in human motivation. In R. M. Ryan (Ed.), *The Oxford handbook of human motivation* (pp. 381–407). New York, NY: Oxford University Press.
- Berton, F., Vogel, E., & Belzung, C. (1998). Modulation of mice anxiety in response to cat odor as a consequence of predators diet. *Physiology & behavior*, 65(2), 247–254. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(98\)00126-7](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(98)00126-7)
- Bingel, A. S. (1972). Estrous Cyclicity in Mice Housed in the Presence or Absence of Males. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 139(2), 515–517. <https://doi.org/10.3181/00379727-139-36176>
- Bjerg, A., Winberg, A., Berthold, M., Mattsson, L., Borres, M. P., & Rönmark, E. (2015). A population-based study of animal component sensitization, asthma, and rhinitis in schoolchildren. *Pediatric allergy and immunology : official*

publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology, 26(6), 557–563.
<https://doi.org/10.1111/pai.12422>

- Blaustein, J. D. & Erskine, M. S. (2002) Feminine sexual behavior: Cellular integration of hormonal and afferent information in the rodent brain. In Pfaff, D. W., Arnold, A. P., Etgen, A. M., Fahrbach, S. E. & Rubin, R. T. (eds), *Hormones Brain and Behavior*. Academic Press, San Diego, pp. 139-214.
- Blaustein, J. D. (2008). Neuroendocrine regulation of feminine sexual behavior: lessons from rodent models and thoughts about humans. *Annual Review of Psychology*, 59, 93–118.
<https://doi.org/10.1146/annurev.psych.59.103006.093556>
- Bloes, D. A., Kretschmer, D., & Peschel, A. (2015). Enemy attraction: bacterial agonists for leukocyte chemotaxis receptors. *Nature reviews. Microbiology*, 13(2), 95–104.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro3390>
- Blomberg, S. P., Garland, T., & Ives, A. R. (2003). Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution*, 57(4), 717–745.
<https://doi.org/10.1111/J.0014-3820.2003.TB00285.X>
- Blum, M. S. (1996). Semiochemical parsimony in the Arthropoda. *Annual Review of Entomology*, 41, 353–374.
<http://doi.org/10.1146/annurev.ento.41.1.353>
- Boillat, M., Challet, L., Rossier, D., Kan, C., Carleton, A., & Rodriguez, I. (2015). The vomeronasal system mediates sick conspecific avoidance. *Current biology: CB*, 25(2), 251–255. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.11.061>

- Borowsky, B., Adham, N., Jones, K. A., Raddatz, R., Artymyshyn, R., Ogozalek, K. L., Durkin, M. M., Lakhiani, P. P., Bonini, J. A., Pathirana, S., Boyle, N., Pu, X., Kouranova, E., Lichtblau, H., Ochoa, F. Y., Branchek, T. A., & Gerald, C. (2001). Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(16), 8966–8971. <https://doi.org/10.1073/pnas.151105198>
- Boulay, F., Tardif, M., Brouchon, L., & Vignais, P. (1990). The human N-formylpeptide receptor. Characterization of two cDNA isolates and evidence for a new subfamily of G-protein-coupled receptors. *Biochemistry*, *29*(50), 11123–11133. <https://doi.org/10.1021/bi00502a016>
- Brechbühl, J., M. et al. (2013). Mouse alarm pheromone shares structural similarity with predator scents. *Pnas*, *110*(12), 1–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.1214249110/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1214249110>
- Brechbühl, J., Klaey, M., & Broillet, M. C. (2008). Grueneberg ganglion cells mediate alarm pheromone detection in mice. *Science (New York, N.Y.)*, *321*(5892), 1092–1095. <https://doi.org/10.1126/science.1160770>
- Brechbühl, J., Moine, F., Tosato, M. N., Sporkert, F., & Broillet, M. C. (2015). Identification of pyridine analogs as new predator-derived kairomones. *Frontiers in neuroscience*, *9*, 253. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00253>
- Brennan P. A. (2018). 50 years of decoding olfaction. *Brain and neuroscience advances*, *2*, 1-5. <https://doi.org/10.1177/2398212818817496>

- Brennan, P. A. & Kendrick, K. M. (2006). Mammalian social odours: attraction and individual recognition. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*. 361 (1476), 2061–2078. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1931>
- Brennan, P. A. & Keverne, E. B. (2004). Something in the Air? New Insights into Mammalian Pheromones Olfaction is the dominant sensory modality for most. *Current Biology*, 14, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.12.052>
- Brennan, P. A., & Zufall, F. (2006). Pheromonal communication in vertebrates. *Nature*, 444(7117), 308–315. <https://doi.org/10.1038/nature05404>
- Broman, I. (1921). Über die Entwicklung der konstanten grösseren Nasennebenhöhlendrüsen der Nagetiere. *Z. Anat. Entwickl. Gesch.*, 60, 439–586.
- Bronson, F. H., & Whitten, W. K. (1968). Oestrus-Accelerating Pheromone of Mice: Assay, Androgen-Dependency and Presence in Bladder Urine, *Reproduction*, 15(1), 131-134.
- Bruce, H. M. (1960). A block to pregnancy in the mouse caused by proximity of strange males. *Journal of reproduction and fertility*, 1, 96–103. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0010096>
- Buck, L. B. (2000). *Smell and taste: The chemical senses*. (E. R.Kandel, J. H.Schwartz, T. M., Jessell, S. A. Siegelbaum, & A.. Hudspeth, Eds.) *Principles of neural science* (Fourth, Vol. 4). McGraw-Hill.
- Buck L. B. (2005). Unraveling the sense of smell (Nobel lecture). *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 44(38), 6128–6140. <https://doi.org/10.1002/anie.200501120>

- Buck, L., & Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65(1), 175–187. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90418-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90418-x)
- Bueno, G. (1992). *Teoría del cierre categorial*. Pentalfa.
- Bueno, G. (2016). *El ego trascendental*. Pentalfa.
- Bufe, B., Schumann, T., Kappl, R., Bogeski, I., Kummerow, C., Podgórska, M., Smola, S., Hoth, M., & Zufall, F. (2015). Recognition of bacterial signal peptides by mammalian formyl peptide receptors: a new mechanism for sensing pathogens. *The Journal of biological chemistry*, 290(12), 7369–7387. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.626747>
- Bufe, B., Teuchert, Y., Schmid, A., Pyrski, M., Pérez-Gómez, A., Eisenbeis, J., Timm, T., Ishii, T., Lochnit, G., Bischoff, M., Mombaerts, P., Leinders-Zufall, T., & Zufall, F. (2019). Bacterial MgrB peptide activates chemoreceptor Fpr3 in mouse accessory olfactory system and drives avoidance behaviour. *Nature communications*, 10(1), 4889. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12842-x>
- Burgener, N., Dehnhard, M., Hofer, H., & East, M. L. (2009). Does anal gland scent signal identity in the spotted hyaena? *Animal Behaviour*, 77(3), 707–715. <https://doi.org/10.1016/J.ANBEHAV.2008.11.022>
- Butenandt, A. (1959). *Geschlechtsspezifische Lockstoffe der Schmetterlinge*.
- Butenandt, A., Beckmann, R., & Hecker, E. (1961). Über den Sexuallockstoff des Seidenspinners, I: Der biologische Test und die Isolierung des reinen Sexuallockstoffes

- Bombykol. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Fur Physiologische Chemie*, 324(1), 71–83.
https://doi.org/10.1515/BCHM2.1961.324.1.71/MACHINE_READABLECITATION/RIS
- Byers, S. L., Wiles, M. V., Dunn, S. L., & Taft, R. A. (2012). Mouse estrous cycle identification tool and images. *PloS one*, 7(4), e35538.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035538>
- Bzdok, D., & Dunbar, R. (2020). The Neurobiology of Social Distance. *Trends in cognitive sciences*, 24(9), 717–733.
<https://doi.org/10.1016/j.tics.2020.05.016>
- Cadiz, B., Martinez-Garcia, F., & Lanuza, E. (2013). Neural Substrate to Associate Odorants and Pheromones: Convergence of Projections from the Main and Accessory Olfactory Bulbs in Mice. In *Chemical Signals in Vertebrates 12* (pp. 3–16). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5927-9>
- Cain, C. K., & LeDoux, J. E. (2008). Chapter 3.1 Brain mechanisms of Pavlovian and instrumental aversive conditioning. *Handbook of Behavioral Neuroscience*, 17, 103–124. [https://doi.org/10.1016/S1569-7339\(07\)00007-0](https://doi.org/10.1016/S1569-7339(07)00007-0)
- Cajal, S. R. (1911). Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. *Volume 2. Paris: Maloine*, 891–942.
<http://doi.org/http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.48637>
- Calvo-Torrent, A., Brain, P. F., & Martinez, M. (1999). Effect of predatory stress on sucrose intake and behavior on the plus-maze in male mice. *Physiology & behavior*, 67(2), 189–196. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(99\)00051-7](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(99)00051-7)

- Canteras N. S. (2002). The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 71(3), 481–491. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(01\)00685-2](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(01)00685-2)
- Canteras, N. S. (2008). Chapter 3.2 Neural systems activated in response to predators and partial predator stimuli. *Handbook of Behavioral Neuroscience*, 17, 125–140. [https://doi.org/10.1016/S1569-7339\(07\)00008-2](https://doi.org/10.1016/S1569-7339(07)00008-2)
- Canteras, N. S., & Blanchard, D. C. (2008). Chapter 3.3 A behavioral and neural systems comparison of unconditioned and conditioned defensive behavior. *Handbook of Behavioral Neuroscience*, 17, 141–153. [https://doi.org/10.1016/S1569-7339\(07\)00009-4](https://doi.org/10.1016/S1569-7339(07)00009-4)
- Canteras, N. S., & Goto, M. (1999). Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. *Neuroreport*, 10(2), 413–418. <https://doi.org/10.1097/00001756-199902050-00037>
- Canteras, N. S., Simerly, R. B., & Swanson, L. W. (1995). Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *The Journal of comparative neurology*, 360(2), 213–245. <https://doi.org/10.1002/cne.903600203>
- Capitani, C., Bertelli, I., Varuzza, P., Scandura, M., & Apollonio, M. (2004). A comparative analysis of wolf (*Canis lupus*) diet in three different Italian ecosystems. *Mammalian Biology*, 69(1), 1–10. <https://doi.org/10.1078/1616-5047-112>

- Carobrez, A. P., Teixeira, K. V., & Graeff, F. G. (2001). Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 25(7-8), 697–709. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(01\)00059-8](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(01)00059-8)
- Carr, W. J., Loeb, L. S., & Dissinger, M. L. (1965). Responses of rats to sex odors. *Journal of comparative and physiological psychology*, 59, 370–377. <https://doi.org/10.1037/h0022036>
- Carrive, P., Leung, P., Harris, J., & Paxinos, G. (1997). Conditioned fear to context is associated with increased Fos expression in the caudal ventrolateral region of the midbrain periaqueductal gray. *Neuroscience*, 78(1), 165–177. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)83047-3](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(97)83047-3)
- Chamero, P., Leinders-Zufall, T., & Zufall, F. (2012). From genes to social communication: molecular sensing by the vomeronasal organ. *Trends in neurosciences*, 35(10), 597–606. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.04.011>
- Chamero, P., Marton, T. F., Logan, D. W., Flanagan, K., Cruz, J. R., Saghatelian, A., Cravatt, B. F., & Stowers, L. (2007). Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. *Nature*, 450(7171), 899–902. <https://doi.org/10.1038/nature05997>
- Chen, P., & Hong, W. (2018). Neural Circuit Mechanisms of Social Behavior. *Neuron*, 98(1), 16–30. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.02.026>
- Chen, W. R., Xiong, W., & Shepherd, G. M. (2000). Analysis of relations between NMDA receptors and GABA release at

olfactory bulb reciprocal synapses. *Neuron*, 25(3), 625–633. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)81065-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)81065-x)

Chen, W. R., Shen, G. Y., Shepherd, G. M., Hines, M. L., & Midtgaard, J. (2002). Multiple modes of action potential initiation and propagation in mitral cell primary dendrite. *Journal of neurophysiology*, 88(5), 2755–2764. <https://doi.org/10.1152/jn.00057.2002>

Cherry, J. A., & Baum, M. J. (2020). Sex differences in main olfactory system pathways involved in psychosexual function. *Genes, brain, and behavior*, 19(2), e12618. <https://doi.org/10.1111/gbb.12618>

Cheetham, S. A., Thom, M. D., Jury, F., Ollier, W. E., Beynon, R. J., & Hurst, J. L. (2007). The genetic basis of individual-recognition signals in the mouse. *Current biology : CB*, 17(20), 1771–1777. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.10.007>

Chen, P., & Hong, W. (2018). Neural Circuit Mechanisms of Social Behavior. *Neuron*, 98(1), 16–30. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.02.026>

Choi, G. B., Dong, H. W., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Swanson, L. W. & Anderson, D. J. (2005). Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. *Neuron*, 46 (4), 647–660. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.011>

Christensen, T. A., Mustaparta, H., & Hilderbrand, J. G. (1989). Discrimination of sex pheromone blends in the olfactory system of the moth. *Chemical Senses*, 14(3), 463–477. <https://doi.org/10.1093/CHEMSE/14.3.463>

Parte IV: Discusión General

Chu, X., & Ågmo, A. (2014). Sociosexual behaviours in cycling, intact female rats (*Rattus norvegicus*) housed in a seminatural environment. *Behaviour*, *151*, 1143–1184. <https://doi.org/10.1163/1568539X-00003177>

Chu, X., & Ågmo, A. (2015a). Sociosexual behaviors during the transition from non-receptivity to receptivity in rats housed in a seminatural environment. *Behavioural Processes*, *113*, 24–34. <https://doi.org/10.1016/J.BEPROC.2015.01.001>

Chu, X., & Ågmo, A. (2015b). Sociosexual behaviors of male rats (*Rattus norvegicus*) in a seminatural environment. *Journal of Comparative Psychology*, *129*(2), 132–144. <https://doi.org/10.1037/a0038722>

Chu, X., & Ågmo, A. (2016). Studies of Sociosexual Interactions in Rats in an Externally Valid Procedure: Are They Relevant for Understanding Human Sexual Behavior? *International Journal of Psychological Research*, *9*(2), 76–95. <https://doi.org/10.21500/20112084.2339>

Clutton-Brock, T. (2021). Social evolution in mammals. *Science*, *373*(6561). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABC9699>

Cohen, S. (2021). Psychosocial Vulnerabilities to Upper Respiratory Infectious Illness: Implications for Susceptibility to Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Perspectives on Psychological Science*, *16*(1), 161–174. <https://doi.org/10.1177/1745691620942516>

Compas, B. E., Connor-Smith, J., & Jaser, S. S. (2004). Temperament, stress reactivity, and coping: implications for depression in childhood and adolescence. *Journal of clinical child and adolescent psychology: the official journal*

for the Society of Clinical Child and Adolescent Psychology, American Psychological Association, Division 53, 33(1), 21–31.
https://doi.org/10.1207/S15374424JCCP3301_3

Coureaud, G., Moncomble, A. S., Montigny, D., Dewas, M., Perrier, G., & Schaal, B. (2006). A pheromone that rapidly promotes learning in the newborn. *Current biology: CB*, 16(19), 1956–1961.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.08.030>

Curtis, V., de Barra, M., & Aunger, R. (2011). Disgust as an adaptive system for disease avoidance behaviour. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1568), 1320.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0002>

Dabrowski, A. J., Van der Brempt, X., Soler, M., Seguret, N., Lucciani, P., Charpin, D., & Vervloet, D. (1990). Cat skin as an important source of Fel d I allergen. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 86(4 Pt 1), 462–465.
[https://doi.org/10.1016/s0091-6749\(05\)80200-3](https://doi.org/10.1016/s0091-6749(05)80200-3)

Dahlborn, K., Bugnon, P., Nevalainen, T., Raspa, M., Verboost, P., & Spangenberg, E. (2013). Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on animal identification. *Laboratory animals*, 47(1), 2–11.
<https://doi.org/10.1177/002367712473290>

Dahlgren, C., Gabl, M., Holdfeldt, A., Winther, M., & Forsman, H. (2016). Basic characteristics of the neutrophil receptors that recognize formylated peptides, a danger-associated molecular pattern generated by bacteria and

mitochondria. *Biochemical pharmacology*, 114, 22–39.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.04.014>

Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., & Kelley, K. W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature reviews. Neuroscience*, 9(1), 46–56.
<https://doi.org/10.1038/nrn2297>

Darwin. (1967). *La expresión de las emociones en el hombre y en los animales / Charles Darwin*. Sociedad de Ediciones Mundiales.

Darwin, C. (2020). El origen de las especies mediante selección natural (A. de Zulueta, Trans.). Publicado de forma independiente por Miguel G. Macho. (Obra original publicada en 1859)

Davies, J. (2013). *Cracked : why psychiatry is doing more harm than good*. Icon Books.

Dayan P. (2012). Twenty-five lessons from computational neuromodulation. *Neuron*, 76(1), 240–256.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.027>

De Dreu, C. K., & Kret, M. E. (2016). Oxytocin Conditions Intergroup Relations Through Upregulated In-Group Empathy, Cooperation, Conformity, and Defense. *Biological psychiatry*, 79(3), 165–173.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.03.020>

Demir, E., Li, K., Bobrowski-Khoury, N., Sanders, J. I., Beynon, R. J., Hurst, J. L., Kepecs, A., & Axel, R. (2020). The pheromone darcin drives a circuit for innate and reinforced

behaviours. *Nature*, 578(7793), 137–141.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-1967-8>

De Oca, B. M., DeCola, J. P., Maren, S., & Fanselow, M. S. (1998). Distinct regions of the periaqueductal gray are involved in the acquisition and expression of defensive responses. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(9), 3426–3432.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-09-03426.1998>

De Oca, B. M., & Fanselow, M. S. (2004). Amygdala and periaqueductal gray lesions only partially attenuate unconditional defensive responses in rats exposed to a cat. *Integrative physiological and behavioral science : the official journal of the Pavlovian Society*, 39(4), 318–333.
<https://doi.org/10.1007/BF02734170>

Dell'Omo, G., Fiore, M., & Alleva, E. (1994). Strain differences in mouse response to odours of predators. *Behavioural processes*, 32(2), 105–115. [https://doi.org/10.1016/0376-6357\(94\)90069-8](https://doi.org/10.1016/0376-6357(94)90069-8)

Demir, E., Li, K., Bobrowski-Khoury, N., Sanders, J. I., Beynon, R. J., Hurst, J. L., Kepecs, A., & Axel, R. (2020). The pheromone darcin drives a circuit for innate and reinforced behaviours. *Nature*, 578(7793), 137–141.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-1967-8>

Denenberg, V. H., Paschke, R. E., & Zarrow, M. X. (1968). Killing of mice by rats prevented by early interaction between the two species. *Psychonomic Science*, 11(1), 39-39.

Dey, S., Chamero, P., Pru, J. K., Chien, M. S., Ibarra-Soria, X., Spencer, K. R., ... & Stowers, L. (2015). Cyclic regulation

of sensory perception by a female hormone alters behavior. *Cell*, 161(6), 1334-1344.

Díaz-Ruiz, F., Delibes-Mateos, M., García-Moreno, J. L., María López-Martín, J., Ferreira, C., & Ferreras, P. (2013). Biogeographical patterns in the diet of an opportunistic predator: The red fox *Vulpes vulpes* in the Iberian Peninsula. *Mammal Review*, 43(1), 59–70. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2907.2011.00206.X>

Dicke, M., & Sabelis, M. W. (1988). Infochemical terminology: Based on cost-benefit analysis rather than origin of infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? *Source: Functional Ecology*, 2(2), 131–139. <http://doi.org/10.2307/2389687>

Dielenberg, R. A., Hunt, G. E., & 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), 1085–1097. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00150-6](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00150-6)

Dielenberg, R. A., & McGregor, I. S. (1999). Habituation of the hiding response to cat odor in rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of comparative psychology (Washington, D.C. : 1983)*, 113(4), 376–387. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.113.4.376>

Dielenberg, R. A., & McGregor, I. S. (2001). Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 25(7-8), 597–609. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(01\)00044-6](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(01)00044-6)

Dietl, G., & Kelley, P. (2002). The Fossil Record of Predator-Prey Arms Races: Coevolution and Escalation Hypotheses. *The*

Paleontological Society Papers, 8, 353-374.
doi:10.1017/S1089332600001157

Dietschi, Q., Assens, A., Challet, L., Carleton, A., & Rodriguez, I. (2013). Convergence of FPR-rs3-expressing neurons in the mouse accessory olfactory bulb. *Molecular and cellular neurosciences*, 56, 140–147.
<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2013.04.008>

Dietschi, Q., Tuberosa, J., Rösingh, L., Loichot, G., Ruedi, M., Carleton, A., & Rodriguez, I. (2017). Evolution of immune chemoreceptors into sensors of the outside world. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(28), 7397–7402.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1704009114>

Drickamer, L. C. (1989). Odor preferences of wild stock female house mice (*Mus domesticus*) tested at three ages using urine and other cues from conspecific males and females. *Journal of Chemical Ecology*, 15 (7), 1971–1987.

Dolensek, N., Gehrlach, D. A., Klein, A. S., & Gogolla, N. (2020). Facial expressions of emotion states and their neuronal correlates in mice. *Science*, 368(6486).
https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAZ9468/SUPPL_FILE/AAZ9468S3.MP4

Dominic C. J. (1966). Observations on the reproductive pheromones of mice. I. Source. *Journal of reproduction and fertility*, 11(3), 407–414.
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0110407>

Doty, R. L., & Kamath, V. (2014). The influences of age on olfaction: a review. *Frontiers in psychology*, 5, 20.
<https://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.00020>

- Doty, R. L., & Dunbar, I. (1974). Attraction of beagles to conspecific urine, vaginal and anal sac secretion odors. *Physiology & behavior*, 12(5), 825–833. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(74\)90020-1](https://doi.org/10.1016/0031-9384(74)90020-1)
- Døving, K. & Trotier, D. (1998). Structure and Function of the Vomeronasal Organ. *The Journal of Experimental Biology*, 201, 2913–2925.
- Drea, C. M., Vignieri, S. N., Kim, H. S., Weldele, M. L., & Glickman, S. E. (2002). Responses to olfactory stimuli in spotted hyenas (*Crocuta crocuta*): II. Discrimination of conspecific scent. *Journal of comparative psychology (Washington, D.C. : 1983)*, 116(4), 342–349. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.116.4.342>
- Dulac, C., & Axel, R. (1995). A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell*, 83(2), 195–206. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90161-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90161-2)
- Ehman, K. D., & Scott, M. E. (2001). Urinary odour preferences of MHC congenic female mice, *Mus domesticus*: implications for kin recognition and detection of parasitized males. *Animal Behaviour*, 62 (4), 781–789. <https://doi.org/10.1006/anbe.2001.1805>
- Ehman, K. D., & Scott, M. E. (2002) Female mice mate preferentially with non-parasitized males. *Parasitology*, 125, 461–466.
- Eilam D. (2005). Die hard: a blend of freezing and fleeing as a dynamic defense--implications for the control of defensive behavior. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 29(8), 1181–1191. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.03.027>

- Eisenberger, N. I., Inagaki, T. K., Mashal, N. M., & Irwin, M. R. (2010). Inflammation and social experience: an inflammatory challenge induces feelings of social disconnection in addition to depressed mood. *Brain, behavior, and immunity*, *24*(4), 558–563. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.12.009>
- Eisenberger, N. I., Inagaki, T. K., Rameson, L. T., Mashal, N. M., & Irwin, M. R. (2009). An fMRI study of cytokine-induced depressed mood and social pain: the role of sex differences. *NeuroImage*, *47*(3), 881–890. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.04.040>
- Eisthen H. L. (1997). Evolution of vertebrate olfactory systems. *Brain, behavior and evolution*, *50*(4), 222–233. <https://doi.org/10.1159/000113336>
- Emsley, J. (2001). *Nature's building blocks: an A-Z guide to the elements*. Oxford University Press.
- Ervin, K. S., Lymer, J. M., Matta, R., Clipperton-Allen, A. E., Kavaliers, M., & Choleris, E. (2015). Estrogen involvement in social behavior in rodents: Rapid and long-term actions. *Hormones and behavior*, *74*, 53–76. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.05.023>
- Feldman, H. N. (2011). Methods of scent marking in the domestic cat. <https://doi.org/10.1139/Z94-147>, *72*(6), 1093–1099. <https://doi.org/10.1139/Z94-147>
- Fendt M. (2006). Exposure to urine of canids and felids, but not of herbivores, induces defensive behavior in laboratory rats. *Journal of chemical ecology*, *32*(12), 2617–2627. <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9186-9>

- Fendt, M., Brosch, M., Wernecke, K., Willadsen, M., & Wöhr, M. (2018). Predator odour but not TMT induces 22-kHz ultrasonic vocalizations in rats that lead to defensive behaviours in conspecifics upon replay. *Scientific reports*, 8(1), 11041. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28927-4>
- Ferrero, D. M., Lemon, J. K., Fluegge, D., Pashkovski, S. L., Korzan, W. J., Datta, S. R., Spehr, M., Fendt, M., & Liberles, S. D. (2011). Detection and avoidance of a carnivore odor by prey. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(27), 11235–11240. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103317108>
- Feser, E. (2019). *Aristotle's revenge: the metaphysical foundations of physical and biological science*. Editiones scholasticae.
- Fessler, D. M. T., Eng, S. J., & Navarrete, C. D. (2005). Elevated disgust sensitivity in the first trimester of pregnancy. *Evolution and Human Behavior*, 26(4), 344–351. <https://doi.org/10.1016/J.EVOLHUMBEHAV.2004.12.001>
- Finlayson, J. S., Asofsky, R., Potter, M., & Runner, C. C. (1965). Major urinary protein complex of normal mice: origin. *Science (New York, N.Y.)*, 149(3687), 981–982. <https://doi.org/10.1126/science.149.3687.981>
- Fishkin, R. J., & Winslow, J. T. (1997). Endotoxin-induced reduction of social investigation by mice: interaction with amphetamine and anti-inflammatory drugs. *Psychopharmacology*, 132(4), 335–341. <https://doi.org/10.1007/s002130050353>

- Fitzgerald, B. J., Richardson, K., & Wesson, D. W. (2014). Olfactory tubercle stimulation alters odor preference behavior and recruits forebrain reward and motivational centers. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 8, 81. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00081>
- Flanagan-Cato, L. M. (2011). Sex differences in the neural circuit that mediates female sexual receptivity. *Frontiers in neuroendocrinology*, 32(2), 124–136. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2011.02.008>
- Fleischer J. (2021). The Grueneberg ganglion: signal transduction and coding in an olfactory and thermosensory organ involved in the detection of alarm pheromones and predator-secreted kairomones. *Cell and tissue research*, 383(1), 535–548. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03380-w>
- Fleischer, J., Breer, H., & Strotmann, J. (2009). Mammalian olfactory receptors. *Frontiers in cellular neuroscience*, 3, 9. <https://doi.org/10.3389/neuro.03.009.2009>
- Fleischman, D. S., & Fessler, D. M. T. (2011). Progesterone's effects on the psychology of disease avoidance: Support for the compensatory behavioral prophylaxis hypothesis. *Hormones and Behavior*, 59(2), 271–275. <https://doi.org/10.1016/J.YHBEH.2010.11.014>
- Forte L. R., Jr (2004). Uroguanylin and guanylin peptides: pharmacology and experimental therapeutics. *Pharmacology & therapeutics*, 104(2), 137–162. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.08.007>
- Fujiwara, M., Nitta, A. & Chiba, A. (2016). Regulation of sexual odor preference by sex steroids in the posterodorsal medial

amygdala in female rats. *Hormones and Behavior*, 82, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.05.007>

Gale, G. D., Anagnostaras, S. G., Godsil, B. P., Mitchell, S., Nozawa, T., Sage, J. R., Wiltgen, B., & Fanselow, M. S. (2004). Role of the basolateral amygdala in the storage of fear memories across the adult lifetime of rats. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(15), 3810–3815. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4100-03.2004>

Garbanati, J. A., Sherman, G. F., Rosen, G. D., Hofmann, M., Yutzey, D. A., & Denenberg, V. H. (1983). Handling in infancy, brain laterality and muricide in rats. *Behavioural brain research*, 7(3), 351–359. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(83\)90025-6](https://doi.org/10.1016/0166-4328(83)90025-6)

Garratt, M., Stockley, P., Armstrong, S. D., Beynon, R. J., & Hurst, J. L. (2011). The scent of senescence: Sexual signalling and female preference in house mice. *Journal of Evolutionary Biology*, 24(11), 2398–2409. <http://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02367.x>

Gese, E. M., & Ruff, R. L. (1997). Scent-marking by coyotes, *Canis latrans*: the influence of social and ecological factors. *Animal behaviour*, 54(5), 1155–1166. <https://doi.org/10.1006/anbe.1997.0561>

Ghosh, S., Larson, S. D., Hefzi, H., Marnoy, Z., Cutforth, T., Dokka, K., & Baldwin, K. K. (2011). Sensory maps in the olfactory cortex defined by long-range viral tracing of single neurons. *Nature*, 472(7342), 217–220. <https://doi.org/10.1038/nature09945>

- Goodall, J. (1986). Social rejection, exclusion, and shunning among the Gombe chimpanzees. *Ethology & Sociobiology*, 7(3-4), 227–236. [https://doi.org/10.1016/0162-3095\(86\)90050-6](https://doi.org/10.1016/0162-3095(86)90050-6)
- Godfrey, P. A., Malnic, B., & Buck, L. B. (2004). The mouse olfactory receptor gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), 2156–2161. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308051100>
- Gomez, D. M., & Newman, S. W. (1992). Differential projections of the anterior and posterior regions of the medial amygdaloid nucleus in the Syrian hamster. *The Journal of comparative neurology*, 317(2), 195–218. <https://doi.org/10.1002/cne.903170208>
- Gorman, M. L., & Trowbridge, B. J. (2019). The Role of Odor in the Social Lives of Carnivores. In *Carnivore Behavior, Ecology, and Evolution*. <https://doi.org/10.7591/9781501745812-007>
- Goodson J. L. (2005). The vertebrate social behavior network: evolutionary themes and variations. *Hormones and behavior*, 48(1), 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.02.003>
- Goosens, K. A., & Maren, S. (2001). Contextual and auditory fear conditioning are mediated by the lateral, basal, and central amygdaloid nuclei in rats. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 8(3), 148–155. <https://doi.org/10.1101/lm.37601>
- Gouveia, K., & Hurst, J. L. (2013). Reducing mouse anxiety during handling: effect of experience with handling

tunnels. *PLoS one*, 8(6), e66401.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066401>

Great Britain. Home Office. (2016). *Annual statistics of scientific procedures on living animals Great Britain 2015*. 61.

Greene, T. M., Redding, C. L., & Birkett, M. A. (2014). Effects of rat visual, olfactory, or combined stimuli during cohousing on stress-related physiology and behavior in C57BL/6NCrl mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 53(6), 647–652.

Grosmaître, X., Santarelli, L. C., Tan, J., Luo, M., & Ma, M. (2007). Dual functions of mammalian olfactory sensory neurons as odor detectors and mechanical sensors. *Nature neuroscience*, 10(3), 348–354.
<https://doi.org/10.1038/nn1856>

Gross, C. T., & Canteras, N. S. (2012). The many paths to fear. *Nature reviews. Neuroscience*, 13(9), 651–658.
<https://doi.org/10.1038/nrn3301>

Grüneberg H. (1973). A ganglion probably belonging to the N. terminalis system in the nasal mucosa of the mouse. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*, 140(1), 39–52.

Grönlund, H., Saarne, T., Gafvelin, G., & van Hage, M. (2010). The major cat allergen, Fel d 1, in diagnosis and therapy. *International archives of allergy and immunology*, 151(4), 265–274.
<https://doi.org/10.1159/000250435>

- Guénet, J. L., Benavides, F., Panthier, J. J., & Montagutelli, X. (2015). *Genetics of the mouse* (Vol. 34). Springer. <http://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a105276>
- Gutiérrez-Castellanos, N., Martínez-Marcos, A., Martínez-García, F., & Lanuza, E. (2010). Chemosensory function of the amygdala. *Vitamins and hormones*, 83, 165–196. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(10\)83007-9](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(10)83007-9)
- Hacking. (1996). *Representar e intervenir; [traducción, Sergio Martínez]* (1a ed.). Paidós
- Hacquemand, R., Jacquot, L., & Brand, G. (2010). Comparative Fear-Related Behaviors to Predator Odors (TMT and Natural Fox Feces) before and after Intranasal ZnSO₄ Treatment in Mice. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 4, 188. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00188>
- Haga, S., Hattori, T., Sato, T., Sato, K., Matsuda, S., Kobayakawa, R., ... Touhara, K. (2010). The male mouse pheromone ESP1 enhances female sexual receptive behaviour through a specific vomeronasal receptor. *Nature*, 466(7302), 118–22. <http://doi.org/10.1038/nature09142>
- Halpern, M., & Martínez-Marcos, A. (2003). Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Progress in neurobiology*, 70(3), 245–318. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(03\)00103-5](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(03)00103-5)
- Hanski, I., Hansson, L., & Henttonen, H. (1991). Specialist Predators, Generalist Predators, and the Microtine Rodent Cycle. *Journal of Animal Ecology*, 60(1), 353–367. <https://doi.org/10.2307/5465>

- Harvey, S., Jemiolo, B., & Novotny, M. (1989). Pattern of volatile compounds in dominant and subordinate male mouse urine. *Journal of chemical ecology*, 15(7), 2061–2072. <https://doi.org/10.1007/BF01207438>
- Hashikawa, K., Hashikawa, Y., Tremblay, R., Zhang, J., Feng, J. E., Sabol, A., Piper, W. T., Lee, H., Rudy, B., & Lin, D. (2017a). *Esr1*⁺ cells in the ventromedial hypothalamus control female aggression. *Nature neuroscience*, 20(11), 1580–1590. <https://doi.org/10.1038/nn.4644>
- Hashikawa, Y., Hashikawa, K., Falkner, A. L., & Lin, D. (2017b). Ventromedial Hypothalamus and the Generation of Aggression. *Frontiers in systems neuroscience*, 11, 94. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00094>
- Hecker, E., & Butenandt, A. (1984). *Bombykol Revisited—Reflections on a Pioneering Period and on Some of Its Consequences* In Techniques in Pheromones Research (eds. Hummer H.EMillar T.A). 1–44. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-5220-7_1
- Heinze, J., & Walter, B. (2010). Moribund ants leave their nests to die in social isolation. *Current biology: CB*, 20(3), 249–252. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.12.031>
- Van Hemel P. E. (1975). Rats and mice together: the aggressive nature of mouse killing by rats. *Psychological bulletin*, 82(3), 456–462.
- Herdegen, T., & Leah, J. D. (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain research. Brain research*

reviews, 28(3), 370–490. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(98\)00018-6](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(98)00018-6)

Hess, W. R., & Brügger, M. (1943). Das subkortikale Zentrum der affektiven Abwehrreaktion [The subcortical center for affective defense reactions]. *Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta*, 1, 1, 33–52.

Hirata, T., Shioi, G., Abe, T., Kiyonari, H., Kato, S., Kobayashi, K., Mori, K., & Kawasaki, T. (2019). A Novel Birthdate-Labeling Method Reveals Segregated Parallel Projections of Mitral and External Tufted Cells in the Main Olfactory System. *eNeuro*, 6(6), ENEURO.0234-19.2019. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0234-19.2019>

Holmes, M. M., & Galea, L. A. (2002). Defensive behavior and hippocampal cell proliferation: differential modulation by naltrexone during stress. *Behavioral neuroscience*, 116(1), 160–168.

Holy, T. E. (2018). The Accessory Olfactory System: Innately Specialized or Microcosm of Mammalian Circuitry?. *Annual review of neuroscience*, 41, 501–525. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-080317-061916>

Homiack, D., O’Cinneide, E., Hajmurad, S., Barrileaux, B., Stanley, M., Kreutz, M. R., & Schrader, L. A. (2017). Predator odor evokes sex-independent stress responses in male and female Wistar rats and reduces phosphorylation of cyclic-adenosine monophosphate response element binding protein in the male, but not the female hippocampus. *Hippocampus*, 27(9), 1016–1029. <https://doi.org/10.1002/HIPO.22749>

- Hong, W., Kim, D. W., & Anderson, D. J. (2014). Antagonistic control of social versus repetitive self-grooming behaviors by separable amygdala neuronal subsets. *Cell*, 158(6), 1348–1361. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.049>
- Hosokawa, N. & Chiba, A. (2010). Androgen receptor blockade in the posterodorsal medial amygdala impairs sexual odor preference in male rats. *Hormones and Behavior*, 58 (3), 493–500. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.04.010>
- Hoyt, R. E., Hawkins, J. V., St Clair, M. B., & Kennett, M. J. (2007). Mouse Physiology. *The Mouse in Biomedical Research*, 3, 23–90. <http://doi.org/10.1016/B978-012369454-6/50056-X>
- Hull, E. M., Meisel, R. L. & Sachs, B. D. (2002) Male sexual behavior. In Pfaff, D. W., Arnold, A. P., Etgen, A. M., Fahrbach, S. E. & Rubin, R. T. (eds), *Brain Hormones and Behavior*. Academic Press, San Diego, pp. 1-138.
- Hurst, J. L. (1990a). Urine marking in populations of wild house mice *Mus domesticus* Ruttly: I. Communication between males. *Animal Behaviour*, 40(2), 209–222. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(05\)80916-9](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(05)80916-9)
- Hurst, J. L. (1990b). Urine marking in populations of wild house mice *Mus domesticus* Ruttly: II. Communication between females. *Animal Behaviour*, 40(2), 223–232. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(05\)80917-0](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(05)80917-0)
- Hurst, J. L. (1990c). Urine marking in populations of wild house mice *Mus domesticus* Ruttly: III. Communication between the sexes. *Animal Behaviour*, 40(2), 233–243. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(05\)80918-2](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(05)80918-2)

- Hurst, J. L. & Beynon, R. J. (2004). Scent wars: the chemobiology of competitive signalling in mice. *BioEssays*, 26 (12), 1288–1298. <https://doi.org/10.1002/bies.20147>
- Hurst, J. L., & Beynon, R. J. (2013). Rodent Urinary Proteins: Genetic Identity Signals and Pheromones. *Chemical Signals in Vertebrates* 12, 117–133. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5927-9_9
- Hurst, J. L., & West, R. S. (2010). Taming anxiety in laboratory mice. *Nature methods*, 7(10), 825–826. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1500>
- Hussain, A., Saraiva, L. R., Ferrero, D. M., Ahuja, G., Krishna, V. S., Liberles, S. D., & Korsching, S. I. (2013). High-affinity olfactory receptor for the death-associated odor cadaverine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(48), 19579–19584. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318596110>
- Igarashi, K. M., Ieki, N., An, M., Yamaguchi, Y., Nagayama, S., Kobayakawa, K., Kobayakawa, R., Tanifuji, M., Sakano, H., Chen, W. R., & Mori, K. (2012). Parallel mitral and tufted cell pathways route distinct odor information to different targets in the olfactory cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(23), 7970–7985. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0154-12.2012>
- Ihara, S., Yoshikawa, K., & Touhara, K. (2013). Chemosensory signals and their receptors in the olfactory neural system. *Neuroscience*, 254, 45–60. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.08.063>

- Imamura, F., Ito, A., & LaFever, B. J. (2020). Subpopulations of Projection Neurons in the Olfactory Bulb. *Frontiers in neural circuits*, *14*, 561822. <https://doi.org/10.3389/fncir.2020.561822>
- Inagaki, T. K., Muscatell, K. A., Irwin, M. R., Moieni, M., Dutcher, J. M., Jevtic, I., Breen, E. C., & Eisenberger, N. I. (2015). The role of the ventral striatum in inflammatory-induced approach toward support figures. *Brain, behavior, and immunity*, *44*, 247–252. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.10.006>
- Ishii, K. K., Osakada, T., Mori, H., Miyasaka, N., Yoshihara, Y., Miyamichi, K., & Touhara, K. (2017). A Labeled-Line Neural Circuit for Pheromone-Mediated Sexual Behaviors in Mice. *Neuron*, *95*(1), 123–137.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.05.038>
- Isogai, Y., Si, S., Pont-Lezica, L., Tan, T., Kapoor, V., Murthy, V. N., & Dulac, C. (2011). Molecular organization of vomeronasal chemoreception. *Nature*, *478*(7368), 241–245. <https://doi.org/10.1038/nature10437>
- Jacobson, L., Trotier, D., & Døving, K. B. (1998). Anatomical description of a new organ in the nose of domesticated animals by Ludvig Jacobson (1813). *Chemical senses*, *23*(6), 743–754. <https://doi.org/10.1093/chemse/23.6.743>
- Jacquot, L., Pourie, G., Buron, G., Monnin, J., & Brand, G. (2006). Effects of toluene inhalation exposure on olfactory functioning: behavioral and histological assessment. *Toxicology letters*, *165*(1), 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.01.018>

- Jemiolo, B., Xie, T. M., & Novotny, M. (1991). Socio-sexual olfactory preference in female mice: attractiveness of synthetic chemosignals. *Physiology & behavior*, *50*(6), 1119–1122. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(91\)90570-e](https://doi.org/10.1016/0031-9384(91)90570-e)
- Jennings, H. S. (1906). *Behavior of the lower organisms* (No. 10). Columbia University Press.
- Jones, B. C., Hahn, A. C., Fisher, C. I., Wang, H., Kandrik, M., Lee, A. J., Tybur, J. M., & DeBruine, L. M. (n.d.). *Hormonal correlates of pathogen disgust: Testing the Compensatory Prophylaxis Hypothesis*. <https://doi.org/10.1101/156430>
- Karlson, P., & Luscher, M. (1959). “Pheromones”: a new term for a class of biologically active substances. *Nature*, *183*(4653), 55–56. <http://doi.org/10.1038/183055a0>
- Kaur, A. W., Ackels, T., Kuo, T. H., Cichy, A., Dey, S., Hays, C., ... Stowers, L. (2014). Murine pheromone proteins constitute a context-dependent combinatorial code governing multiple social behaviors. *Cell*, *157*(3), 676–688. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.025>
- Kavaliers, M., & Choleris, E. (2018). The role of social cognition in parasite and pathogen avoidance. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, *373*(1751), 20170206. <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0206>
- Kavaliers, M., Choleris, E., & Pfaff, D. W. (2005). Recognition and avoidance of the odors of parasitized conspecifics and predators: differential genomic correlates. *Neuroscience*

and *biobehavioral reviews*, 29(8), 1347–1359.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.011>

Kavaliers, M. & Colwell, D. D. (1995a). Discrimination by female mice between the odours of parasitized and nonparasitized males. *Proceedings Biological Sciences/The Royal Society*, 261 (1360), 31–35.
<https://doi.org/10.1098/rspb.1995.0113>

Kavaliers, M. & Colwell, D. D. (1995b) Odours of parasitized males induce aversive responses in female mice. *Animal Behaviour*, 50 (5), 1161–1169.

Kavaliers, M., Colwell, D. D., Braun, W. J. & Choleris, E. (2003). Brief exposure to the odour of a parasitized male alters the subsequent mate odour responses of female mice. *Animal Behaviour*, 65 (1), 59–68.
<https://doi.org/10.1006/anbe.2002.2043>

Kavaliers, M., Colwell, D. D. & Choleris, E. (1998). Parasitized female mice display reduced aversive responses to the odours of infected males. *Proceedings. Biological Sciences*, 265 (1401), 1111-1118.

Kavaliers, M., Ossenkopp, K. P., & Choleris, E. (2019). Social neuroscience of disgust. *Genes, brain, and behavior*, 18(1), e12508.
<https://doi.org/10.1111/gbb.12508>

Kavaliers, M., Ossenkopp, K. P., & Choleris, E. (2020). Pathogens, odors, and disgust in rodents. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 119, 281–293.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.09.037>

- Kavaliers, M., Bishnoi, I. R., Ossenkopp, K. P., & Choleris, E. (2021). Differential effects of progesterone on social recognition and the avoidance of pathogen threat by female mice. *Hormones and behavior*, *127*, 104873. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104873>
- Kavaliers, M., Ossenkopp, K. P., Tyson, C. D., Bishnoi, I. R., & Choleris, E. (2022). Social factors and the neurobiology of pathogen avoidance. *Biology letters*, *18*(2), 20210371. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2021.0371>
- Kayyal, H., Yiannakas, A., Chandran, S. K., Khamaisy, M., Sharma, V., & Rosenblum, K. (2019). Activity of Insula to Basolateral Amygdala Projecting Neurons is Necessary and Sufficient for Taste Valence Representation. *Journal of Neuroscience*, *39*(47), 9369–9382. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0752-19.2019>
- Keiser, C. N., Rudolf, V. H. W., Luksik, M. C., & Saltz, J. B. (2020). Sex differences in disease avoidance behavior vary across modes of pathogen exposure. *Ethology*, *126*(3), 304–312. <https://doi.org/10.1111/ETH.12969>
- Keller, L. (1993). *Queen number and sociality in insects*. Oxford (UK): Oxford University Press.
- Kelliher, K. R., Spehr, M., Li, X. H., Zufall, F., & Leinders-Zufall, T. (2006). Pheromonal recognition memory induced by TRPC2-independent vomeronasal sensing. *The European journal of neuroscience*, *23*(12), 3385–3390. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04866.x>
- Kelliher K. R. (2007). The combined role of the main olfactory and vomeronasal systems in social communication in

mammals. *Hormones and behavior*, 52(5), 561–570.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.08.012>

Keshavarzi, S., Power, J. M., Albers, E. H., Sullivan, R. K., & Sah, P. (2015). Dendritic Organization of Olfactory Inputs to Medial Amygdala Neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 35(38), 13020–13028. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0627-15.2015>

Khan, A., Bellefontaine, N., & deCatanzaro, D. (2008). Onset of sexual maturation in female mice as measured in behavior and fertility: Interactions of exposure to males, phytoestrogen content of diet, and ano-genital distance. *Physiology & behavior*, 93(3), 588–594.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.10.019>

Kiesecker, J. M., Skelly, D. K., Beard, K. H., & Preisser, E. (1999). Behavioral reduction of infection risk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16), 9165–9168.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.9165>

Kimchi, T., Xu, J. & Dulac, C. (2007). A functional circuit underlying male sexual behaviour in the female mouse brain. *Nature*, 448 (7157), 1009-1014.
<https://doi.org/10.1038/nature06089>

Kimoto, H., Haga, S., Sato, K., & Touhara, K. (2005). Sex-specific peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons. *Nature*, 437(7060), 898–901. <http://doi.org/10.1038/nature04033>

Kimoto, H., Sato, K., Nodari, F., Haga, S., Holy, T. E., & Touhara, K. (2007). Sex and Strain-Specific Expression and

Vomeronal Activity of Mouse ESP Family Peptides.
Current Biology, 17(21), 1879–1884.
<http://doi.org/10.1016/j.cub.2007.09.042>

Kiyokawa, Y., Kodama, Y., Kubota, T., Takeuchi, Y., & Mori, Y. (2013). Alarm pheromone is detected by the vomeronasal organ in male rats. *Chemical Senses*, 38(8), 661–8.
<http://doi.org/10.1093/chemse/bjt030>

Krieger, M. J., & Ross, K. G. (2002). Identification of a major gene regulating complex social behavior. *Science (New York, N. Y.)*, 295(5553), 328–332.
<https://doi.org/10.1126/science.1065247>

Kruk M. R. (2014). Hypothalamic attack: a wonderful artifact or a useful perspective on escalation and pathology in aggression? A viewpoint. *Current topics in behavioral neurosciences*, 17, 143–188.
https://doi.org/10.1007/7854_2014_313

Kryklywy, J. H., Ehlers, M. R., Anderson, A. K., & Todd, R. M. (2020). From Architecture to Evolution: Multisensory Evidence of Decentralized Emotion. *Trends in cognitive sciences*, 24(11), 916–929.
<https://doi.org/10.1016/j.tics.2020.08.002>

Kovács K. J. (2008). Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *Journal of neuroendocrinology*, 20(6), 665–672.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01734.x>

Kunkhyen, T., Perez, E., Bass, M., Coyne, A., Baum, M. J., & Cherry, J. A. (2018). Gonadal hormones, but not sex, affect the acquisition and maintenance of a Go/No-Go odor

discrimination task in mice. *Hormones and behavior*, 100, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.02.009>

Kwon, J. T., Ryu, C., Lee, H., Sheffield, A., Fan, J., Cho, D. H., Bigler, S., Sullivan, H. A., Choe, H. K., Wickersham, I. R., Heiman, M., & Choi, G. B. (2021). An amygdala circuit that suppresses social engagement. *Nature*, 593(7857), 114–118. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03413-6>

Lanuza, E., Martín-Sánchez, A., Marco-Manclús, P., Cádiz-Moretti, B., Fortes-Marco, L., Hernández-Martínez, A., McLean, L., Beynon, R.J., Hurst, J. L. & Martínez-García, F. (2014). Sex pheromones are not always attractive: Changes induced by learning and illness in mice. *Animal Behaviour*, 97, 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2014.08.011>

Latour, B. & Fernández-Aúz, T. (2001). *La esperanza de Pandora : ensayos sobre la realidad de los estudios de la ciencia / Bruno Latour ; traducción Tomás Fernández Aúz*. Gedisa.

Le Magnen, J. (1951). Etude des phénomènes olfacto-sexuels chez le rat blanc; variations avec leur état sexuel de la réponse des mâles à l'odeur de la femelle et réponse des femelles à l'odeur du mâle. *Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales*, 145(11-12), 857–860.

Le Moëne, O., & Ågmo, A. (2018). Behavioral responses to emotional challenges in female rats living in a seminatural environment: The role of estrogen receptors. *Hormones and behavior*, 106, 162–177. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.10.013>

- Leckie, F. M., Thirgood, S. J., May, R., & Redpath, S. M. (1998). Variation in the Diet of Red Foxes on Scottish Moorland in Relation to Prey Abundance. *Ecography*, 21(6), 599–604. <http://www.jstor.org/stable/3682851>
- LeDoux J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annual review of neuroscience*, 23, 155–184. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.155>
- LeDoux J. E. (2022). As soon as there was life, there was danger: the deep history of survival behaviours and the shallower history of consciousness. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 377(1844), 20210292. <https://doi.org/10.1098/rstb.2021.0292>
- LeDoux, J. E., Iwata, J., Cicchetti, P., & Reis, D. J. (1988). Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 8(7), 2517–2529. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-07-02517.1988>
- Leinders-Zufall, T., Brennan, P., Widmayer, P., S, P. C., Maul-Pavicic, A., Jäger, M., Li, X. H., Breer, H., Zufall, F., & Boehm, T. (2004). MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5698), 1033–1037. <https://doi.org/10.1126/science.1102818>
- Lee, H., Kim, D. W., Remedios, R., Anthony, T. E., Chang, A., Madisen, L., Zeng, H., & Anderson, D. J. (2014). Scalable control of mounting and attack by Esr1+ neurons in the ventromedial hypothalamus. *Nature*, 509(7502), 627–632. <https://doi.org/10.1038/nature13169>

- Le Moëne, O., & Ágmo, A. (2018). Behavioral responses to emotional challenges in female rats living in a seminatural environment: The role of estrogen receptors. *Hormones and behavior*, *106*, 162–177. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.10.013>
- Leschak, C. J., Hornstein, E. A., Byrne Haltom, K. E., Johnson, K. L., Breen, E. C., Irwin, M. R., & Eisenberger, N. I. (2022). Ventromedial prefrontal cortex activity differentiates sick from healthy faces: Associations with inflammatory responses and disease avoidance motivation. *Brain, Behavior, and Immunity*, *100*, 48–54. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2021.11.011>
- Li, C. I., Maglinao, T. L., & Takahashi, L. K. (2004). Medial amygdala modulation of predator odor-induced unconditioned fear in the rat. *Behavioral neuroscience*, *118*(2), 324–332. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.118.2.324>
- Li, C.S., Kaba, H. & Saito, K. (1990). Neural mechanism underlying the action primer pheromones in mice. *Neuroscience*, *36* (3), 773–778. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90019-Z](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90019-Z)
- Li, Q., Korzan, W. J., Ferrero, D. M., Chang, R. B., Roy, D. S., Buchi, M., Lemon, J. K., Kaur, A. W., Stowers, L., Fendt, M., & Liberles, S. D. (2013). Synchronous evolution of an odor biosynthesis pathway and behavioral response. *Current biology*, *23*(1), 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.10.047>
- Li, Q., Tachie-Baffour, Y., Liu, Z., Baldwin, M. W., Kruse, A. C., & Liberles, S. D. (2015). Non-classical amine recognition

evolved in a large clade of olfactory receptors. *eLife*, 4, e10441. <https://doi.org/10.7554/eLife.10441>

Liberles, S. D., & Buck, L. B. (2006). A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. *Nature*, 442(7103), 645–650. <https://doi.org/10.1038/nature05066>

Liberles, S. D., Horowitz, L. F., Kuang, D., Contos, J. J., Wilson, K. L., Siltberg-Liberles, J., Liberles, D. A., & Buck, L. B. (2009). Formyl peptide receptors are candidate chemosensory receptors in the vomeronasal organ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(24), 9842–9847. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904464106>

Lima, S. L. (1998). Stress and Decision Making under the Risk of Predation: Recent Developments from Behavioral, Reproductive, and Ecological Perspectives. *Advances in the Study of Behavior*, 27(C), 215–290. [https://doi.org/10.1016/S0065-3454\(08\)60366-6](https://doi.org/10.1016/S0065-3454(08)60366-6)

Lin, D. Y., Zhang, S. Z., Block, E., & Katz, L. C. (2005). Encoding social signals in the mouse main olfactory bulb. *Nature*, 434(7032), 470–477. <https://doi.org/10.1038/nature03414>

Lin, D., Boyle, M. P., Dollar, P., Lee, H., Lein, E. S., Perona, P., & Anderson, D. J. (2011). Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. *Nature*, 470(7333), 221–226. <https://doi.org/10.1038/nature09736>

Liu, Y. J., Guo, H. F., Zhang, J. X., & Zhang, Y. H. (2017). Quantitative inheritance of volatile pheromones and darcin

and their interaction in olfactory preferences of female mice. *Scientific reports*, 7(1), 2094. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02259-1>

Logan, D. W., Marton, T. F., & Stowers, L. (2008). Species specificity in major urinary proteins by parallel evolution. *PLoS one*, 3(9), e3280. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003280>

Logan, D. W., Brunet, L. J., Webb, W. R., Cutforth, T., Ngai, J., & Stowers, L. (2012). Learned recognition of maternal signature odors mediates the first suckling episode in mice. *Current Biology*, 22(21), 1998–2007. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2012.08.041>

Lonstein, J. S., & Stern, J. M. (1997). Role of the midbrain periaqueductal gray in maternal nurturance and aggression: c-fos and electrolytic lesion studies in lactating rats. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(9), 3364–3378.

Lopes P. C. (2014). When is it socially acceptable to feel sick?. *Proceedings. Biological sciences*, 281(1788), 20140218. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.0218>

Lopes, P. C., Block, P., & König, B. (2016). Infection-induced behavioural changes reduce connectivity and the potential for disease spread in wild mice contact networks. *Scientific reports*, 6, 31790. <https://doi.org/10.1038/srep31790>

Lopes, P. C., & König, B. (2016). Choosing a healthy mate: sexually attractive traits as reliable indicators of current disease status in house mice. *Animal Behaviour*, 111, 119–126. <https://doi.org/10.1016/J.ANBEHAV.2015.10.011>

- Lydell, K., & Doty, R. L. (1972). Male rat of odor preferences for female urine as a function of sexual experience, urine age, and urine source. *Hormones and behavior*, 3(3), 205–212. [https://doi.org/10.1016/0018-506x\(72\)90033-5](https://doi.org/10.1016/0018-506x(72)90033-5)
- Lymer, J. M., Sheppard, P., Kuun, T., Blackman, A., Jani, N., Mahbub, S., & Choleris, E. (2018). Estrogens and their receptors in the medial amygdala rapidly facilitate social recognition in female mice. *Psychoneuroendocrinology*, 89, 30–38.
- Macdonald, D. W. (2006). *The Encyclopedia of Mammals*. Oxford University Press <https://doi.org/10.1093/ACREF/9780199206087.001.0001>
- Madrid, C. M. (2018). *Filosofía de la cosmología: hombres, teoremas y leyes naturales*. Pentalfa Ediciones.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., & Buck, L. B. (1999). Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*, 96(5), 713–723. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80581-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80581-4)
- Mamasuew, K., Breer, H., & Fleischer, J. (2008). Grueneberg ganglion neurons respond to cool ambient temperatures. *The European journal of neuroscience*, 28(9), 1775–1785. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06465.x>
- Mamasuew, K., Hofmann, N., Breer, H., & Fleischer, J. (2011). Grueneberg ganglion neurons are activated by a defined set of odorants. *Chemical senses*, 36(3), 271–282. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjq124>
- Mandairon, N., Poncelet, J., Bensafi, M., & Didier, A. (2009). Humans and mice express similar olfactory

preferences. *PLoS One*, 4(1), e4209.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004209>

Markham, C. M., Blanchard, D. C., Canteras, N. S., Cuyno, C. D., & Blanchard, R. J. (2004). Modulation of predatory odor processing following lesions to the dorsal preammillary nucleus. *Neuroscience Letters*, 372(1-2), 22–26.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.09.006>

Martín-Sánchez, A., McLean, L., Beynon, R. J., Hurst, J. L., Ayala, G., Lanuza, E., & Martínez-García, F. (2015a). From sexual attraction to maternal aggression: when pheromones change their behavioural significance. *Hormones and Behavior*, 68, 65–76.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.08.007>

Martín-Sánchez, A., Valera-Marín, G., Hernández-Martínez, A., Lanuza, E., Martínez-García, F., & Agustín-Pavón, C. (2015b). Wired for motherhood: induction of maternal care but not maternal aggression in virgin female CD1 mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9, 197.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00197>

Martínez-García, F., & Lanuza, E. (2018). Evolution of vertebrate survival circuits. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 24, 113–123.
<https://doi.org/10.1016/J.COBEHA.2018.06.012>

Martínez-Mota, L., Estrada-Camarena, E., López-Rubalcava, C., Contreras, C. M., & Fernández-Guasti, A. (2000). Interaction of desipramine with steroid hormones on experimental anxiety. *Psychoneuroendocrinology*, 25(2), 109–120. [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(99\)00042-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(99)00042-6)

- Martínez-Ricós, J., Agustín-Pavón, C., Lanuza, E., & Martínez-García, F. (2007). Intraspecific communication through chemical signals in female mice: reinforcing properties of involatile male sexual pheromones. *Chemical senses*, *32*(2), 139–148. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjl039>
- Martínez-Ricós, J., Agustín-Pavón, C., Lanuza, E. & Martínez-García, F. (2008). The role of the vomeronasal system in intersexual attraction in female mice. *Neuroscience*, *153*, 383–395. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.02.002>
- Marzillier, S. L., & Davey, G. C. L. (2004). The emotional profiling of disgust-eliciting stimuli: Evidence for primary and complex disgusts. *Cognition and Emotion*, *18*(3), 313–336. <https://doi.org/10.1080/02699930341000130>
- Masters, A., Falcón, D., Johnson, V. E., & Kolodny, R. C. (1995). *La sexualidad humana / William H. Masters, Virginia E. Johnson y Robert C. Kolodny* (13a ed.). Grijalbo.
- McCarthy, E. A., Naik, A. S., Coyne, A. F., Cherry, J. A., & Baum, M. J. (2018). Effect of Ovarian Hormones and Mating Experience on the Preference of Female Mice to Investigate Male Urinary Pheromones. *Chemical senses*, *43*(2), 97–104. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjx073>
- McGregor, I. S., Schrama, L., Ambermoon, P., & Dielenberg, R. A. (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), 1–16. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(01\)00324-2](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(01)00324-2)

- McDonald A. J. (1998). Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Progress in neurobiology*, 55(3), 257–332. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(98\)00003-3](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(98)00003-3)
- McLean, A. C., Valenzuela, N., Fai, S., & Bennett, S. A. (2012). Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (67), e4389. <https://doi.org/10.3791/4389>
- Medina, L., Bupesh, M., & Abellán, A. (2011). Contribution of genoarchitecture to understanding forebrain evolution and development, with particular emphasis on the amygdala. *Brain, behavior and evolution*, 78(3), 216–236. <https://doi.org/10.1159/000330056>
- Meijer, M. K., van Loo, P. L., & Baumans, V. (2009). There's a rat in my room! now what? Mice show no chronic physiological response to the presence of rats. *Journal of applied animal welfare science: JAAWS*, 12(4), 293–305. <https://doi.org/10.1080/10888700902955849>
- Mellen, J. D. (1993). A Comparative Analysis of Scent-Marking, Social and Reproductive Behavior in 20 Species of Small Cats (*Felis*). *Integrative and Comparative Biology*, 33(2), 151–166. <https://doi.org/10.1093/ICB/33.2.151>
- Mengüllüoğlu, D., İlaslan, E., Emir, H., & Berger, A. (2019). Diet and wild ungulate preferences of wolves in northwestern Anatolia during winter. *PeerJ*, 7, e7446. <https://doi.org/10.7717/peerj.7446>
- Meredith, M., Marques, D. M., O'Connell, R. O., & Stern, F. L. (1980). Vomeronasal pump: significance for male hamster

sexual behavior. *Science (New York, N.Y.)*, 207(4436), 1224–1226. <https://doi.org/10.1126/science.7355286>

Michael, R. P., & Keverne, E. B. (1968). Pheromones in the communication of sexual status in primates. *Nature*, 218(5143), 746–749. <https://doi.org/10.1038/218746a0>

Michael, R. P., & Keverne, E. B. (1970). A male sex-attractant pheromone in rhesus monkey vaginal secretions. *The Journal of endocrinology*, 46(2), xx–xxi.

Miyazaki, T., Nishimura, T., Yamashita, T., & Miyazaki, M. (2018). Olfactory discrimination of anal sac secretions in the domestic cat and the chemical profiles of the volatile compounds. *Journal of ethology*, 36(1), 99–105. <https://doi.org/10.1007/s10164-017-0532-x>

Moieni, M., Irwin, M. R., Jevtic, I., Breen, E. C., Cho, H. J., Arevalo, J. M., Ma, J., Cole, S. W., & Eisenberger, N. I. (2015). Trait sensitivity to social disconnection enhances pro-inflammatory responses to a randomized controlled trial of endotoxin. *Psychoneuroendocrinology*, 62, 336–342. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.08.020>

Moieni, M., Muscatell, K. A., Jevtic, I., Breen, E. C., Irwin, M. R., & Eisenberger, N. I. (2019). Sex Differences in the Effect of Inflammation on Subjective Social Status: A Randomized Controlled Trial of Endotoxin in Healthy Young Adults. *Frontiers in psychology*, 10, 2167. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2019.02167>

Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S. K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J., & Axel, R. (1996).

Visualizing an olfactory sensory map. *Cell*, 87(4), 675–686. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81387-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81387-2)

Moncho-Bogani, J., Lanuza, E., Hernández, A., Novejarque, A., & Martínez-García, F. (2002). Attractive properties of sexual pheromones in mice: innate or learned?. *Physiology & behavior*, 77(1), 167–176. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(02\)00842-9](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(02)00842-9)

Moncho-Bogani, J., Lanuza, E., Jose, M. J. & Martinez-Garcia, F. (2004). Attraction to male pheromones and sexual behaviour show different regulatory mechanisms in female mice. *Physiology & Behavior*, 81(3), 427–434. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.01.014>

Moncho-Bogani, J., Martinez-Garcia, F., Novejarque, A., & Lanuza, E. (2005). Attraction to sexual pheromones and associated odorants in female mice involves activation of the reward system and basolateral amygdala. *The European journal of neuroscience*, 21(8), 2186–2198. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04036.x>

Moore, A. J., Brodie, E. D., & Wolf, J. B. (1997). Interacting Phenotypes and the Evolutionary Process: I. Direct and Indirect Genetic Effects of Social Interactions. *Evolution*, 51(5), 1352–1362. <https://doi.org/10.2307/2411187>

Mora, S., Dussaubat, N., & Díaz-Véliz, G. (1996). Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. *Psychoneuroendocrinology*, 21(7), 609–620. [https://doi.org/10.1016/s0306-4530\(96\)00015-7](https://doi.org/10.1016/s0306-4530(96)00015-7)

- Mori, K., Manabe, H., & Narikiyo, K. (2014). Possible functional role of olfactory subsystems in monitoring inhalation and exhalation. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8(September), 107. <http://doi.org/10.3389/fnana.2014.00107>
- Mori, K., Nagao, H. & Yoshihara, Y. (1999). The Olfactory Bulb: Coding and Processing of Odor Molecule Information. *Science*, 286 (5440), 711–715. <https://doi.org/10.1126/science.286.5440.711>
- Mori, K., & Sakano, H. (2011). How is the olfactory map formed and interpreted in the mammalian brain?. *Annual review of neuroscience*, 34, 467–499. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-112210-112917>
- Motta, S. C., Guimarães, C. C., Furigo, I. C., Sukikara, M. H., Baldo, M. V., Lonstein, J. S., & Canteras, N. S. (2013). Ventral premammillary nucleus as a critical sensory relay to the maternal aggression network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(35), 14438–14443. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305581110>
- Mudge, J. M., Armstrong, S. D., McLaren, K., Beynon, R. J., Hurst, J. L., Nicholson, C., Robertson, D. H., Wilming, L. G., & Harrow, J. L. (2008). Dynamic instability of the major urinary protein gene family revealed by genomic and phenotypic comparisons between C57 and 129 strain mice. *Genome biology*, 9(5), R91. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-5-r91>
- Müller, M., & Fendt, M. (2006). Temporary inactivation of the medial and basolateral amygdala differentially affects TMT-induced fear behavior in rats. *Behavioural brain*

research, 167(1), 57–62.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.08.016>

Murray, D. R., & Schaller, M. (2012). Threat(s) and conformity deconstructed: Perceived threat of infectious disease and its implications for conformist attitudes and behavior. *European Journal of Social Psychology, 42*(2), 180–188. <https://doi.org/10.1002/ejsp.863>

National Research Council. (2010). Guide for the care and use of laboratory animals. <https://doi.org/10.17226/12910>

Newman S. W. (1999). The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Annals of the New York Academy of Sciences, 877*, 242–257. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb09271.x>

Nicolau, F. B. (2012). *Bases moleculares de la comunicación química*. Universitat Oberta de Catalunya (UOC, Ed.) (1st ed.). Barcelona. PID: 00162232

Nomikos, G. G., & Spyraiki, C. (1988). Influence of oestrogen on spontaneous and diazepam-induced exploration of rats in an elevated plus maze. *Neuropharmacology, 27*(7), 691–696. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(88\)90077-9](https://doi.org/10.1016/0028-3908(88)90077-9)

Nomoto, K., & Lima, S. Q. (2015). Enhanced male-evoked responses in the ventromedial hypothalamus of sexually receptive female mice. *Current biology : CB, 25*(5), 589–594. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.12.048>

Nordlund, D. A., & Lewis, W. J. (1976). Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific

interactions. *Journal of Chemical Ecology*, 2(2), 211–220.
<http://doi.org/10.1007/BF00987744>

Novotny, M. V., Ma, W., Wiesler, D., & Zidek, L. (1999). Positive identification of the puberty-accelerating pheromone of the house mouse: the volatile ligands associating with the major urinary protein. *Proceedings. Biological sciences*, 266(1432), 2017–2022.
<https://doi.org/10.1098/rspb.1999.0880>

Novotny, M., Jemiolo, B., Harvey, S., Wiesler, D., & Marchlewska-Koj, A. (1986). Adrenal-mediated endogenous metabolites inhibit puberty in female mice. *Science*, 231(4739), 722–725.
<https://doi.org/10.1126/science.3945805>

Novotny, M., Schwende, F. J., Wiesler, D., Jorgenson, J. W., & Carmack, M. (1984). Identification of a testosterone-dependent unique volatile constituent of male mouse urine: 7-exo-ethyl-5-methyl-6,8-dioxabicyclo [3.2.1]-3-octene. *Experientia*, 40(2), 217–219.
<https://doi.org/10.1007/BF01963608>

Numan, M., & Insel, T. (2003). The Neurobiology of Parental Behavior. In *Hormones, Brain, and Behavior. Vol. 1* (Vol. 1).

Oaten, M., Stevenson, R. J., & Case, T. I. (2011). Disease avoidance as a functional basis for stigmatization. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 366(1583), 3433–3452.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0095>

- O'Boyle, M. (1974). Rats and mice together: the predatory nature of the rat's mouse-killing response. *Psychological bulletin*, 81(4), 261–269. <https://doi.org/10.1037/h0036175>
- O'Connell, L. A., & Hofmann, H. A. (2012). Evolution of a vertebrate social decision-making network. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6085), 1154–1157. <https://doi.org/10.1126/science.1218889>
- Ogura, T., Krosnowski, K., Zhang, L., Bekkerman, M., & Lin, W. (2010). Chemoreception regulates chemical access to mouse vomeronasal organ: Role of solitary chemosensory cells. *PLoS ONE*, 5(7). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0011924>
- Ohman, J. L., Baer, H., Anderson, M. C., Leitermann, K., & Brown, P. (1983). Surface washes of living cats: an improved method of obtaining clinically relevant allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 72(3), 288–293. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(83\)90033-7](https://doi.org/10.1016/0091-6749(83)90033-7)
- Oldfield, R. G., Harris, R. M., Hendrickson, D. A., & Hofmann, H. A. (2013) Arginine vasotocin and androgen pathways are associated with mating system variation in North American cichlid fishes. *Hormones and Behavior*, 64 (1), 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.04.006>
- Osada, K., Kurihara, K., Izumi, H., & Kashiwayanagi, M. (2013). Pyrazine analogues are active components of wolf urine that induce avoidance and freezing behaviours in mice. *PLoS one*, 8(4), e61753. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061753>
- Osada, K., Miyazono, S., & Kashiwayanagi, M. (2014). Pyrazine analogs are active components of wolf urine that induce

avoidance and fear-related behaviors in deer. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8(AUG). <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00276>

Osada, K., Miyazono, S., & Kashiwayanagi, M. (2015). The scent of wolves: pyrazine analogs induce avoidance and vigilance behaviors in prey. *Frontiers in neuroscience*, 9, 363. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00363>

Osada, K., Miyazono, S., & Kashiwayanagi, M. (2017). Structure-Activity Relationships of Alkylpyrazine Analogs and Fear-Associated Behaviors in Mice. *Journal of Chemical Ecology*, 43(3), 263–272. <https://doi.org/10.1007/s10886-017-0822-3>

Pabba, M., & Fukuda, M. (2013). *Evolutionary development of the amygdaloid complex*. <https://doi.org/10.3389/fnana.2013.00027>

Padilla, S. L., Qiu, J., Soden, M. E., Sanz, E., Nestor, C. C., Barker, F. D., Quintana, A., Zweifel, L. S., Rønnekleiv, O. K., Kelly, M. J., & Palmiter, R. D. (2016). Agouti-related peptide neural circuits mediate adaptive behaviors in the starved state. *Nature neuroscience*, 19(5), 734–741. <https://doi.org/10.1038/nn.4274>

Pankevich, D. E., Baum, M. J. & Cherry, J. A. (2004). Olfactory Sex Discrimination Persists, Whereas the Preference for Urinary Odorants from Estrous Females Disappears in Male Mice after Vomeronasal Organ Removal. *The Journal of Neuroscience*, 24 (42), 9451–9457. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2376-04.2004>

Papes, F., Logan, D. W., & Stowers, L. (2010). The vomeronasal organ mediates interspecies defensive behaviors through

detection of protein pheromone homologs. *Cell*, 141(4), 692–703. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.037>

Pardo-Bellver, C., Cádiz-Moretti, B., Novejarque, A., Martínez-García, F., & Lanuza, E. (2012). Differential efferent projections of the anterior, posteroventral, and posterodorsal subdivisions of the medial amygdala in mice. *Frontiers in neuroanatomy*, 6, 33. <https://doi.org/10.3389/fnana.2012.00033>

Parker, L. A., & Limebeer, C. L. (2006). Conditioned gaping in rats: a selective measure of nausea. *Autonomic neuroscience: basic & clinical*, 129(1-2), 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2006.07.022>

Parkes, A. S., & Bruce, H. M. (1962). Pregnancy-block in female mice placed in boxes soiled by males. *Journal of reproduction and fertility*, 4, 303–308. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0040303>

Parsons, M. H., & Blumstein, D. T. (2010). Familiarity breeds contempt: kangaroos persistently avoid areas with experimentally deployed dingo scents. *PloS one*, 5(5), e10403. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010403>

Paul, E. S., Sher, S., Tamietto, M., Winkielman, P., & Mendl, M. T. (2020). Towards a comparative science of emotion: Affect and consciousness in humans and animals. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 108, 749-770. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.11.014>

Paxinos, G. & Franklin, K. B. J. (2004). *Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (Vol. 2nd)*. California: Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(03\)00088-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(03)00088-X)

- Penn, D. J., Schneider, G. White, K. & Potts, W. (1998) Influenza infection neutralizes the attractiveness of male odour to female mice. *Ethology*, 104 (8), 685-694. doi: 10.1111/j.1439-0310.1998.tb00102.x
- Pérez-Gómez, A., Bleyemehl, K., Stein, B., Pyrski, M., Birnbaumer, L., Munger, S. D., Leinders-Zufall, T., Zufall, F. & Chamero, P. (2015) Innate Predator Odor Aversion Driven by Parallel Olfactory Subsystems that Converge in the Ventromedial Hypothalamus. *Current Biology*, 25 (10), 1340-1346. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.03.026>
- Petrovich, G. D., Canteras, N. S., & Swanson, L. W. (2001). Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain research. Brain research reviews*, 38(1-2), 247–289. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(01\)00080-7](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(01)00080-7)
- Pfaff, D. W., & Sakuma, Y. (1979). Deficit in the lordosis reflex of female rats caused by lesions in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *The Journal of physiology*, 288, 203–210.
- Platón (1983). Fedón. En *El banquete*. Fedón. Fedro (trad. L. Gil.). Buenos Aires: Orbis.
- Portfors C. V. (2007). Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, 46(1), 28–34.
- Pritchett-Corning, K. R., Chang, F. T., & Festing, M. F. (2009). Breeding and housing laboratory rats and mice in the same room does not affect the growth or reproduction of either

species. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 48(5), 492–498.

- Regenbogen, C., Axelsson, J., Lasselin, J., Porada, D. K., Sundelin, T., Peter, M. G., Lekander, M., Lundström, J. N., & Olsson, M. J. (2017). Behavioral and neural correlates to multisensory detection of sick humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(24), 6400–6405. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617357114>
- Reicher, S. D., Templeton, A., Neville, F., Ferrari, L., & Drury, J. (2016). Core disgust is attenuated by ingroup relations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(10), 2631–2635. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517027113>
- Restrepo, D., Arellano, J., Oliva, A. M., Schaefer, M. L., & Lin, W. (2004). Emerging views on the distinct but related roles of the main and accessory olfactory systems in responsiveness to chemosensory signals in mice. *Hormones and behavior*, 46(3), 247–256. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2004.02.009>
- Rieger, N. S., Worley, N. B., Ng, A. J., & Christianson, J. P. (2022). Insular cortex modulates social avoidance of sick rats. *Behavioural brain research*, 416, 113541. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113541>
- Rivière, S., Challet, L., Fluegge, D., Spehr, M., & Rodriguez, I. (2009). Formyl peptide receptor-like proteins are a novel family of vomeronasal chemosensors. *Nature*, 459(7246), 574–577. <https://doi.org/10.1038/nature08029>

- Roberts, S. A., Davidson, A. J., Mclean, L., Beynon, R. J. & Hurst, J. L. (2012). Pheromonal Induction of Spatial Learning in Mice. *Science*, 338(6113), 1462-1465. <https://doi.org/10.1126/science.1225638>
- Roberts, S. A., Prescott, M. C., Davidson, A. J., McLean, L., Beynon, R. J., & Hurst, J. L. (2018). Individual odour signatures that mice learn are shaped by involatile major urinary proteins (MUPs). *BMC biology*, 16(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0512-9>
- Roberts, S. A., Simpson, D. M., Armstrong, S. D., Davidson, A. J., Robertson, D. H., McLean, L., Beynon, R. J. & Hurst, J. L. (2010). Darcin: a male pheromone that stimulates female memory and sexual attraction to an individual male's odour. *BMC Biology*, 8(1), 75. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-75z>
- Rodríguez, M., Ceric, F., Murgas, P., Harland, B., Torrealba, F., & Contreras, M. (2020). Interoceptive Insular Cortex Mediates Both Innate Fear and Contextual Threat Conditioning to Predator Odor. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 13, 283. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00283>
- Rodolfo-Masera, T. (1943). Su l'esistenza di un particolare organo olfattivo nel setto nasale della cavia e di altri roditori. *Arch. Ital. Anat. Embriol.*, 48, 157-213. <http://ci.nii.ac.jp/naid/10007842716/en/>
- Rogers-Carter, M. M., Varela, J. A., Gribbons, K. B., Pierce, A. F., McGoey, M. T., Ritchey, M., & Christianson, J. P. (2018). Insular cortex mediates approach and avoidance responses to social affective stimuli. *Nature neuroscience*, 21(3), 404-414. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0071-y>

- Rollo, C. D., Czvzewska, E., & Borden, J. H. (1994). Fatty acid necromones for cockroaches. *Naturwissenschaften*, 81(9), 409–410. <http://doi.org/10.1007/BF01132695>
- Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G., & Kobilka, B. K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 459(7245), 356–363. <https://doi.org/10.1038/nature08144>
- Ross, K. G., & Keller, L. (1995). Ecology and Evolution of Social Organization: Insights from Fire Ants and Other Highly Eusocial Insects. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 26, 631–656. <http://www.jstor.org/stable/2097222>
- Sakurai, T., Namiki, S., & Kanzaki, R. (2014). Molecular and neural mechanisms of sex pheromone reception and processing in the silkworm *Bombyx mori*. *Frontiers in physiology*, 5, 125. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00125>
- Sano, K., Nakata, M., Musatov, S., Morishita, M., Sakamoto, T., Tsukahara, S., & Ogawa, S. (2016). Pubertal activation of estrogen receptor α in the medial amygdala is essential for the full expression of male social behavior in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(27), 7632–7637. <https://doi.org/10.1073/pnas.1524907113>
- Sarolidou, G., Axelsson, J., Kimball, B. A., Sundelin, T., Regenbogen, C., Lundström, J. N., Lekander, M., & Olsson, M. J. (2020). People expressing olfactory and visual cues of disease are less liked. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B*,

Biological sciences, 375(1800), 20190272.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0272>

Satyaraj, E., Li, Q., Sun, P., & Sherrill, S. (2019). Anti-Fel d1 immunoglobulin Y antibody-containing egg ingredient lowers allergen levels in cat saliva. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 21(10), 875–881. <https://doi.org/10.1177/1098612X19861218>

Sbarbati, A., & Osculati, F. (2006). Allelochemical communication in vertebrates: kairomones, allomones and synomones. *Cells, Tissues, Organs*, 183(4), 206–19. <http://doi.org/10.1159/000096511>

Scalia, F., & Winans, S. S. (1975). The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *The Journal of comparative neurology*, 161(1), 31–55. <https://doi.org/10.1002/cne.901610105>

Schaal, B., Coureaud, G., Langlois, D., Giniès, C., Sémon, E., & Perrier, G. (2003). Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature*, 424(6944), 68–72. <https://doi.org/10.1038/nature01739>

Schaller M. (2011). The behavioural immune system and the psychology of human sociality. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 366(1583), 3418–3426. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0029>

Schaller, M. (2014). When and how disgust is and is not implicated in the behavioral immune system. *Evolutionary Behavioral Sciences*, 8(4), 251–256. <https://doi.org/10.1037/ebs0000019>

- Schaller, M. & Park, J. H. (2011). The Behavioral Immune System (and Why It Matters). *Current Directions in Psychological Science*, 20(2), 99–103. doi:10.1177/0963721411402596
- Schaller, M., Murray, D. R., & Bangerter, A. (2015). Implications of the behavioural immune system for social behaviour and human health in the modern world. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 370(1669), 20140105. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0105>
- Schmid, A., Pyrski, M., Biel, M., Leinders-Zufall, T., & Zufall, F. (2010). Grueneberg ganglion neurons are finely tuned cold sensors. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(22), 7563–7568. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0608-10.2010>
- Severud, W. J., Belant, J. L., Bruggink, J. G., & Windels, S. K. (2011). Predator cues reduce American beaver use of foraging trails. *Human-Wildlife Interactions*, 5(2), 296-305.
- Sherborne, A. L., Thom, M. D., Paterson, S., Jury, F., Ollier, W. E., Stockley, P., Beynon, R. J., & Hurst, J. L. (2007). The genetic basis of inbreeding avoidance in house mice. *Current biology: CB*, 17(23), 2061–2066. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.10.041>
- Shi, C. J., & Cassell, M. D. (1999). Perirhinal cortex projections to the amygdaloid complex and hippocampal formation in the rat. *The Journal of comparative neurology*, 406(3), 299–328. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(19990412\)406:3<299::aid-cne2>3.0.co;2-9](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19990412)406:3<299::aid-cne2>3.0.co;2-9)

- Shibley, M. T., & Adamek, G. D. (1984). The connections of the mouse olfactory bulb: a study using orthograde and retrograde transport of wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. *Brain research bulletin*, 12(6), 669–688. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(84\)90148-5](https://doi.org/10.1016/0361-9230(84)90148-5)
- Silva, B. A., Mattucci, C., Krzywkowski, P., Murana, E., Illarionova, A., Grinevich, V., Canteras, N. S., Ragozzino, D. & Gross, C. T. (2013) Independent hypothalamic circuits for social and predator fear. *Nature Neuroscience*, 16 (12), 1731–3. <https://doi.org/10.1038/nn.3573>
- Simpson, J., Carter, S., Anthony, S. H., & Overton, P. G. (2006). Is disgust a homogeneous emotion? *Motivation and Emotion*, 30(1), 31–41. <https://doi.org/10.1007/S11031-006-9005-1/TABLES/2>
- Sisk, C. L., & Zehr, J. L. (2005). Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior. *Frontiers in neuroendocrinology*, 26(3-4), 163–174. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2005.10.003>
- Smith, C. J., & Bilbo, S. D. (2021). Sickness and the Social Brain: Love in the Time of COVID. *Frontiers in psychiatry*, 12, 633664. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.633664>
- Smith, W., Butler, A. J., Hazell, L. A., Chapman, M. D., Pomés, A., Nickels, D. G., & Thomas, W. R. (2004). Fel d 4, a cat lipocalin allergen. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 34(11), 1732–1738. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.02090.x>
- Sng, J. C., Taniura, H., & Yoneda, Y. (2004). A tale of early response genes. *Biological & pharmaceutical*

bulletin, 27(5), 606–612.
<https://doi.org/10.1248/bpb.27.606>

Sosulski, D. L., Bloom, M. L., Cutforth, T., Axel, R., & Datta, S. R. (2011). Distinct representations of olfactory information in different cortical centres. *Nature*, 472(7342), 213–216.
<https://doi.org/10.1038/nature09868>

Spehr, M., Spehr, J., Ukhanov, K., Kelliher, K. R., Leinders-Zufall, T. & Zufall, F. (2006). Parallel processing of social signals by the mammalian main and accessory olfactory systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63 (13), 1476–1484. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6109-4>

Staples, L. G., McGregor, I. S., Apfelbach, R., & Hunt, G. E. (2008). Cat odor, but not trimethylthiazoline (fox odor), activates accessory olfactory and defense-related brain regions in rats. *Neuroscience*, 151(4), 937–947.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.11.039>

Starks, P. T., Blackie, C. A., & Seeley, T. D. (2000). Fever in honeybee colonies. *Die Naturwissenschaften*, 87(5), 229–231. <https://doi.org/10.1007/s001140050709>

Stempel, H., Jung, M., Pérez-Gómez, A., Leinders-Zufall, T., Zufall, F., & Bufe, B. (2016). Strain-specific Loss of Formyl Peptide Receptor 3 in the Murine Vomeronasal and Immune Systems. *The Journal of biological chemistry*, 291(18), 9762–9775.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M116.714493>

Stern, J., & Shiramizu, V. (2022). Hormones, ovulatory cycle phase and pathogen disgust: A longitudinal investigation of the Compensatory Prophylaxis Hypothesis. *Hormones and*

behavior, 138, 105103.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2021.105103>

Stevenson, R. J., Case, T. I., Oaten, M. J., Stafford, L., & Saluja, S. (2019). A Proximal Perspective on Disgust. *Emotion Review*, 11(3), 209–225. <https://doi.org/10.1177/1754073919853355>

Stowers, L., & Liberles, S. D. (2016). State-dependent responses to sex pheromones in mouse. *Current Opinion in Neurobiology*, 38, 74–79.

Storsberg, S., Stryjek, R., Modlińska, K., Gottswinter, K., D'Hanis, W., Kröber, A., Wernecke, K., Roskoden, T., & Fendt, M. (2018). Predator odor induced defensive behavior in wild and laboratory rats: A comparative study. *Physiology & behavior*, 194, 341–347. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.06.009>

Stryjek, R., Mioduszevska, B., Spaltabaka-Gędek, E., & Juszcak, G. R. (2018). Wild Norway Rats Do Not Avoid Predator Scents When Collecting Food in a Familiar Habitat: A Field Study. *Scientific reports*, 8(1), 9475. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27054-4>

Sturm, T., Leinders-Zufall, T., Maček, B., Walzer, M., Jung, S., Pömmerl, B., Stevanović, S., Zufall, F., Overath, P., & Rammensee, H. G. (2013). Mouse urinary peptides provide a molecular basis for genotype discrimination by nasal sensory neurons. *Nature communications*, 4, 1616. <https://doi.org/10.1038/ncomms2610>

Sun, Q., y Zhou, X. (2013). Corpse management in social insects. *International Journal of Biological Sciences*, 9(3), 313–321 <http://doi.org/10.7150/ijbs.5781>

- Suryanarayana, S. M., Robertson, B., & Grillner, S. (2022). The neural bases of vertebrate motor behaviour through the lens of evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 377(1844), 20200521. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2020.0521>
- Szoka, P. R., & Paigen, K. (1978). Regulation of mouse major urinary protein production by the Mup-A gene. *Genetics*, 90(3), 597–612. <https://doi.org/10.1093/genetics/90.3.597>
- Taborsky, M., Cant, M., & Komdeur, J. (2021). *The Evolution of Social Behaviour*. Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/9780511894794
- Takahashi L. K. (2014). Olfactory systems and neural circuits that modulate predator odor fear. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 8, 72. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00072>
- Takahashi, L. K., Hubbard, D. T., Lee, I., Dar, Y., & Sipes, S. M. (2007). Predator odor-induced conditioned fear involves the basolateral and medial amygdala. *Behavioral neuroscience*, 121(1), 100–110. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.121.1.100>
- Tirindelli, R., Dibattista, M., Pifferi, S., & Menini, A. (2009). From pheromones to behavior. *Physiological reviews*, 89(3), 921–956. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2008>
- Torres, R. T., Silva, N., Brotas, G., & Fonseca, C. (2015). To Eat or Not To Eat? The Diet of the Endangered Iberian Wolf (*Canis lupus signatus*) in a Human-Dominated Landscape in Central Portugal. *PloS one*, 10(6), e0129379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129379>

- Tybur, J. M., Lieberman, D., Kurzban, R., & DeScioli, P. (2013). Disgust: evolved function and structure. *Psychological review*, 120(1), 65–84. <https://doi.org/10.1037/a0030778>
- Ukleja-Sokołowska, N., Gawrońska-Ukleja, E., Żbikowska-Gotz, M., Socha, E., Lis, K., Sokołowski, Ł., Kuźmiński, A., & Bartuzi, Z. (2016). Analysis of feline and canine allergen components in patients sensitized to pets. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 12, 61. <https://doi.org/10.1186/s13223-016-0167-4>
- Unger, E. K., Burke, K. J., Jr, Yang, C. F., Bender, K. J., Fuller, P. M., & Shah, N. M. (2015). Medial amygdalar aromatase neurons regulate aggression in both sexes. *Cell reports*, 10(4), 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.040>
- van der Lee, S., & Boot, L. M. (1955). Spontaneous pseudopregnancy in mice. *Acta physiologica et pharmacologica Neerlandica*, 4(3), 442–444.
- van der Lee, S., & Boot, L. M. (1956). Spontaneous pseudopregnancy in mice. II. *Acta physiologica et pharmacologica Neerlandica*, 5(2), 213–215.
- Vandenbergh, J. G. (1967). Effect of the presence of a male on the sexual maturation of female mice. *Endocrinology*, 81(2), 345–349. <https://doi.org/10.1210/endo-81-2-345>
- Vandenbergh J. G. (1976). Acceleration of sexual maturation in female rats by male stimulation. *Journal of reproduction and fertility*, 46(2), 451–453. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0460451>

- Vazdarjanova, A., Cahill, L., & McGaugh, J. L. (2001). Disrupting basolateral amygdala function impairs unconditioned freezing and avoidance in rats. *The European journal of neuroscience*, *14*(4), 709–718. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01696.x>
- Vladimirov, N., & Sourjik, V. (2009). Chemotaxis: how bacteria use memory. *Biological chemistry*, *390*(11), 1097–1104. <https://doi.org/10.1515/BC.2009.130>
- Voznessenskaya, V. V. (2014). Influence of Cat Odor on Reproductive Behavior and Physiology in the House Mouse: (*Mus Musculus*). In C. Mucignat-Caretta (Ed.), *Neurobiology of Chemical Communication*. CRC Press/Taylor & Francis.
- Wahlsten, D., & Crabbe, J. C. (2007). Behavioral Testing. In *The Mouse in Biomedical Research* (Vol. 3, pp. 513-534). Elsevier Inc.. <https://doi.org/10.1016/B978-012369454-6/50069-8>
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). Estradiol decreases anxiety behavior and enhances inhibitory avoidance and gestational stress produces opposite effects. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, *10*(3), 251–260. <https://doi.org/10.1080/00958970701220416>
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2008). Parity and estrogen-administration alter affective behavior of ovariectomized rats. *Physiology & behavior*, *93*(1-2), 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.09.002>
- Watts, R. (1971). A simple capillary tube method for the determination of the specific gravity of 25 and 50 micro 1

quantities of urine. *Journal of Clinical Pathology*, 24 (7): 667–668.

Weiler, E., & Farbman, A. I. (2003). The septal organ of the rat during postnatal development. *Chemical Senses*, 28(7), 581–593. <http://doi.org/10.1093/chemse/bjg047>

Weitekamp, C. A., Libbrecht, R., & Keller, L. (2017). Genetics and Evolution of Social Behavior in Insects. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Genet-120116-024515>, 51, 219–239. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-GENET-120116-024515>

Whitten, W. K. (1956). Modification of the oestrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male. *The Journal of endocrinology*, 13(4), 399–404. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0130399>

Whitten, W. K. (1958). Modification of the oestrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male; changes in the oestrous cycle determined by vaginal smears. *The Journal of endocrinology*, 17(3), 307–313. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0170307>

Whitten, W. K. (1959). Occurrence of anoestrus in mice caged in groups. *The Journal of endocrinology*, 18(1), 102–107. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0180102>

Wilensky, A. E., Schafe, G. E., Kristensen, M. P., & LeDoux, J. E. (2006). Rethinking the fear circuit: the central nucleus of the amygdala is required for the acquisition, consolidation, and expression of Pavlovian fear conditioning. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(48), 12387–12396. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4316-06.2006>

- Woodson, J., Niemeyer, A., & Bergan, J. (2017). Untangling the Neural Circuits for Sexual Behavior. *Neuron*, 95(1), 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.035>
- Wu, M. V & Tollkuhn, J. (2017). Hormones and Behavior Estrogen receptor alpha is required in GABAergic, but not glutamatergic, neurons to masculinize behavior. *Hormones and Behavior*, 95, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2017.07.001>
- Wyatt, T. D. (2014a). *Pheromones and animal behavior: Chemical signals and signatures. Pheromones and Animal Behavior: Chemical Signals and Signatures* (2nd ed.). Cambridge: Cambridge University Press. <http://doi.org/https://doi.org/10.1017/CBO9781139030748>
- Wyatt, T. D. (2014b). Proteins and peptides as pheromone signals and chemical signatures. *Animal Behaviour*, 97(SEPTEMBER 2014), 273–280. <http://doi.org/10.1016/j.anbehav.2014.07.025>
- Wyatt, T. D. (2010). Pheromones and signature mixtures: defining species-wide signals and variable cues for identity in both invertebrates and vertebrates. *Journal of comparative physiology*, 196 (10), 685–700. <https://doi.org/10.1007/s00359-010-0564-y>
- Wysocki, C. J., Wellington, J. L., & Beauchamp, G. K. (1980). Access of urinary nonvolatiles to the mammalian vomeronasal organ. *Science (New York, N.Y.)*, 207(4432), 781–783. <https://doi.org/10.1126/science.7352288>
- Xiao, K., Kondo, Y., & Sakuma, Y. (2004). Sex-specific effects of gonadal steroids on conspecific odor preference in the

rat. *Hormones and behavior*, 46(3), 356–361.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2004.05.008>

Xu, P., Hooper, A. M., Pickett, J. A., & Leal, W. S. (2012). Specificity determinants of the silkworm moth sex pheromone. *PLoS one*, 7(9), e44190.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044190>

Yang, M., Augustsson, H., Markham, C. M., Hubbard, D. T., Webster, D., Wall, P. M., Blanchard, R. J., & Blanchard, D. C. (2004). The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. *Physiology & behavior*, 81(3), 465–473. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.02.010>

Zielonka, T. M., Charpin, D., Berbis, P., Luciani, P., Casanova, D., & Vervloet, D. (1994). Effects of castration and testosterone on Fel dl production by sebaceous glands of male cats: I--Immunological assessment. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 24(12), 1169–1173.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.1994.tb03324.x>

Zufall, F., & Leinders-Zufall, T. (2007). Mammalian pheromone sensing. *Current opinion in neurobiology*, 17(4), 483–489.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.07.012>

Zufall, F., Leinders-Zufall, T., & Puche, A. C. (2008). Accessory Olfactory System. *The Senses: A Comprehensive Reference*, 4, 783–814. <https://doi.org/10.1016/B978-012370880-9.00128-6>