



POLITÉCNICA



E.T.S. DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,
ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,
ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS
GRADO EN BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRARIA

Jerarquía de dominancia social en ratones: modulación por la orina y regiones cerebrales implicadas

TRABAJO FIN DE GRADO

Autor: **Blanca Bardisa Sanjurjo**

Tutor: **José Luis Trejo Pérez**
Co-tutor: **David Menoyo Luque**

Julio de 2021



POLITÉCNICA



E.T.S. DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,
ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

**JERARQUÍA DE DOMINANCIA SOCIAL EN RATONES: MODULACIÓN POR
LA ORINA Y REGIONES CEREBRALES IMPLICADAS**

TRABAJO FIN DE GRADO

Blanca Bardisa Sanjurjo

MADRID, 2021

Director: José Luis Trejo Pérez

Dpto. de Neurogénesis en el Individuo Adulto, Instituto Cajal – CSIC

Cotutor: David Menoyo Luque

Dpto. de Producción Agraria, ETSIAAB – Universidad Politécnica de Madrid



POLITÉCNICA



E.T.S. DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,
ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

**TÍTULO DEL TFG- JERARQUÍA DE DOMINANCIA SOCIAL EN RATONES:
MODULACIÓN POR LA ORINA Y REGIONES CEREBRALES IMPLICADAS**

**Memoria presentada por Blanca Bardisa Sanjurjo para la obtención
del título de Graduado en Biotecnología por la Universidad
Politécnica de Madrid**

Fdo: Blanca Bardisa Sanjurjo

VºBº Tutor y Director del TFG

**D. José Luis Trejo Pérez
Doctor en CC. Biológicas
Dpto. de Neurogénesis del Individuo Adulto
Instituto Cajal - CSIC**

TREJO PEREZ
JOSE LUIS - DNI
51903916T

Firmado digitalmente
por TREJO PEREZ JOSE
LUIS - DNI 51903916T
Fecha: 2021.07.07
20:33:47 +02'00'

VºBº Cotutor UPM

**D. David Menoyo Luque
Prof. Titular, Doctor en Nutrición Animal
Dpto. de Producción Agraria
ETSIAAB - Universidad Politécnica de Madrid**

Madrid, 7 de Julio, 2021

AGRADECIMIENTOS Y RECONOCIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a todo el personal del laboratorio de Neurogénesis del Individuo Adulto del Instituto Cajal sus infinitas horas de ayuda y dedicación en todo momento. Gracias a mi tutor José Luis Trejo, por haber depositado en mí su confianza para realizar estas prácticas y llevar a cabo el proyecto de mi trabajo de fin de grado con su ayuda. También me gustaría dar las gracias especialmente a Elisa, por su eterna paciencia y total disposición desde el primer minuto y aun estando a miles de kilómetros de distancia. Gracias a Patri y Marta por haberme guiado durante estas prácticas con su mejor sonrisa y por su constante ayuda durante mi estancia en el laboratorio.

Agradecer a mi familia todo su apoyo, tanto emocional como económico, durante estos 4 años de carrera. Especialmente, dar las gracias a mis padres por el esfuerzo económico realizado para mi formación universitaria y por su apoyo incondicional.

Para terminar, dar las gracias a todos los amigos que me ha regalado Madrid, tanto los de la universidad como los del colegio mayor, por todas las risas, agobios, infinitas horas de estudio y momentos vividos durante estos inolvidables 4 años de carrera.

Gracias a todos.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1 Jerarquía social y dominancia	1
1.1.1 Concepto de jerarquía social	1
1.1.2 Características de la jerarquía social.....	1
1.1.3 Test del tubo para el estudio de la jerarquía social.....	2
1.2 Memoria social	3
1.2.1 Regiones cerebrales implicadas en jerarquía y memoria social	4
1.3 Memoria olfativa	5
1.3.1 Regiones cerebrales implicadas en percepción y memoria olfativa	5
1.4 Papel de la orina en conducta social	6
1.4.1 Feromonas	6
1.4.2 Proteínas urinarias mayores	7
1.5 Poblaciones celulares relacionadas con memoria social y olfativa	7
1.6 Trabajo previo de laboratorio y antecedentes	8
1.7 Objetivos	10
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1 Animales	11
2.2 Diseño experimental	11
2.3 Tratamiento del tejido para su análisis histológico	12
2.4 Análisis inmunohistoquímico	12
2.5 Imagen y métodos estereológicos	13
2.6 Análisis estadístico	16
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	17
3.1 Núcleo Paraventricular	17
3.2 Corteza Prefrontal	19
3.3 Corteza Piriforme	21
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	25
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	28
CAPÍTULO 6: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
ANEXO A: Jerarquías establecidas	i
ANEXO B: Anticuerpos utilizados en los ensayos inmunohistoquímicos.....	ii
ANEXO C: Comparaciones por parejas (ANOVA)	iii

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Densidades celulares estudiadas en cada una de las regiones cerebrales	16
Tabla 2. Pruebas de normalidad Shapiro-Wilk para los grupos de datos de PVN	17
Tabla 3. Test no paramétrico Kruskal-Wallis para muestras independientes de la variable densidad celular OT/cFos+ en PVN	17
Tabla 4. Test paramétrico ANOVA de muestras independientes para las variables densidad celular OT+ y cFos+ en PVN	18
Tabla 5. Pruebas de normalidad Shapiro-Wilk para los grupos de datos de PFC	19
Tabla 6. Test no paramétrico Kruskal-Wallis para muestras independientes de las variables densidad celular cFos+ y PV/cFos+ de PFC	20
Tabla 7. Test paramétrico ANOVA de muestras independientes para la variable densidad celular PV+ en PFC	20
Tabla 8. Pruebas de normalidad Shapiro-Wilk para los grupos de datos de la corteza piriforme	22
Tabla 9. Test no paramétrico Kruskal-Wallis para muestras independientes de la variable densidad celular PV/cFos+ en la corteza piriforme	22
Tabla 10. Test paramétrico ANOVA de muestras independientes para las variables densidad celular PV+ y cFos+ en la corteza piriforme	23
Tabla Complementaria 1. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en los ensayos inmunohistoquímicos	ii
Tabla Complementaria 2. Comparaciones por parejas basadas en medias marginales estimadas de las variables densidad celular OT+ y cFos+ del núcleo paraventricular	iii
Tabla Complementaria 3. Comparaciones por parejas basadas en medias marginales estimadas de la variable densidad celular PV+ de la corteza prefrontal	iv
Tabla Complementaria 4. Comparaciones por parejas basadas en medias marginales estimadas de las variables densidad celular PV+ y cFos+ de la corteza piriforme	v

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Criterios relacionados con jerarquía social	2
Figura 2. Test del tubo para establecer la jerarquía social en ratones	3
Figura 3. Porcentaje de enfrentamientos ganados en los enfrentamientos interjaulas entre animales con el mismo rango de dominancia	9
Figura 4. Esquema ilustrativo del diseño experimental	12
Figura 5. Localización de las regiones cerebrales de interés en cerebro de ratón	14
Figura 6. Fotografías realizadas en microscopio confocal de las diferentes regiones cerebrales	14
Figura 7. Densidades celulares de PVN en función del rango social y de la exposición a orina control u orina dominante	19
Figura 8. Densidades celulares de PFC en función del rango social y de la exposición a orina control u orina dominante	21
Figura 9. Densidades celulares de la corteza piriforme en función del rango social y de la exposición a orina control u orina dominante	24
Figura 10. Densidad celular cFos+ de la corteza piriforme en función del rango social	24
Figura Complementaria 1. Jerarquías establecidas en cada jaula mediante la realización del test de tubo	i

LISTA DE ABREVIATURAS

AVP	Arginina Vasopresina
BSA	Del inglés <i>Bovine Serum Albumin</i>
MUP	Del inglés <i>Mayor Urine Proteins</i>
OT	Oxitocina
PB	Del inglés <i>Phosphate Buffer</i>
PFC	Del inglés <i>Prefrontal Cortex</i>
PV	Parvalbúmina
PVN	Del inglés <i>Paraventricular Nucleus</i>
VNO	Del inglés <i>Vomeronasal Organ</i>

ABSTRACT

The phenomenon of social hierarchy and dominance has been extensively studied throughout history due to its implications within animal societies, such as access to resources, reproductive success or reduction of conflict in societies. However, the neurobiological mechanisms behind this process are still not well defined. In this research, we have focused on two aspects potentially involved in the establishment and maintenance of social hierarchy in mice, the mouse urine and the role of the paraventricular nucleus, the prefrontal cortex and the piriform cortex in social hierarchy.

Urine is an important source of chemosensory signals that provide information about social status, reproductive status or familiarity between animals. In the case of pheromones present in mouse urine, it is known that the urine of dominant mice has a higher concentration of major urinary proteins, notably MUP20, with numerous biological effects, such as reproduction, social learning or behaviours related to aggressiveness and competitiveness. The results are promising in terms of the role of urine in the competitive interactions of subordinate animals without previous cohabitation or familiarity with each other.

As for the brain regions involved in the phenomenon of social hierarchy, numerous studies have sought to identify these regions. In this work, we studied three of these regions, in particular, the paraventricular nucleus, the prefrontal cortex and the piriform cortex, all of which are implicated in some way in social dominance in mice. Different cell populations in these regions were quantified trying to find differences between mice according to their social rank and exposure to urine, to confirm the involvement of these regions in the social hierarchy. However, the results obtained showed no clear differences in the cell populations of these regions between mice.

Key words: Social hierarchy, pheromones, urine, MUPs, paraventricular nucleus, prefrontal cortex, piriform cortex.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Jerarquía social y dominancia

1.1.1 Concepto de jerarquía social

La jerarquía social es un fenómeno ampliamente extendido entre los animales sociales, que abarca desde insectos y peces, hasta roedores y primates. El orden jerárquico determina qué individuo tiene acceso prioritario a los recursos naturales, tales como el alimento o el agua, a la reproducción o a lugares de descanso (Wang et al., 2014).

El término de “jerarquía social” fue descrito por primera vez por Thorleif Schjelderup-Ebbe en 1922, al observar el orden jerárquico establecido por las gallinas a la hora de acceder al alimento. Las gallinas tenían establecido un rango social que determinaba el orden de acceso a los recursos. Este orden jerárquico se estableció por medio de confrontaciones físicas durante la fase inicial de convivencia, clasificándolas en dominantes y subordinadas, permitiendo así a las dominantes un acceso prioritario al alimento. Así, Schjelderup-Ebbe propuso que la estructura jerárquica en animales permitía una reducción de los conflictos y lesiones, un ahorro de energía y promovía la estabilidad social.

Para la instauración de un orden jerárquico en un grupo social es necesario el establecimiento de una relación dominante-subordinado entre los individuos del grupo. Para la clasificación de los miembros del grupo en dominantes o subordinados, se llevan a cabo peleas físicas, exhibiciones visuales de fuerza u otros comportamientos que muestren una superioridad física frente al resto (Bruce T. Lahn., 2020). El reconocimiento social es fundamental para el establecimiento de relaciones sociales, y en concreto, para el establecimiento de rangos de dominancia que determinen la jerarquía social. Para los animales, como los ratones, el reconocimiento de otros miembros es crítico para mantener la jerarquía social (Kaidanovich-Beilin et al., 2011).

La jerarquía social es una estructura organizativa de grupos animales caracterizada por ser generalmente estable. Sin embargo, el estatus social de un animal puede cambiar (Nelson et al., 2019), subrayando así, la importancia de los mecanismos que se encuentran detrás de estos eventos.

1.1.2 Características de la jerarquía social

Los ratones salvajes no adoptan un orden jerárquico en la naturaleza. Por ello, se crea una jerarquía social artificial en el laboratorio, al forzar la convivencia entre ratones en una misma jaula. Para evaluar la jerarquía social y las relaciones dominante-subordinado entre ratones en el laboratorio, se tienen en cuenta cuatro criterios (**Figura 1**) (Wang et al., 2011):

En primer lugar, se tiene en cuenta la **transitividad**. Una jerarquía es transitiva cuando se establece que, al ser un ratón A dominante sobre un ratón B, y el ratón B dominante sobre C, entonces el ratón A es dominante frente a C. Esta relación de transitividad se cumple en el 95% de los casos.

De forma muy relacionada a la transitividad, se encuentra la **linealidad**. Definimos linealidad como el orden o nivel de estructuración de una jerarquía. La mayoría de las jerarquías establecidas entre 4 ratones adoptan una estructura lineal, donde el ratón A domina sobre B, C y D, un segundo animal B, domina sobre C y D, pero no sobre A, un tercer animal C, que domina sobre D, pero no sobre A y B, y así sucesivamente.

En tercer lugar, hay que definir la **estabilidad en el tiempo** de una jerarquía como aquella que no se ve alterada con el paso del tiempo manteniendo constante el rango social de los individuos.

Por último, al ser evaluada la jerarquía social en ratones mediante el test del tubo, se tiene en cuenta la **coherencia con otras pruebas** que testan el rango social de los ratones y se comprueba que los resultados concuerden entre las distintas pruebas (Wang et al., 2011). Entre estas pruebas alternativas se encuentran el sistema de madrigueras visibles, la prueba de comportamiento agonista o el ensayo del barbero.

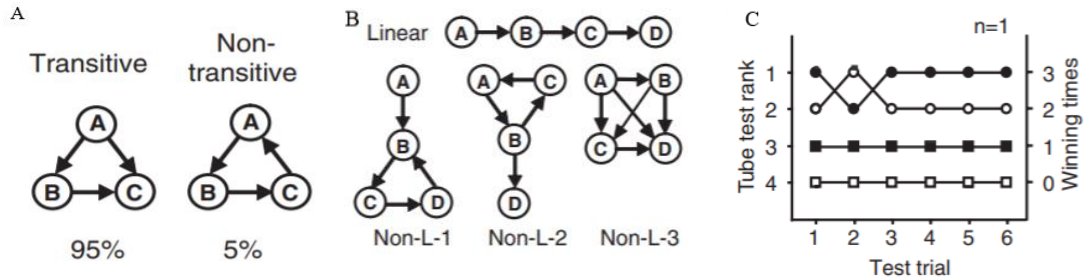


Figura 1. Criterios relacionados con jerarquía social (Wang et al., 2011). **Figura 1A.** Esquema de una relación transitiva y no transitiva. **Figura 1B.** Esquema de una relación lineal y no lineal. Non-L: no lineal. **Figura 1C.** Ejemplo de una jerarquía estable en el tiempo evaluada durante 6 días mediante el test del tubo. En el eje X se representan los días de realización del test (6 días), mientras que en el eje Y se representan las victorias ganadas de cada individuo en cada uno de los días de enfrentamientos.

1.1.3 Test del tubo para el estudio de la jerarquía social en ratones

Para evaluar el orden jerárquico de ratones en laboratorio es utilizado ampliamente el test del tubo. Este test es el método empleado en los experimentos de este estudio para establecer la jerarquía social entre ratones.

La prueba consiste en la entrada simultánea de dos ratones en un tubo por los extremos opuestos. Este tubo tiene un diámetro que solo permite el avance de un ratón a través de él, por lo que, al encontrarse los dos ratones en el centro del tubo, un ratón avanza y el otro

retrocede (**Figura 2**). El ratón que ha avanzado se le considera el ganador o dominante, frente al ratón que ha retrocedido que se le considera el perdedor o subordinado. Este test se realiza varias veces hasta establecer un orden jerárquico estable al enfrentar a todos los ratones de una misma jaula entre sí durante varios días (Fan et al., 2019). Según el número de victorias de los ratones en el test del tubo, se irán clasificando en dominantes, intermedios o subordinados.

Este test es una herramienta conductual para evaluar la tendencia de dominancia entre ratones sin causarles estrés ni lesiones al tratarse de un conflicto social no violento. Se evalúa la dominancia como una interacción de territorialidad, donde los ratones dominantes o ganadores muestran un mayor empuje y los ratones subordinados o perdedores muestran menos resistencia a ser empujados. Esta prueba ha demostrado una buena transitividad y estabilidad en el tiempo (Wang et al., 2011).

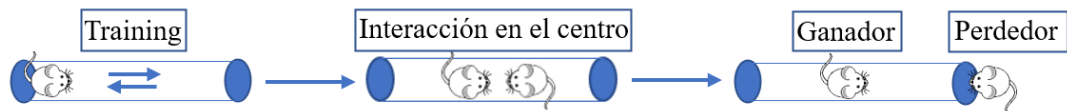


Figura 2. Test del tubo para establecer la jerarquía social en ratones.

1.2 Memoria social

La memoria social es un proceso crucial para mantener la estructura y estabilidad de las relaciones sociales que definen a las sociedades (Kogan et al., 2000). La memoria social engloba diferentes procesos cognitivos y conductuales, como la capacidad de reconocer a un individuo (reconocimiento social) o la capacidad de aprender de otros (aprendizaje social) (van der Kooij y Sandi, 2012).

La memoria social en animales es esencial para el establecimiento de una jerarquía social, el reconocimiento de la pareja y la descendencia, la defensa territorial o el reconocimiento entre especies (Tzakis y Holahan, 2019). La memoria social es un proceso común en multitud de mamíferos, sin embargo, existen diferentes factores que la condicionan, como la especie, el sexo, la edad o el estado emocional en el momento de la investigación (van der Kooij y Sandi, 2012).

Para el establecimiento de la jerarquía social es necesario que los animales posean unos mecanismos cognitivos que incluyan el reconocimiento y memoria social, el aprendizaje de normas sociales o la detección del incumplimiento de estas normas (Cummins, 2000). Así, la memoria permite construir modelos de pensamiento para guiar actos y comportamientos futuros (Spreng, 2013).

La cognición social juega un papel fundamental en el establecimiento de la jerarquía social en animales. Definimos cognición social como un proceso neurobiológico presente tanto en humanos como en animales, que permite interpretar los signos sociales entre individuos de la misma especie y responder a ellos con una conducta adecuada (Butman, 2001).

El ratón es una especie ampliamente usada en estudios tanto conductuales como neurobiológicos sobre memoria y comportamiento social. La memoria social y capacidad cognitiva que les caracteriza les permite reconocer individuos de su misma especie, a su descendencia y pareja, así como a individuos de otras especies. La memoria y reconocimiento social en ratones es fundamental para mantener el orden jerárquico, así como para guiar su comportamiento ante diferentes estímulos sociales.

Existen numerosas regiones cerebrales implicadas en el comportamiento y memoria social, como el hipocampo, la corteza o la amígdala, entre otras (Blázquez et al., 2019; Butman, 2001).

1.2.1 Regiones cerebrales implicadas en jerarquía y memoria social

Numerosos estudios han tratado de identificar las regiones cerebrales que se activan durante la formación de la estructura jerárquica social, estrechamente vinculada con la memoria social, como hemos descrito anteriormente.

La mayoría de información relacionada con jerarquía y dominancia social es procesada por la **corteza prefrontal** (PFC del inglés *Prefrontal Cortex*). La corteza prefrontal es el principal centro de control conductual ejecutivo y está implicado en el reconocimiento social y del estatus social, la memoria social o el cumplimiento de normas sociales, entre otros. En roedores, PFC se divide en la parte dorsal, que incluye el córtex cingulado y la corteza prelímbica, y en la parte ventral, a la que pertenece la corteza infralímbica. Lesiones en diferentes regiones de PFC se han relacionado con alteraciones en la conducta social y orden jerárquico. En roedores, lesiones en el córtex cingulado causaron una reducción de la memoria social y un menor interés por otros roedores (Wang et al., 2014).

Otro centro importante que se encarga de procesar información relacionada con el estatus social es la **amígdala**. La amígdala se encarga de procesar estímulos socioemocionales como las expresiones faciales y conecta de forma directa y recíproca con PFC a través del núcleo basolateral de la amígdala. También, existe una conexión recíproca entre el PFC y el **hipotálamo**, implicado así en la regulación del comportamiento competitivo y de dominancia social (Wang et al., 2014).

Muchos estudios sobre neuroquímica de la memoria social se han centrado en los “neuropéptidos sociales”, señalando a la oxitocina (OT) y la arginina vasopresina (AVP)

como los principales neuropéptidos implicados en memoria social. Tanto OT como AVP se producen principalmente en el **núcleo paraventricular** (PVN del inglés *Paraventricular Nucleus*) y en el núcleo supraóptico del hipotálamo, así como en otros sitios extra-hipotalámicos. Numerosos estudios han señalado la implicación de estos neurotransmisores en el comportamiento social de los roedores (van der Kooij y Sandi, 2012).

El **hipocampo** es una estructura necesaria para el procesamiento de recuerdos sociales y juega un papel esencial en memoria social, pero también en memoria emocional y espacial. El hipocampo está organizado en el giro dentado y en *Cornu Ammonis* subdividido en tres áreas: CA1, CA2 y CA3. Estas áreas se han convertido en el foco de numerosas investigaciones relacionadas con codificación y recuperación de la memoria. Recientemente, se ha definido a CA2 como una región altamente implicada en procesos cognitivos, con una gran participación en el reconocimiento social (Tzakis y Holahan, 2019).

La **corteza piriforme** se ha identificado como una región cerebral también involucrada en el reconocimiento social (van der Kooij y Sandi, 2012). En estudios anteriores, al exponer a un ratón macho a una hembra o a un ratón más joven (Richter et al., 2005), estos mostraron una activación de cFos en numerosas regiones cerebrales, incluyendo la corteza piriforme, confirmando así, la implicación de esta región en el reconocimiento social. Además, la corteza piriforme participa en la percepción y discriminación de los olores.

1.3 Memoria olfativa

Los olores son estímulos poderosos que pueden evocar estados emocionales y apoyar el aprendizaje y la memoria. De hecho, el olfato está involucrado de manera crucial en los comportamientos esenciales para la supervivencia del individuo y la especie, incluida la identificación de depredadores, el reconocimiento de individuos para la procreación o la jerarquía social, la ubicación de la comida o el apego entre parejas de apareamiento. Esta amplia función de los olores parece muy conservada en todas las especies (Sullivan et al., 2015).

1.3.1 Regiones cerebrales implicadas en percepción y memoria olfativa

Algunos mamíferos, entre ellos los roedores, poseen tanto un bulbo olfatorio principal como un órgano vomeronasal (VNO del inglés *Vomeronasal Organ*). Estos órganos proporcionan funciones sensoriales similares pero separadas. El bulbo olfatorio principal detecta olores en el aire, mientras que el VNO detecta olores en fase fluida, como las feromonas (Bind et al., 2011).

La corteza olfatoria recibe información directa del **bulbo olfatorio principal**, asociado con la detección de olores en el aire. La mayoría de las áreas de la corteza olfatoria a su vez

retroalimentan al bulbo olfatorio. La **corteza piriforme** forma parte de la corteza olfatoria y participa en la discriminación más básica de los olores. Las neuronas corticales piriformes responden a olores específicos y apoyan el aprendizaje perceptivo, es decir, no solo pueden responder de manera diferencial a la calidad del olor, sino que también pueden responder de manera diferente al significado aprendido del olor (Wilson et al.,2014).

La detección de olores en fase fluida, entre ellos, las feromonas y las proteínas urinarias mayores, está mediada por el **órgano vomeronasal** y posteriormente por el **sistema olfativo accesorio**. Las señales del VNO viajan al bulbo olfatorio accesorio y luego a la amígdala. Desde aquí, la información se envía al hipotálamo, lo que produce cambios en la señalización endocrina (Bind et al.,2011). Para la detección específica de compuestos no volátiles, como es el caso de las proteínas urinarias mayores, se requiere un contacto nasal directo con estos componentes.

1.4 Papel de la orina en conducta social

En los ratones, la información sobre el contexto social y la identidad del individuo a menudo se transmite a través de señales quimiosensoriales presentes en la orina. Estas señales presentes en la orina pueden transmitir información relacionada con el estatus social, la condición reproductiva o la familiaridad, permitiendo así guiar el comportamiento y responder ante dichas señales (Lee et al., 2021). La orina constituye una de las fuentes de feromonas más rica y estudiada. La orina de los ratones macho contiene numerosas señales quimiosensoriales destacando la presencia de feromonas como ESP1, cuya función es mejorar la receptividad sexual femenina, o las proteínas urinarias mayores (Haga et al., 2010).

1.4.1 Feromonas

Las feromonas son señales químicas específicas de una especie que provocan una respuesta en otro individuo de la misma especie. Estos compuestos orgánicos son secretados de forma natural por los seres vivos y pueden ser tanto volátiles como no volátiles. Las feromonas principalmente se transmiten a través de olores en fase fluida que posteriormente se dispersan por el ambiente, como por ejemplo a través de la orina o el sudor. Como hemos mencionado anteriormente, son detectadas por el VNO. Las feromonas están involucradas en una amplia variedad de comportamientos, como la selección de la pareja, el marcaje del territorio, la defensa contra la depredación, la agresividad y otros comportamientos sociales que indican el estatus social (Bind et al., 2011). Por ejemplo, en roedores, se ha visto que las feromonas masculinas pueden inducir la maduración sexual o el bloqueo del embarazo en las hembras (Wang et al., 2011).

1.4.2 Proteínas urinarias mayores

Las proteínas urinarias mayores (MUP del inglés *Major Urine Proteins*) son feromonas masculinas presentes en orina de ratón y el componente no volátil mayoritario de la orina. Los machos dominantes muestran niveles más altos de MUP, especialmente de **MUP20** (denominada darcina), en comparación con los machos subordinados, considerando así a las MUP y, en concreto a MUP20, como feromonas de dominancia potencial debido a su relación con el estatus social en ratones (Guo et al., 2015).

Las MUP son proteínas pertenecientes al grupo de las lipocalinas con un peso molecular de 18-20 kD. Se expresan en el hígado de forma dependiente a los andrógenos y son excretadas en la orina. Están codificadas por 21 genes localizados en el cromosoma 4 (Guo et al., 2015).

Los machos dominantes utilizan MUP y, en concreto, MUP20, para marcar su territorio y señalar el dominio a otros machos, así como para atraer a las hembras. Por lo tanto, la capacidad de distinguir entre la orina de un ratón dominante y uno subordinado tiene un alto valor adaptativo en el contexto de la jerarquía social (Lee et al., 2021). Ratones hembra han demostrado una activación más robusta en la vía olfatoria accesoria ante la exposición de orina dominante frente a orina de subordinado, concluyendo que existen diferencias entre las feromonas de un ratón dominante frente a uno subordinado, como en la concentración de las MUP (Wang et al., 2011; Veyrac et al., 2011). Por tanto, fenómenos sociales como la selección de la pareja por parte de las hembras se pueden ver influenciados por las feromonas y los componentes presentes en la orina.

1.5 Poblaciones celulares relacionadas con memoria social y olfativa

En este trabajo, se cuantificaron una serie de poblaciones celulares localizadas en diferentes regiones cerebrales, los cuales pueden estar involucradas en la formación de la estructura jerárquica, o pueden activarse ante una interacción competitiva, ante la detección de feromonas o ante diferentes eventos relacionados con memoria social u olfativa. En este estudio, se busca estudiar si dichas poblaciones celulares varían en función del rango social del animal y de si a este animal se le expone a diferentes estímulos olfativos, en concreto, a orina procedente de animales dominantes.

Un importante marcador molecular usado de forma generalizada en neurociencia es **cFos**. cFos es una proteína cuya expresión se induce rápidamente dentro de los núcleos neuronales tras la despolarización de la membrana celular. cFos revela la presencia de activación excitadora en respuesta a un estímulo o evento dado. Por tanto, poblaciones celulares con expresión de cFos (cFos+) indican una excitación neuronal ante un estímulo. Sin embargo,

esta técnica puede no capturar todas las neuronas activadas, ya que algunas neuronas no expresan el gen cFos ni permite capturar la inhibición neuronal (Lee et al., 2011).

Otra población de interés es la población celular que expresa **oxitocina** (OT+) debido a su implicación en el comportamiento social de los roedores. La oxitocina es un neurotransmisor peptídico que juega un rol fundamental en variedad de interacciones sociales, participando en el reconocimiento social, el comportamiento agresivo y sexual, o la conducta parental. Ratones KO de oxitocina mostraron un reconocimiento social deteriorado sin alteraciones en las funciones olfativas o cognitivas (van der Kooij y Sandi, 2012). Se trata de un marcador de expresión citoplasmática.

La corteza cerebral está compuesta por neuronas excitadoras (glutamatérgicas) e interneuronas inhibitorias (GABAérgicas) que mantienen el equilibrio entre excitación e inhibición para el correcto funcionamiento de la corteza. La **parvalbúmina** (PV) es una proteína de unión a calcio utilizada como marcador molecular de un grupo específico de interneuronas GABAérgicas de la corteza de roedores (Kawaguchi y Kondo, 2002).

1.6 Trabajo previo de laboratorio y antecedentes

El experimento en el que se centra este trabajo está precedido por experimentos previos realizados en el laboratorio. Estos experimentos estaban basados en la literatura, en la cual se afirmaba que la exposición a componentes no volátiles de la orina (como las feromonas y las MUP) afectaba a ciertas conductas de los ratones, entre ellas las interacciones competitivas (Lee et al., 2017). En la literatura también se ha descrito como la exposición a orina dominante o subordinada, no solo afectaba a la conducta, sino que además se observa una expresión diferencial de cFos en diferentes regiones cerebrales en función del rango social y del tipo orina a la que se ha expuesto a los ratones (Lee et al., 2021).

Se llevó a cabo un primer experimento en el cual se estableció el orden jerárquico de ratones de una misma jaula mediante el test del tubo, y, posteriormente, se volvió a testar la jerarquía de dominancia intrajaula, pero colocando en el morro de los ratones subordinados orina procedente de ratones dominantes para evaluar si se alteraba el orden jerárquico ante la exposición de componentes no volátiles procedentes de orina de dominantes. El segundo experimento es similar al anterior, pero en este caso se mezcló la orina de dominantes para obtener un *pool* de orina de dominantes que se colocó a los animales subordinados antes de realizar el test del tubo. Una hora y media después del último día de enfrentamientos, se sacrificaron a los animales para realizar el posterior análisis histológico y ver la activación de cFos y otros marcadores moleculares en diferentes regiones cerebrales. En estos experimentos, no se obtuvieron diferencias significativas en la conducta competitiva de los ratones ante la exposición de orina de dominantes, por lo que se concluyó que la familiaridad

y el reconocimiento social entre los ratones era lo suficientemente fuerte como para mantener inalterada la jerarquía social previamente establecida.

Por ello, se realizó un nuevo experimento, que se detalla más en profundidad posteriormente, con los animales objeto de esta investigación para evaluar el efecto de la orina sobre la jerarquía y rango social en ratones sin contacto previo ni familiaridad entre ellos. En este experimento, tras establecer el orden jerárquico de los ratones mediante el test del tubo, se realizaron enfrentamientos entre ratones del mismo rango de dominancia y de diferentes jaulas (enfrentamientos interjaulas), asegurando así que estos ratones no hubiesen convivido previamente. Además, en estos enfrentamientos, a uno de los ratones se le colocó en el morro una mezcla de orina de los animales dominantes, y al otro, se le colocó su propia orina como control. Se observó que los ratones subordinados expuestos a la orina dominante aumentaron su número de victorias en el test del tubo frente a los ratones subordinados expuestos a orina control. En el resto de los rangos de dominancia (dominantes, intermedios 2 e intermedios 3) no hubo diferencias significativas en el número de victorias entre los animales expuestos a orina control y a orina dominante. (Figura 3).

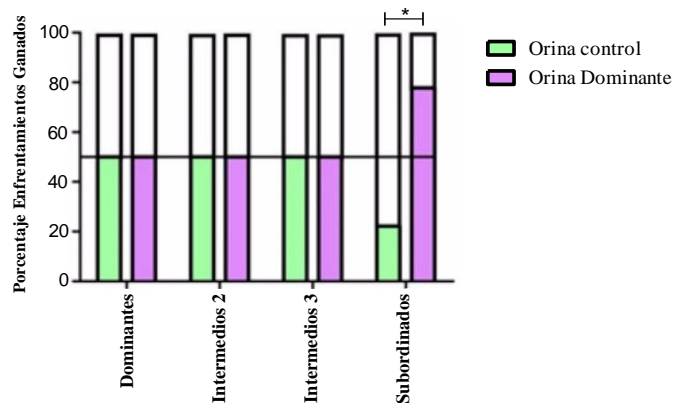


Figura 3. Porcentaje de enfrentamientos ganados en los enfrentamientos interjaulas entre animales con el mismo rango de dominancia. Se representa en color verde a los ratones a los que se les colocó su propia orina como control y en color morado, a los que se les colocó orina dominante. La línea horizontal representa el 50% de los enfrentamientos ganados. Los efectos intergrupos se muestran como * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Se observan diferencias significativas entre los grupos orina control y orina dominante en los enfrentamientos de subordinados.

Lo llamativo de los resultados obtenidos es que solo los ratones subordinados expuestos a orina dominante cambiaron su conducta aumentando el número de victorias en los enfrentamientos. Tras observar dichas diferencias en la interacción competitiva de los ratones en función del rango y de la exposición a orina control y orina dominante, este trabajo se centró en estudiar qué poblaciones celulares podían estar detrás de dichas diferencias conductuales. Por tanto, se cuantificaron y evaluaron distintas poblaciones celulares en diversas regiones cerebrales de los animales del experimento para observar si existían

diferencias en dichas poblaciones en función del rango social del ratón y de la exposición a orina.

1.7 Objetivos

- **Objetivo 1:** Identificar si existen diferencias en poblaciones celulares de diferentes regiones cerebrales de los ratones en función del rango social del animal y de la exposición a orina control u orina dominante, pudiendo así explicar las diferencias encontradas a nivel de conducta y de interacciones competitivas.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Animales

Para la realización de los experimentos y ensayos inmunohistoquímicos llevados a cabo en este trabajo, se utilizaron 22 ratones macho de la cepa C57/BL6J de entre 8 - 14 semanas de edad, estabulados en un ambiente higiénico, con ciclos de luz/oscuridad adecuados (12h/12h), condiciones estables de temperatura y humedad y con libre acceso a pienso y agua. Todos los ensayos y procedimientos realizados en los animales que forman parte de la investigación de este trabajo cumplen la normativa vigente de la Unión Europea (Directiva 2010/63/UE), de España (Real Decreto 53/2013) y han sido aprobados por el comité de ética y experimentación del CSIC (27/07/2016-448/2016).

2.2 Diseño experimental

En este experimento se emplearon 22 ratones macho y se organizaron en 6 jaulas (4 jaulas con 4 ratones y 2 jaulas con 3 ratones). Se estableció la jerarquía social de cada jaula mediante el test del tubo, clasificándolos en dominantes, intermedios 2, intermedios 3 y subordinados según el número de victorias ganadas por cada animal en los enfrentamientos realizados acorde con el índice de dominancia (**anexo A, Figura Complementaria 1**). Para ello, se enfrentaron a todos los ratones de una misma jaula entre ellos y se repitieron los enfrentamientos durante unos 7-15 días para comprobar que la jerarquía era estable en el tiempo. Se calculó el índice de dominancia de cada individuo como la media de victorias ganadas al día por cada ratón. A estos enfrentamientos se les denominó enfrentamientos intrajaulas. Después, se recogió la orina de los ratones durante una semana. Se obtuvo un *pool* de orina de dominantes al mezclar la orina procedente de todos los ratones clasificados como dominantes. A continuación, se llevó a cabo un segundo test del tubo, en el cual se enfrentaron durante 2 días consecutivos a ratones de distintas jaulas con un mismo rango de dominancia (dominante contra dominante, intermedio contra intermedio y subordinado contra subordinado) que no habían tenido contacto previo y no habían convivido en la misma jaula. A estos enfrentamientos se les denominó enfrentamientos interjaulas. Además, en estos enfrentamientos, a uno de los ratones se le colocó en el morro la orina del *pool* de dominantes y al otro se le colocó como control su propia orina para testar la influencia de la orina en la conducta competitiva de ratones que no habían tenido contacto previo y, por tanto, en los que no influía la familiaridad y el reconocimiento social.

Una hora y media después del último enfrentamiento interjaula, se sacrificaron y perfundieron a los animales, para poder realizar el posterior análisis histológico (**Figura 4**) y evaluar la expresión de tres marcadores moleculares de poblaciones celulares, cFos, oxitocina y parvalbúmina, en distintas regiones cerebrales. La expresión de cFos y parvalbúmina se

estudió en la corteza prefrontal y la corteza piriforme, mientras que la expresión de cFos y oxitocina se estudió en el núcleo paraventricular.

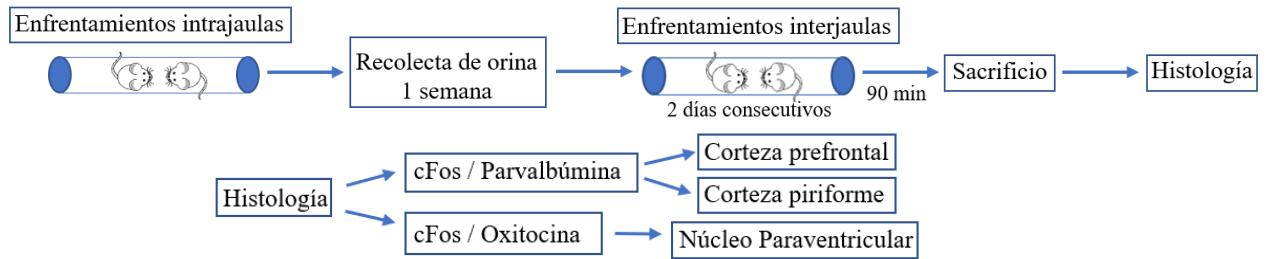


Figura 4. Esquema ilustrativo del diseño experimental.

2.3 Tratamiento del tejido para su análisis histológico

Los cerebros de los animales fueron cortados a lo largo del eje rostro-caudal utilizando el vibratomo (VT-1000s, Leica), obteniéndose secciones coronales del hemisferio derecho e izquierdo de un grosor de 50 μm . Estas secciones se depositaron individualmente en 44 placas de ensayo (una placa por animal y hemisferio) de 96 pocillos (FalconTM) rellenas con PB 0.1M. De cada hemisferio se obtuvieron aproximadamente 8 series de 15-18 cortes cada una. Posteriormente, se les añadió azida a las placas de ensayo, un estabilizante y agente antibacteriano usado para mantener la estabilidad de las muestras.

2.4 Análisis inmunohistoquímico

Se realizó el análisis inmunohistoquímico con los cortes cerebrales. Para ello se llevaron a cabo dos ensayos inmunohistoquímicos diferentes. En el primer ensayo, se incubaron los cortes con los anticuerpos primarios cFos y parvalbúmina, y en el segundo, con los anticuerpos primarios cFos y oxitocina (**anexo B, Tabla Complementaria 1**). En el primer ensayo, se utilizó una serie completa de cortes de uno de los hemisferios por cada animal, mientras que, en el segundo ensayo, se utilizó una columna intercalada de cortes procedentes de los dos hemisferios por cada animal. Debido a la dificultad de la preservación de la región cerebral a estudiar en el segundo ensayo, el núcleo paraventricular, se utilizaron cortes procedentes de los dos hemisferios cerebrales.

Los cortes se depositaron en los pocillos de la placa y se llevó a cabo la preincubación de los cortes con medio PBT-BSA (PB 0,1 con Triton X-100 al 0.3% y con BSA al 10%) durante 5 minutos en agitación. A continuación, se añadió el anticuerpo primario (**anexo B, Tabla Complementaria 1**) diluido en PBT-BSA a la concentración estimada en cada caso y se incubó a temperatura ambiente en agitación durante 1 hora. Después, se incubó durante 72 horas en la cámara fría (4°) en agitación. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se lavó la muestra 5 veces con PBT-BSA y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo (**anexo B, Tabla Complementaria 1**) diluido en

PBT-BSA a una concentración de 1:1000 durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación y en condiciones de oscuridad. Posteriormente, se incubó en cámara fría durante 24 horas. Tras la incubación con el anticuerpo secundario, se lavó la muestra 3 veces con PB 0.1 y se incubó con DAPI diluido en PB 0.1 a una concentración 1:1000 durante 12 minutos en agitación a temperatura ambiente. Seguidamente, se lavó otras 3 veces más con PB 0.1 y se procedió al montaje de los cortes en los portaobjetos.

2.5 Imagen y métodos estereológicos

Se tomaron fotografías de los cortes con el microscopio confocal directo (Leica TCS SP5) aplicando un disector físico en U, según el método descrito previamente en el laboratorio (Llorens-Martín et al., 2006).

De la **corteza piriforme**, se tomaron 9-11 bloques o *stacks* de fotografías por animal abarcando todo el grosor del corte. El bloque o conjunto de fotografías de los diferentes planos tomados en una posición espacial concreta es lo que llamamos *stack*. Utilizamos un microscopio confocal directo (Leica TCS SP5), un objetivo de inmersión de 20x, 2.5 de zoom, 2.01 μm de “*step size*” (distancia entre dos imágenes consecutivas) y una resolución de 1024x1024 píxeles (**Figuras 5A, 6A**). Las imágenes fueron tomadas de diferentes secciones de la corteza piriforme rostral (que abarca desde que se acaba el bulbo olfatorio hasta que empieza hipocampo). En los cortes más rostrales donde todavía no aparece cuerpo calloso, cogemos un *stack* al azar de la estructura, pero conforme avanzamos en el eje rostro-caudal, al hacerse la estructura mucho más grande, cogemos 2 bloques por corte al azar.

En el caso de la **corteza prefrontal**, se tomaron 11-14 *stacks* por animal, abarcando todo el grosor del corte utilizando un microscopio confocal directo (Leica TCS SP5), con un objetivo de inmersión de 40x, 1 de zoom, 2.01 μm de “*step size*” y una resolución de 1024x1024 píxeles (**Figuras 5B, 6B**). En los cortes más rostrales en los que aún no aparece cuerpo calloso, se tomaron 3 *stacks* por corte, siendo estos *stacks* denominados “rostrales”. En cuanto a los “mediales”, en los que podemos encontrar las 3 capas principales de prefrontal (prelímica, límbica y cingulado) sacamos 2 *stacks* por corte, y de los cortes más “caudales”, en los que sólo tenemos cingulado, 1 único bloque de fotos.

En el **núcleo paraventricular**, se tomaron entre 5-8 *stacks* por animal, abarcando todo el grosor del corte, utilizando un microscopio confocal directo (Leica TCS SP5), un objetivo de inmersión de 20x, 1 de zoom, 2.01 μm de “*step size*” y una resolución de 1024x512 píxeles (**Figuras 5C, 6C**). Solo se tomó un *stack* por corte, pues abarcaba todo el núcleo.

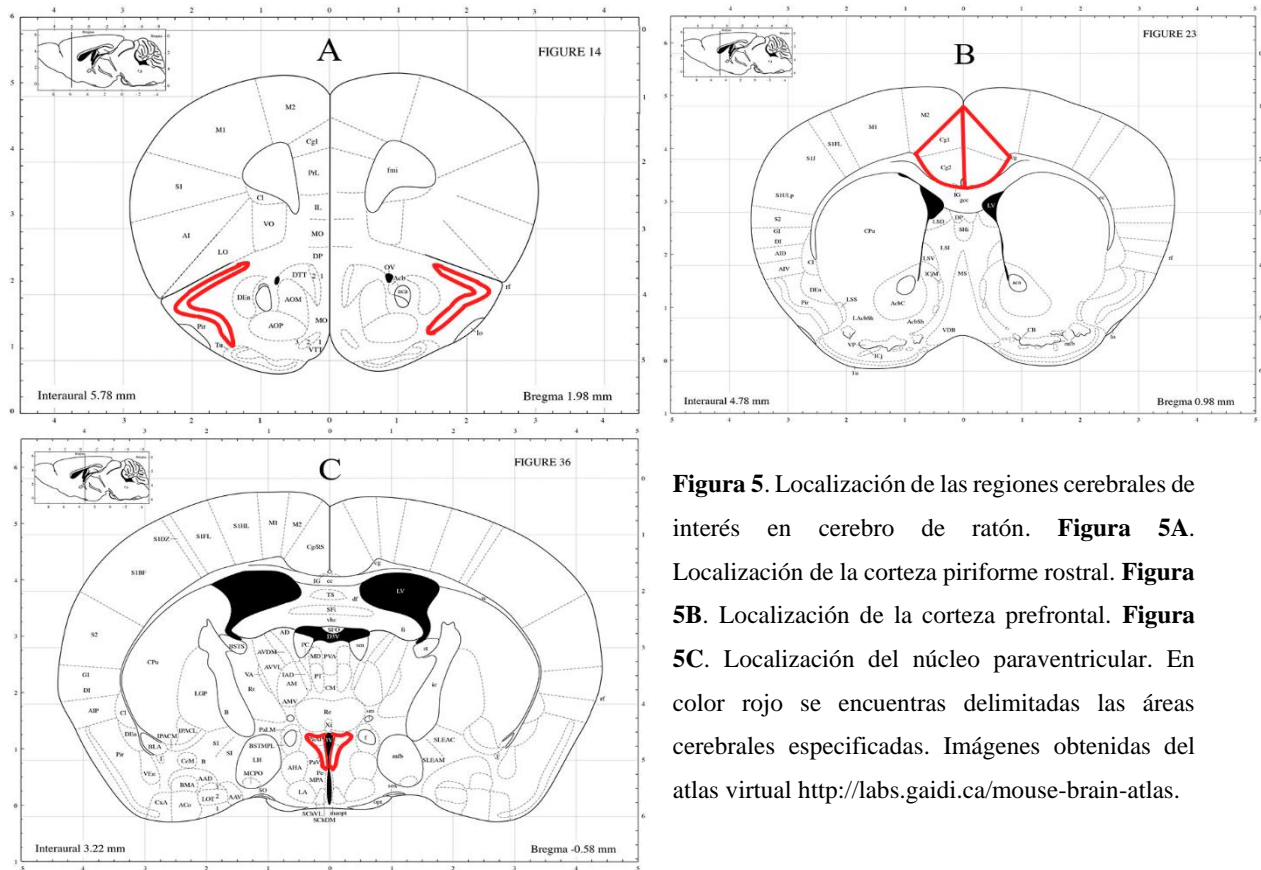


Figura 5. Localización de las regiones cerebrales de interés en cerebro de ratón. **Figura 5A.** Localización de la corteza piriforme rostral. **Figura 5B.** Localización de la corteza prefrontal. **Figura 5C.** Localización del núcleo paraventricular. En color rojo se encuentran delimitadas las áreas cerebrales especificadas. Imágenes obtenidas del atlas virtual <http://labs.gaidi.ca/mouse-brain-atlas>.

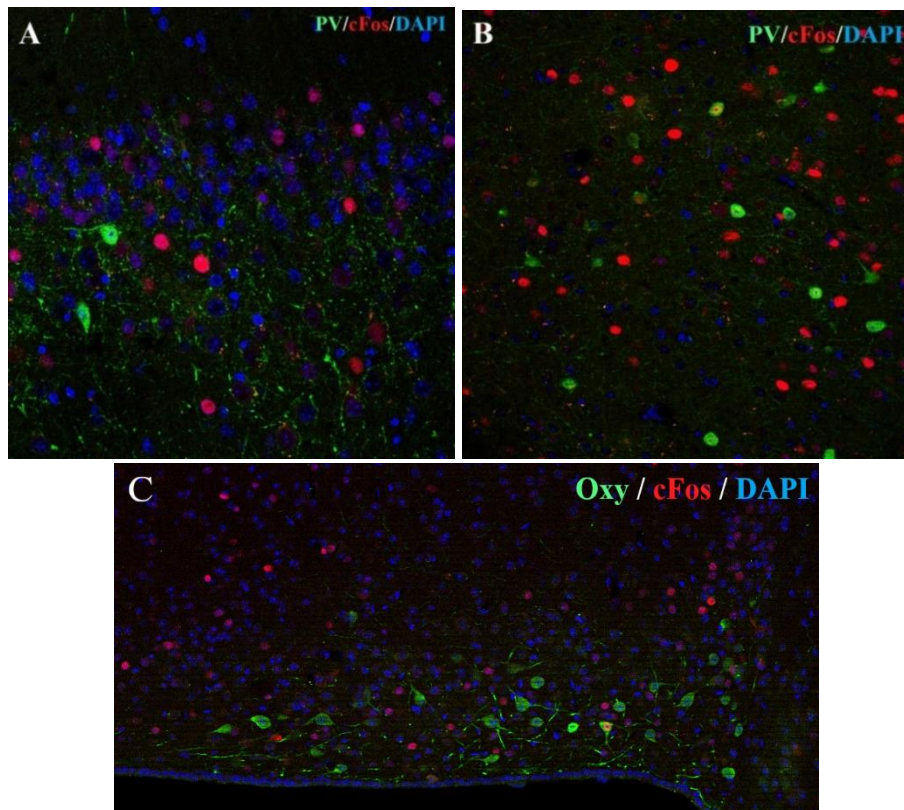


Figura 6. Fotografías tomadas en microscopio confocal de las diferentes regiones cerebrales. **Figura 6A.** Fotografía de la corteza piriforme. PV se encuentra marcado en verde, cFos en rojo y DAPI en azul. **Figura 6B.** Fotografía de la corteza prefrontal. PV se encuentra marcado en verde, cFos en rojo y DAPI en azul.

Figura 6C. Fotografía del núcleo paraventricular. Oxitocina se encuentra marcada en verde, cFos en rojo y DAPI en azul.

Una vez obtenidas todas las imágenes, se procedió a realizar el conteo mediante un recuento ciego simple utilizando el software *ImageJ* de *Fiji*. Para ello, se analizaron todas las imágenes de cada *stack*, desplazándose por el eje *z*, evaluando por un lado el canal 594nm (rojo: marca cFos), por otro el canal 488nm (verde: marca PV u oxitocina), y por último ambos canales juntos en combinación con el canal 633nm (azul: marca DAPI). De esta forma, se obtuvo el contaje total de células cFos positivas, las células PV positivas y las células dobles cFos/PV positivas en corteza prefrontal y corteza piriforme, así como las células cFos positivas, las células OT positivas y las células dobles cFos/OT positivas en el núcleo paraventricular.

Los **critérios** que se aplicaron para considerar una célula positiva fueron los siguientes:

- Ninguno de los tipos celulares analizados debía tocar ningún borde de exclusión de la fotografía.
- En el caso de la corteza prefrontal y piriforme, se excluyeron las dos últimas fotografías de cada *stack*, y en el núcleo paraventricular, se excluyó la primera fotografía. Esta exclusión se llevó a cabo porque la fotografía elegida estaba incompleta y no se podía realizar el conteo celular en esa imagen.
- El marcaje debía estar presente al menos en 3 de las imágenes del *stack*.
- Como la identificación de las células cFos positivas (cFos+) puede ser dudosa debido a la variabilidad de la intensidad del marcaje según la célula, se elaboró un método para establecer un umbral de detección de células cFos+. En cada animal, se seleccionó una célula claramente cFos+ y se midió su intensidad de señal. Se calculó la media de la intensidad de señal entre los animales de una misma jaula y se calculó la desviación estándar asociada. El umbral se estableció al restar a la media la desviación estándar calculada. Aquellas células con un valor de intensidad de cFos igual o superior al umbral establecido en cada jaula se consideraron positivas.

Una vez obtenido el número total de células de cada población (cFos+ // PV+ // cFos+ PV+ OT+ // cFos+ OT+), se estimó la densidad de cada *stack* de imágenes.

Las dimensiones de la fotografía (*x* e *y*) en el caso de la corteza piriforme son de 310x310µm, en la corteza prefrontal son de 387,5x387,5µm y en el núcleo paraventricular son de 775x387,12µm. El grosor total del corte tomado determina la longitud de *z*, el cual varía de un *stack* a otro. Al multiplicar “*x*” “*y*” “*z*”, obtendremos el volumen en el cual hemos hecho el contaje celular.

Al dividir el número de células contadas en ese *stack* entre el volumen obtendremos la **densidad celular**.

$$\text{Densidad celular} = \frac{(\text{Número total de Células})}{(\text{Volumen del bloque})}$$

Una vez calculada la densidad celular de cada bloque, se calculó la media de las densidades celulares de cada individuo para cada población celular. Al no tener el volumen total de nuestras estructuras de interés, los datos se dieron como **Media de Densidad celular de “X”** en células/mm³. En la **Tabla 1** se muestran las densidades celulares estudiadas para cada región cerebral.

Tabla 1. Densidades celulares estudiadas en cada una de las regiones cerebrales.

Regiones cerebrales	Densidades celulares estudiadas		
Núcleo Paraventricular	Densidad celular OT+	Densidad celular cFos+	Densidad celular OT/cFos+
Corteza Prefrontal	Densidad celular PV+	Densidad celular cFos+	Densidad celular PV/cFos+
Corteza Piriforme	Densidad celular PV+	Densidad celular cFos+	Densidad celular PV/cFos+

2.6 Análisis estadístico

El análisis de datos se llevó a cabo mediante el software SPSS Statistics (v.28.0.0). En primer lugar, se valoró que los grupos de datos cumplieran los supuestos del análisis de varianza, es decir, los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. Para ello se aplicó el test Shapiro-Wilk. Además, los datos extremos fueron excluidos del análisis estadístico. En el caso de cumplir con estos supuestos, se llevó a cabo un análisis estadístico paramétrico, un ANOVA de muestras independientes. Por otro lado, en el caso de que los datos no cumplieran la normalidad y homogeneidad de varianza, se llevó a cabo un análisis estadístico no paramétrico, una prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes.

Los resultados se expresaron dependiendo del nivel de significación de los datos, de tal manera que un p-value (p) menor o igual a 0'05 se considera significativo, mientras que un p-value mayor que 0'05 no se considera significativo. Al ser el tamaño muestral de los grupos experimentales reducido, se tuvieron en cuenta las tendencias (p-value mayor que 0,05 y menor que 0,09).

Todos los resultados se expresaron con el error estándar de la media (en inglés *Mean ± SEM*). La significación o diferencias entre individuos del mismo grupo (intragrupales) se expresaron como +p<0'05; ++p<0'01; +++p<0'001; entre individuos de diferentes grupos (intergrupales) se expresan como *p<0'05; **p<0'01; ***p<0'001; y las tendencias se representaron como #p≥0'05<0'09.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Núcleo Paraventricular

En uno de los 22 animales del experimento fue imposible identificar el núcleo paraventricular (PVN) y cuantificar la densidad celular en este, por lo que se excluyó del análisis estadístico, trabajando así con un tamaño muestral total de 21 animales. Se realizaron las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza para los datos de PVN. Se aplicó el test Shapiro-Wilk a las variables dependientes: densidad de células oxitocina positivas (OT+), cFos positivas (cFos+) y células dobles OT/cFos+, en función de las variables independientes de rango social (dominante, intermedio 2, intermedio 3 y subordinado) y de exposición a orina (control o a orina de *pool* dominante) (**Tabla 2**).

Tabla 2. Pruebas de normalidad Shapiro-Wilk para los grupos de datos de PVN. Un nivel de significación menor que 0,05 indica que no se cumple el supuesto de normalidad.

RANGO		Shapiro-Wilk			ORINA		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.			Estadístico	gl	Sig.
OT+	DOMINANTE	0,892	6	0,329	OT+	POOL	0,975	11	0,934
	INTERMEDIO 2	0,805	6	0,066		CONTROL	0,969	10	0,882
	INTERMEDIO 3	0,818	4	0,139	cFos+	POOL	0,877	11	0,095
	SUBORDINADO	0,916	5	0,505		CONTROL	0,863	10	0,083
cFos+	DOMINANTE	0,888	6	0,306	OT/cFos+	POOL	0,825	11	0,020
	INTERMEDIO 2	0,984	6	0,971		CONTROL	0,898	10	0,210
	INTERMEDIO 3	0,791	4	0,086					
	SUBORDINADO	0,918	5	0,520					
OT/cFos+	DOMINANTE	0,705	6	0,007					
	INTERMEDIO 2	0,970	6	0,891					
	INTERMEDIO 3	0,934	4	0,618					
	SUBORDINADO	0,887	5	0,341					

La variable densidad celular OT/cFos+ no cumple el supuesto de normalidad, por lo que su análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test no paramétrico Kruskal-Wallis (**Tabla 3**), mientras que, el resto de las variables (densidad celular OT+ y cFos+) cumplen con el supuesto de normalidad y homogeneidad de varianza, por lo que se aplicó el test paramétrico ANOVA (**Tabla 4**).

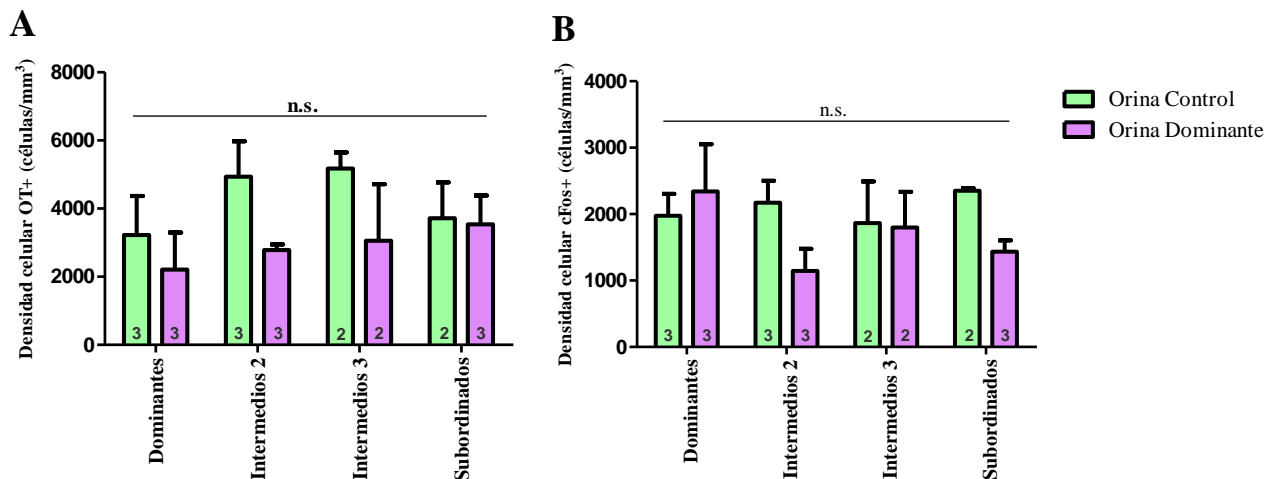
Tabla 3. Test no paramétrico Kruskal-Wallis para muestras independientes de la variable densidad celular OT/cFos+ en PVN. No hay diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales (nivel de significación 0,971>0,05). La distribución de densidad OT/cFos+ es la misma entre los diferentes grupos experimentales.

Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	
N total	21
Estadístico de prueba	1,783
Grado de libertad	7
Sig. asintótica (prueba bilateral)	0,971
Hipótesis nula	La distribución de OT/cFos+ es la misma entre categorías de Rango-Orina
Decisión	Conserve la hipótesis nula

Tabla 4. Test paramétrico ANOVA de muestras independientes para las variables densidad celular OT+ y cFos+ en PVN. Se realizó un ANOVA multivariante con dos factores fijos que evaluó el efecto del rango social y la exposición a orina sobre la densidad celular, así como la interacción entre los niveles de los factores. Se observó una tendencia ($p=0,081$) en el factor ORINA sobre la densidad OT+, por lo que podría existir un efecto de la exposición a orina sobre la densidad celular OT+. El resto de los datos no fueron significativos ($p>0,05$), por lo que no se puede afirmar que exista un efecto del rango social y de la exposición a orina sobre la densidad celular cFos+, ni un efecto del rango sobre la densidad OT+ en PVN. Tampoco hubo una interacción estadísticamente significativa entre el factor rango y la exposición a orina sobre la densidad celular.

ANOVA							
Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado
RANGO	OT+	6062557,134	3	2020852,378	0,769	0,532	0,151
	cFos+	768145,990	3	256048,663	0,511	0,682	0,105
ORINA	OT+	9427360,693	1	9427360,693	3,586	0,081	0,216
	cFos+	852096,869	1	852096,869	1,700	0,215	0,116
RANGO * ORINA	OT+	3362306,438	3	1120768,813	0,426	0,737	0,090
	cFos+	1905249,482	3	635083,161	1,267	0,327	0,226
Error	OT+	34178522,163	13	2629117,089			
	cFos+	6517255,851	13	501327,373			
Total	OT+	313743008,289	21				
	cFos+	83432993,049	21				
Total corregido	OT+	53229628,496	20				
	cFos+	10112684,628	20				

Se analizaron las comparaciones por parejas del test ANOVA (**Anexo C, Tabla Complementaria 2**). No se observaron diferencias significativas entre ningún grupo experimental. En la **figura 7** se representó la densidad de cada población celular (OT+, cFos+ y células dobles OT/cFos+) del PVN en función del rango social de los individuos (dominantes, intermedios 2, intermedios 3 y subordinados) y en función de la exposición a orina control o a orina de *pool* dominante. En verde se representa el grupo expuesto a orina control, mientras que en morado se representa al grupo expuesto a orina de dominante. La densidad celular viene dada en células/mm³.



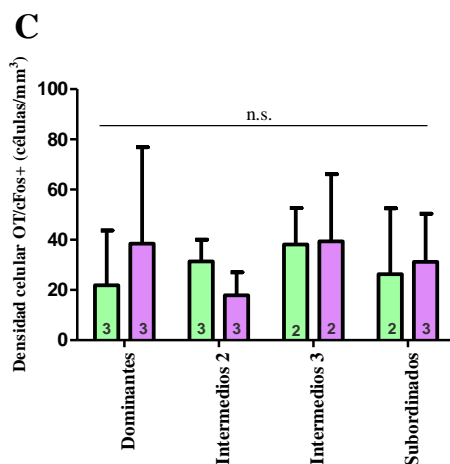


Figura 7. Densidades celulares de PVN en función del rango social y de la exposición a orina control u orina dominante. Las barras representan la media de la densidad celular y las barras de error representan el SEM. El número localizado en el interior de las barras indica el tamaño muestral de cada grupo experimental. **Figura 7A.** Densidad celular OT+ de PVN. Se realizó el test ANOVA previamente descrito. No se observaron diferencias significativas (n.s.) entre los grupos experimentales. **Figura 7B.** Densidad celular cFos+ de PVN. Se realizó el test ANOVA previamente descrito. No se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales. **Figura 7C.** Densidad celular OT/cFos+ de PVN. Se realizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis previamente descrita. No se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales.

3.2 Corteza Prefrontal

Las densidades poblaciones de esta región cerebral pudieron ser cuantificadas en los 22 animales del experimento. Se evaluaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza para los grupos de datos de PFC. Se aplicó el test Shapiro-Wilk a las variables dependientes: densidad celular parvalbúmina positivas (PV+), cFos+ y células dobles PV/cFos+, en función del rango social (dominante, intermedio 2, intermedio 3 y subordinado) y de la exposición a orina control o a orina de *pool* dominante (**Tabla 5**).

Tabla 5. Pruebas de normalidad Shapiro-Wilk para los grupos de datos de PFC. Un nivel de significación menor que 0,05 indica que no se cumple el supuesto de normalidad.

RANGO		Shapiro-Wilk			ORINA		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.			Estadístico	gl	Sig.
PV+	DOMINANTE	0,856	6	0,176	POOL	0,943	11	0,554	
	INTERMEDIO 2	0,942	6	0,676		CONTROL	0,914	11	0,273
	INTERMEDIO 3	0,937	4	0,633	cFos+	POOL	0,792	11	0,007
	SUBORDINADO	0,876	6	0,250		CONTROL	0,951	11	0,660
cFos+	DOMINANTE	0,920	6	0,506	PV/cFos+	POOL	0,906	11	0,217
	INTERMEDIO 2	0,881	6	0,275		CONTROL	0,939	11	0,511
	INTERMEDIO 3	0,903	4	0,446					
	SUBORDINADO	0,796	6	0,054					
PV/cFos+	DOMINANTE	0,924	6	0,536					
	INTERMEDIO 2	0,956	6	0,785					
	INTERMEDIO 3	0,712	4	0,016					
	SUBORDINADO	0,850	6	0,157					

Las variables densidad celular PV/cFos+ y cFos+ no cumplen los supuestos de normalidad, por lo que para su análisis estadístico se llevó a cabo un test no paramétrico Kruskal-Wallis (**Tabla 6**), mientras que la densidad celular PV+ cumple con el supuesto de normalidad y homogeneidad de varianza, por lo que se aplicó el test paramétrico ANOVA (**Tabla 7**).

Tabla 6. Test no paramétrico Kruskal-Wallis para muestras independientes de las variables densidad celular cFos+ y PV/cFos+ de PFC. No hay diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales (nivel de significación >0,05). La distribución de densidad celular cFos+ y Pv/cFos+ es la misma entre los diferentes grupos experimentales.

Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes		
	cFos+	PV/cFos+
N total	22	22
Estadístico de prueba	8,083	6,747
Grado de libertad	7	7
Sig. asintótica (prueba bilateral)	0,325	0,456
Hipótesis nula	La distribución de cFos+ es la misma entre categorías de Rango-Orina	La distribución de PV/cFos+ es la misma entre categorías de Rango-Orina
Decisión	Conserve la hipótesis nula	Conserve la hipótesis nula

Tabla 7. Test paramétrico ANOVA de muestras independientes para la variable densidad celular PV+ en PFC. Se realizó un ANOVA univariado con dos factores fijos que evaluó el efecto del rango y la exposición a orina sobre la densidad celular PV+, así como la interacción entre los niveles de los factores. Al no ser ninguno de los datos significativos ($p > 0,05$) no se puede afirmar que existe un efecto del rango social y de la exposición a orina sobre la densidad celular PV+ en PFC. Tampoco hubo una interacción estadísticamente significativa entre el factor rango y la exposición a orina sobre la densidad celular PV+.

ANOVA						
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado
RANGO	2521333,341	3	840444,447	0,271	0,845	0,055
ORINA	6732246,189	1	6732246,189	2,172	0,163	0,134
RANGO * ORINA	6940996,047	3	2313665,349	0,747	0,542	0,138
Error	43386703,101	14	3099050,222			
Total	756756636,371	22				
Total corregido	60781298,835	21				

Pese a que no se pudo afirmar que existiese un efecto del rango y la exposición a orina sobre la densidad celular PV+ en la corteza prefrontal, se analizaron las comparaciones por parejas del test ANOVA (**Anexo C, Tabla Complementaria 3**). Se observó una tendencia ($p = 0,056$) dentro del rango Intermedios 2 entre los expuestos a orina control y los expuestos a orina dominante en la densidad celular PV+ de la corteza prefrontal. En la **figura 8** se representó la densidad de cada población celular (PV+, cFos+ y células dobles PV/cFos+) de PFC en

función del rango social de los individuos y en función de la exposición a orina control o a orina de dominantes. La densidad celular viene dada en células/mm³.

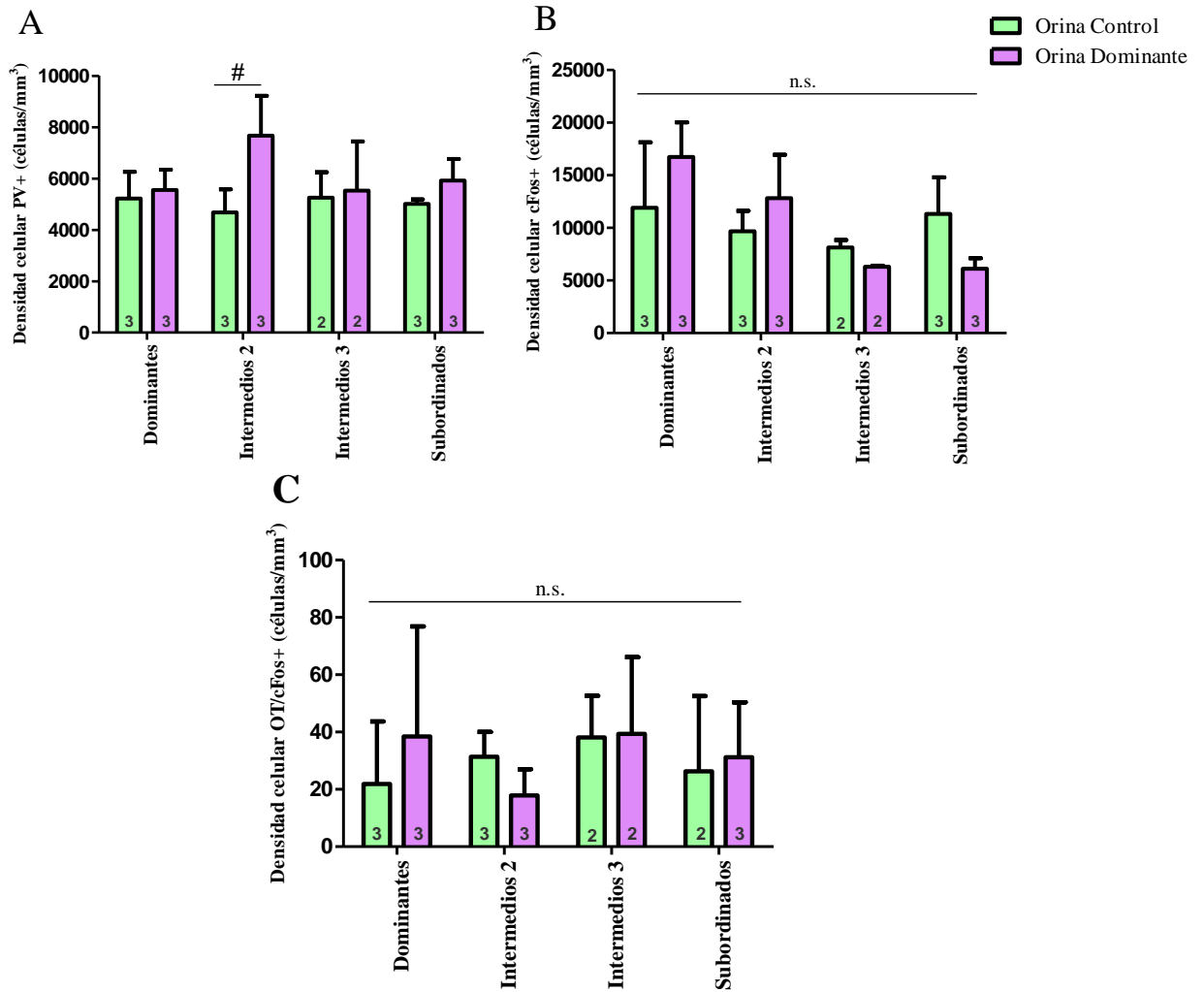


Figura 8. Densidades celulares en PFC en función del rango social y de la exposición a orina control u orina dominante. Las barras representan la media de la densidad celular y las barras de error representan el *SEM*. El número localizado en el interior de las barras indica el tamaño muestral de cada grupo. **Figura 8A.** Densidad celular PV+ en PFC. Se realizó el test ANOVA previamente mencionado. Se observó una tendencia ($p=0,056$) dentro del grupo de los intermedios 2 entre los expuestos a orina control y los expuestos a orina dominante. **Figura 8B.** Densidad celular cFos+ en PFC. Se realizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis previamente mencionada. No se observaron diferencias significativas (n.s.) entre los grupos experimentales. **Figura 8C.** Densidad celular PV/cFos+ en PFC. Se realizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. No se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales.

3.3 Corteza Piriforme

En 3 de los 22 animales del experimento no se pudo realizar el conteo celular en piriforme y, por tanto, no se obtuvo la densidad celular en esta región cerebral. Estos animales fueron excluidos del análisis estadístico, trabajando con un tamaño muestral total de 19 animales. Con los restantes datos, se realizaron las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza.

Se aplicó el test Shapiro-Wilk a las variables dependientes: densidad celular PV+, cFos+ y células dobles PV/cFos+ en función de las variables independientes de rango social y de exposición a orina control o a orina de *pool* dominante (**Tabla 8**).

Tabla 8. Pruebas de normalidad Shapiro-Wilk para los grupos de datos de la corteza piriforme. Un nivel de significación menor que 0,05 indica que no se cumple el supuesto de normalidad.

RANGO		Shapiro-Wilk			ORINA		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.			Estadístico	gl	Sig.
PV+	DOMINANTE	0,960	4	0,781	PV+	POOL	0,962	11	0,794
	INTERMEDIO 2	0,934	6	0,610		CONTROL	0,933	8	0,541
	INTERMEDIO 3	0,818	3	0,157	cFos+	POOL	0,894	11	0,154
	SUBORDINADO	0,944	6	0,694		CONTROL	0,930	8	0,515
cFos+	DOMINANTE	0,974	4	0,865	PV/cFos+	POOL	0,846	11	0,037
	INTERMEDIO 2	0,902	6	0,388		CONTROL	0,817	8	0,043
	INTERMEDIO 3	0,864	3	0,278					
	SUBORDINADO	0,801	6	0,059					
PV/cFos+	DOMINANTE	0,799	4	0,100					
	INTERMEDIO 2	0,835	6	0,119					
	INTERMEDIO 3	0,750	3	0,000					
	SUBORDINADO	0,870	6	0,227					

La variable densidad celular PV/cFos+ no cumple el supuesto de normalidad para todos sus datos, por lo que para su análisis estadístico se llevó a cabo un test no paramétrico Kruskal-Wallis (**Tabla 9**), mientras que, el resto de las variables (densidad celular PV+ y cFos+) cumplen con el supuesto de normalidad y homogeneidad de varianza por lo que se aplicó el test paramétrico ANOVA (**Tabla 10**).

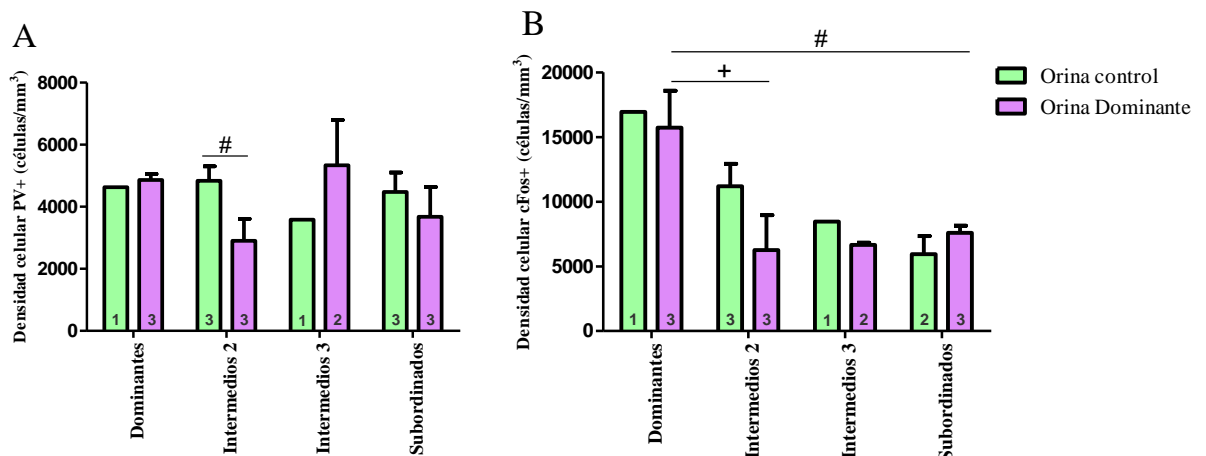
Tabla 9. Test no paramétrico Kruskal-Wallis para muestras independientes de la variable densidad celular PV/cFos+ en la corteza piriforme. No hay diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales (nivel de significación 0,450>0,05). La distribución de densidad PV/cFos+ es la misma entre los diferentes grupos experimentales.

Prueba de Kruskal-Wallis de muestras independientes	
N total	19
Estadístico de prueba	6,8
Grado de libertad	7
Sig. asintótica (prueba bilateral)	0,450
Hipótesis nula	La distribución de PV/CFOS+ es la misma entre categorías de Rango-Orina
Decisión	Conserve la hipótesis nula

Tabla 10. Test paramétrico ANOVA de muestras independientes para las variables densidad celular PV+ y cFos+ en la corteza piriforme. Se realizó un ANOVA multivariante con dos factores fijos que examinó el efecto del rango y la exposición a orina sobre la densidad celular PV+ y sobre la densidad celular cFos+, así como la interacción entre los niveles de los factores. Se observó una diferencia significativa ($p=0,018$) en el factor RANGO sobre la densidad celular cFos+, por lo que podría existir un efecto del rango sobre la densidad celular cFos+ en piriforme. El resto de los datos no fueron significativos, por lo que no se puede afirmar que existe un efecto del rango social y de la exposición a orina sobre la densidad celular PV+ en piriforme, así como no se puede afirmar que existe un efecto de la exposición a orina sobre la densidad celular cFos+. Tampoco hubo una interacción estadísticamente significativa entre los efectos del rango y la exposición a orina sobre las densidades celulares.

ANOVA							
Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado
RANGO	PV+	1756811,626	3	585603,875	0,390	0,763	0,105
	cFos+	189102771,022	3	63034257,007	5,398	0,018	0,618
ORINA	PV+	372525,455	1	372525,455	0,248	0,629	0,024
	cFos+	9166411,753	1	9166411,753	0,785	0,396	0,073
RANGO * ORINA	PV+	7386613,286	3	2462204,429	1,639	0,242	0,330
	cFos+	29084180,521	3	9694726,840	0,830	0,507	0,199
Error	PV+	15023754,928	10	1502375,493			
	cFos+	116764988,601	10	11676498,860			
Total	PV+	363116194,434	18				
	cFos+	2041734896,309	18				
Total corregido	PV+	27595221,478	17				
	cFos+	381337980,092	17				

Al observar un posible efecto del factor Rango sobre la densidad celular cFos+ en la corteza piriforme, se evaluaron las comparaciones por parejas del test ANOVA (**Anexo C, Tabla Complementaria 4**). En la **figura 9** se representó la densidad de cada población celular (PV+, cFos+ y células dobles PV/cFos+) de la corteza piriforme en función del rango social y en función de la exposición a orina control o a orina de *pool* dominante.



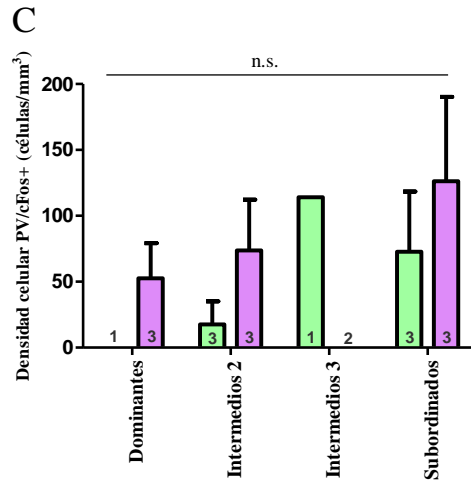


Figura 9. Densidades celulares de la corteza piriforme en función del rango social y de la exposición a orina control u orina dominante. Las barras representan la media de la densidad celular y las barras de error representan el *SEM*. El número localizado en el interior de las barras indica el tamaño muestral de cada grupo. **Figura 9A.** Densidad celular PV+ de la corteza piriforme. Se realizó el test ANOVA previamente descrito. Se observó una tendencia ($p=0,082$) dentro del grupo de intermedios 2 entre los expuestos a orina control y los expuestos a orina dominante. **Figura 9B.** Densidad celular cFos+ de la corteza piriforme. Se realizó el test ANOVA. Se observaron diferencias significativas dentro de los individuos expuestos a orina *pool* dominante entre dominantes e intermedio 2 ($p=0,041$), y una tendencia ($p=0,089$) en el grupo expuesto a orina dominante entre dominantes y subordinados. **Figura 9C.** Densidad celular PV/cFos+ de la corteza piriforme. Se realizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. No se observaron diferencias significativas (n.s.) entre los grupos experimentales.

Debido a que no se pudo cuantificar la densidad celular de 3 de los animales en la corteza piriforme, el tamaño muestral de los grupos experimentales se vio muy reducido, comprometiendo así el análisis estadístico anteriormente presentado. Del análisis anterior, se concluyó que podía existir un efecto del rango sobre la densidad celular cFos+, por lo que se representó la densidad celular cFos+ en función del rango y sin tener en cuenta en este caso la exposición a orina control o a orina dominante, para trabajar con un tamaño muestral mayor (**Figura 10**).

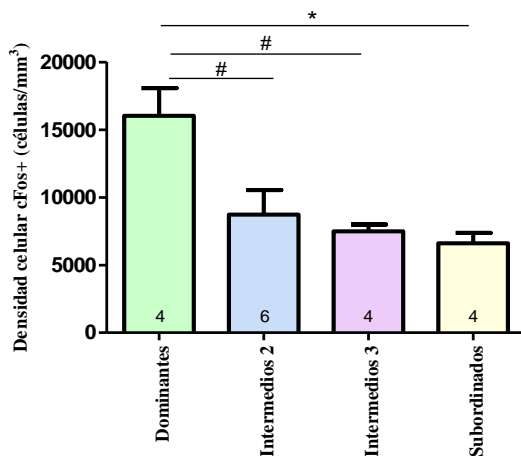


Figura 10. Densidad celular cFos+ de la corteza piriforme en función del rango social. Se realizó un test ANOVA. Se observaron diferencias significativas entre los dominantes y los subordinados ($p=0,021$) y tendencias entre dominantes e intermedios 2 ($p=0,061$) y entre dominantes e intermedios 3 ($p=0,071$).

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

La literatura afirma que la exposición a componentes no volátiles presentes en la orina puede afectar a las interacciones competitivas y al orden jerárquico establecido en ratones (Lee et al., 2017). Además, la composición de la orina de ratones dominantes se encuentra enriquecida en MUPs y especialmente en MUP20 (Guo et al., 2015), así como existe una distribución de feromonas diferente según el rango social del ratón (Haga et al., 2010). En los experimentos previos realizados en el laboratorio, la exposición a orina de dominantes en ratones no alteró las interacciones competitivas entre animales con una convivencia previa. Por ello, se diseñó el experimento de este trabajo donde se enfrentaron a ratones sin convivencia previa, de diferentes jaulas, eliminando así el factor del reconocimiento social y la familiaridad entre individuos.

En este experimento, los resultados conductuales obtenidos mostraron un aumento significativo en el número de victorias en los enfrentamientos del test del tubo en aquellos ratones a los que se les había colocado orina de *pool* dominante, pero solo en los de rango subordinado, no alterando la interacción competitiva entre los de rango dominante e intermedio. Se confirmó así la importancia de la orina en la conducta competitiva y la jerarquía social al eliminar el componente de la familiaridad y la convivencia previa. Sin embargo, el efecto de la orina sobre las interacciones competitivas solo era significativo para ratones subordinados. El hecho de que la exposición a orina dominante en ratones dominantes e intermedios no afecte a sus interacciones competitivas puede deberse a un “efecto techo”, que explica que en estos animales naturalmente ya están presentes altas cantidades de MUPs, por lo que, al añadir más, no se produce ningún efecto al estar acostumbrados a concentraciones altas de MUPs en la orina. Para confirmar dicha hipótesis, sería de interés realizar estudios posteriores en los que se especifique el componente de la orina por el cual los subordinados modifican su comportamiento. Por otro lado, se pone de manifiesto la importancia del entorno social y cómo la familiaridad y el reconocimiento social mantienen una jerarquía estable, al no influir la orina al enfrentar a animales que habían convivido previamente. Por tanto, los componentes no volátiles presentes en la orina, como las feromonas y las MUP, son importantes en las jerarquías de dominancia, sin embargo, hay que tener en cuenta que existen numerosos factores que afectan a este fenómeno, como la convivencia previa, la familiaridad, la memoria social o el reconocimiento visual.

Observadas estas diferencias conductuales, se estudió qué poblaciones celulares podrían estar detrás de este fenómeno y qué regiones cerebrales implicadas. En este estudio, se evaluaron las densidades de distintas poblaciones celulares en 3 regiones cerebrales en respuesta a la exposición a orina durante una interacción competitiva teniendo en cuenta el rango social del

animal. Por tanto, existen dos variables clave en la presentación de la señal: (1) la naturaleza de la orina (orina *pool* dominante o control); (2) el rango social del individuo (dominante, intermedio 2, intermedio 3 y subordinado). Al combinar dichas variables, dan como resultado 8 grupos experimentales.

La primera región cerebral estudiada fue el **núcleo paraventricular** del hipotálamo. Este se encuentra implicado en el comportamiento social, pues produce grandes cantidades de oxitocina (Wang et al., 2014; van der Kooij y Sandi, 2012). El sistema oxitocina (OT) regula una amplia gama de comportamientos sociales, sin embargo, el mecanismo por el que actúa es poco conocido. La activación del sistema OT es necesaria para promover el comportamiento social y se observó que ratones con un comportamiento social anormal tienen un número reducido de neuronas OT+ en PVN (Resendez et al., 2020). También se ha relacionado el estatus social con una variación de los receptores de OT en distintas regiones cerebrales (Lee et al., 2019). Por todo esto, en el PVN se cuantificaron las densidades celulares OT+, cFos+ y las densidades de células dobles OT/cFos+ y se compararon en función del rango social y de la exposición a orina. Con los resultados obtenidos, se observó que existía una tendencia al efecto de la exposición a orina sobre la densidad celular OT+ en PVN. Algo llamativo de esta tendencia es que el número de células que expresan OT no es algo que sea dinámico, como sí es por ejemplo la expresión de cFos. Es decir, el número de células que expresan OT no se modifica en situaciones sociales, solo se modifica la activación de dichas células. Por lo que dicha tendencia puede explicarse como un artefacto del experimento debido al bajo tamaño muestral de los grupos experimentales. Pese a la tendencia observada, no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales en ninguna de las densidades celulares estudiadas. Por tanto, este estudio no permitió afirmar que las poblaciones celulares estudiadas en PVN pudiesen tener diferencias significativas atendiendo al rango social del animal y a la exposición a diferentes tipos de orina.

En el caso de la **corteza prefrontal**, se cuantificó la densidad de células parvalbúmina positivas (PV+), la densidad de células cFos+ y la densidad de células dobles PV/cFos+ en función del rango social y de la exposición a orina control u orina dominante. La corteza prefrontal es una región implicada en procesar información relacionada con jerarquía social, participando en el reconocimiento social y del estatus social (Wang et al., 2014). Además, juega un papel importante en la toma de decisiones en contextos sociales competitivos (Lee et al., 2021). La población celular PV+ es un grupo de interneuronas inhibitorias (GABAérgicas) que se encargan de mantener un equilibrio entre excitación e inhibición para el correcto funcionamiento de la corteza (Kawaguchi y Kondo, 2002). En este estudio, no se observó que variase de forma significativa la densidad celular PV+ entre los grupos experimentales, ni en función del rango social ni en función de la exposición a orina. Sin

embargo, al analizar las comparaciones por pares del análisis estadístico, se observó que el grupo de ratones intermedios 2 expuestos a orina dominante presentaba una densidad PV+ superior que los expuestos a orina control. El número de células que expresan PV no se modifica ante situaciones sociales, solo se modifica su activación, por lo que dicha diferencia observada puede deberse al pequeño tamaño muestral de los grupos experimentales. En el resto de los grupos experimentales, no se observaron más diferencias significativas. Se cuantificó también la densidad celular cFos+ en la corteza prefrontal sin observar diferencias entre la activación neuronal cFos+ entre ninguno de los grupos experimentales. Por el contrario, en un estudio, se observó que la PFC de sujetos dominantes, pero no de sujetos subordinados, exhibía una mayor activación (cFos+) a orina de subordinados en comparación con orina dominante (Lee et al., 2021). Tampoco se observaron diferencias significativas de la densidad PV/cFos+ entre los grupos experimentales. Por todo esto, pese a la implicación de la corteza prefrontal en jerarquía social, no se encontró una relación clara entre las densidades celulares cuantificadas en la corteza prefrontal con el rango social y la exposición a orina. Esto puede ser debido al pequeño tamaño muestral de los grupos experimentales.

Las feromonas se detectan normalmente a través del órgano vomeronasal, sin embargo, la evidencia reciente sugiere que algunas pueden detectarse a través del epitelio olfatorio principal (Wang et al., 2016). La **corteza piriforme**, la cual forma parte de la corteza olfatoria, recibe información directa del epitelio olfatorio principal y participa en la percepción de los olores. En este estudio, en la corteza piriforme se cuantificó la densidad de células parvalbúmina positivas (PV+), la densidad de células cFos+ y la densidad de células dobles PV/cFos+. Puesto que la orina de dominantes se encuentra enriquecida en ciertas feromonas, como las MUPs (Guo et al., 2015), se estudió si la exposición a orina dominante o a orina control provocaba una activación diferencial en las poblaciones celulares de piriforme. Al cuantificar la densidad celular OT+ en piriforme, se observó una tendencia entre los ratones intermedios 2. Los ratones intermedios 2 expuestos a orina control mostraron una densidad celular OT+ superior a los expuestos a orina dominante. Al analizar la población celular cFos+, se vio que la activación neuronal en piriforme se veía influenciada por el rango del animal. Los ratones dominantes experimentaron una activación neuronal significativamente más robusta que los subordinados, independientemente de la orina a la que fueron expuestos. También se observó una activación algo más robusta en ratones dominantes frente a los intermedios. Teniendo en cuenta el tipo de orina al que se expusieron a los ratones, dentro del grupo de los animales expuestos a orina dominante, se observó una activación neuronal más robusta en los dominantes frente a los intermedios 2 y los subordinados. Al estudiar la densidad celular OT/cFos+, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- La exposición a orina dominante y el rango social del animal no afecta de forma sustancial a las poblaciones celulares del núcleo paraventricular y de la corteza prefrontal estudiadas.
- El rango social de los ratones parece influir sobre la activación neuronal (cFos+) en la corteza piriforme, mostrando una activación más robusta en los ratones dominantes.
- Los resultados de este experimento se encuentran limitados por el pequeño tamaño muestral de los grupos experimentales al tratarse de un trabajo exploratorio.
- Para futuros experimentos, sería de interés:
 - Replicar el experimento para aumentar el tamaño muestral.
 - Hacer un desglose de las estructuras cerebrales estudiadas y concretar más el subnúcleo de interés.
 - Estudiar otras regiones cerebrales que no se han evaluado en esta investigación, como el VNO, el sistema olfativo accesorio o la amígdala.
 - Identificar el componente específico de la orina que causa los cambios conductuales. Nuestra hipótesis basada en la bibliografía es que los componentes no volátiles de la orina, como las MUPs y las feromonas, son la causa de dichos cambios. En experimentos posteriores, sería interesante caracterizar y cuantificar las feromonas y MUPs de la orina, realizar un concentrado y testar su efecto.

CAPÍTULO 6: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bind R.H., Minney S.M., Rosenfeld S., & Hallock R.M. The role of pheromonal responses in rodent behavior: future directions for the development of laboratory protocols. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 52(2):124-129. 2013

Blázquez G., Castañé A., Saavedra A., Masana M., Alberch J., & Pérez-Navarro E. Social Memory and Social Patterns Alterations in the Absence of STriatal-Enriched Protein Tyrosine Phosphatase. *Frontiers in Behavioral Neuroscience.* 12:317. 2019

Butman, Judith. La cognición social y la corteza cerebral. *Revista Neurológica Argentina.* 26(3):117-122. 2001

Cummins D.D. How the Social Environment Shaped the Evolution of Mind. *Synthese.* 122:3–28. 2000.

Fan Z., Zhu H., Zhou T., Wang S., Wu Y., & Hu H. Using the tube test to measure social hierarchy in mice. *Nat Protoc.* 14(3):819-831. 2019.

Guo H., Fang Q., Huo Y., Zhang Y., & Zhang J. Social dominance-related major urinary proteins and the regulatory mechanism in mice. *Integr Zool.* 10(6):543-54. 2015.

Haga S., Hattori T., Sato T., Sato K., Matsuda S., Kobayakawa R., Sakano H., Yoshihara Y., Kikusui T., & Touhara K. The male mouse pheromone ESP1 enhances female sexual receptive behaviour through a specific vomeronasal receptor. *Nature.* 1;466(7302):118-22. 2010.

Kaidanovich-Beilin O., Lipina T., Vukobradovic I., Roder J., & Woodgett J.R. Assessment of social interaction behaviors. *J Vis Exp.* 25;(48):2473. 2011.

Kawaguchi Y., & Kondo S. Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. *J Neurocytol.* 31:277–287. 2002.

Kogan J.H., Frankland P.W., & Silva A.J. Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. *Hippocampus.* 10(1):47-56. 2000.

Lahn B.T. Social dominance hierarchy: toward a genetic and evolutionary understanding. *Cell Res.* 30;(7):560-561. 2020.

Lee W., Dowd H.N., Nikain C., Dwortz M. F., Yang E. D., & Curley J. P. Effect of relative social rank within a social hierarchy on neural activation in response to familiar or unfamiliar social signals. *Sci Rep.* 11;2864. 2021.

Lee W., Hiura L.C., Yang E., Broekman K.A., Ophir A.G., & Curley J.P. Social status in mouse social hierarchies is associated with variation in oxytocin and vasopressin 1a receptor densities. *Horm Behav.* 114:104551. 2019.

Llorens-Martin M., Torres-Aleman I., & Trejo J. L. Pronounced individual variation in the response to the stimulatory action of exercise on immature hippocampal neurons. *Hippocampus*. 16(5): 480-490. 2006.

Nelson A. C., Kapoor V., Vaughn E., Gnanasegaram J. A., Rubinstein N. D., Murthy V. N., & Dulac C. Molecular and Circuit Architecture of Social Hierarchy. *BioRxiv*. 10;1101;838664. 2019.

Resendez S.L., Namboodiri V.M.K., Otis J.M., Eckman L.E.H., Rodriguez-Romaguera J., Ung R.L., Basiri M.L., Kosyk O., Rossi M.A., Dichter G.S., & Stuber G.D. Social Stimuli Induce Activation of Oxytocin Neurons Within the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus to Promote Social Behavior in Male Mice. *J Neurosci*. 11;40(11):2282-2295. 2020.

Richter K., Wolf G., & Engelmann M. Social recognition memory requires two stages of protein synthesis in mice. *Learn. Mem.* 12, 407–413. 2005.

Spreng R. N., & Hommel B. Examining the role of memory in social cognition. *Frontiers in Psychology*, 4;437. 2013.

Sullivan R.M., Wilson D.A., Ravel N., & Mouly A.M. Olfactory memory networks: from emotional learning to social behaviors. *Front Behav Neurosci*. 17(9);36. 2015.

Tzakis N., & Holahan M.R. Social Memory and the Role of the Hippocampal CA2 Region. *Front Behav Neurosci*. 1(13);233. 2019.

Van der Kooij M. A., & Sandi C. Social memories in rodents: Methods, mechanisms and modulation by stress. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 36(7); 1763–1772. 2012.

Veyrac A., Wang G., Baum M.J., & Bakker J. The main and accessory olfactory systems of female mice are activated differentially by dominant versus subordinate male urinary odors. *Brain Res*. 1402;20-29. 2011.

Wang F., Kessels H. W., & Hu H. The mouse that roared: neural mechanisms of social hierarchy. *Trends in Neurosciences*. 37(11);674–682. 2014.

Wang F., Zhu J., Zhu H., Zhang Q., Lin Z., & Hu H. Bidirectional Control of Social Hierarchy by Synaptic Efficacy in Medial Prefrontal Cortex. *Science*. 334(6056);693-697. 2011.

Wang Z., Sindreu C. B., Li V., Nudelman A., Guy C., Chan K., & Storm D.R. Pheromone Detection in Male Mice Depends on Signaling through the Type 3 Adenylyl Cyclase in the Main Olfactory Epithelium. *Journal of Neuroscience*. 26(28);7375-7379. 2006.

Wilson D.A., Xu W., Sadrian B., Courtiol E., Cohen Y., & Barnes D.C. Cortical odor processing in health and disease. *Prog Brain Res*. 208 275-305. 2014.

ANEXO A: Jerarquías establecidas

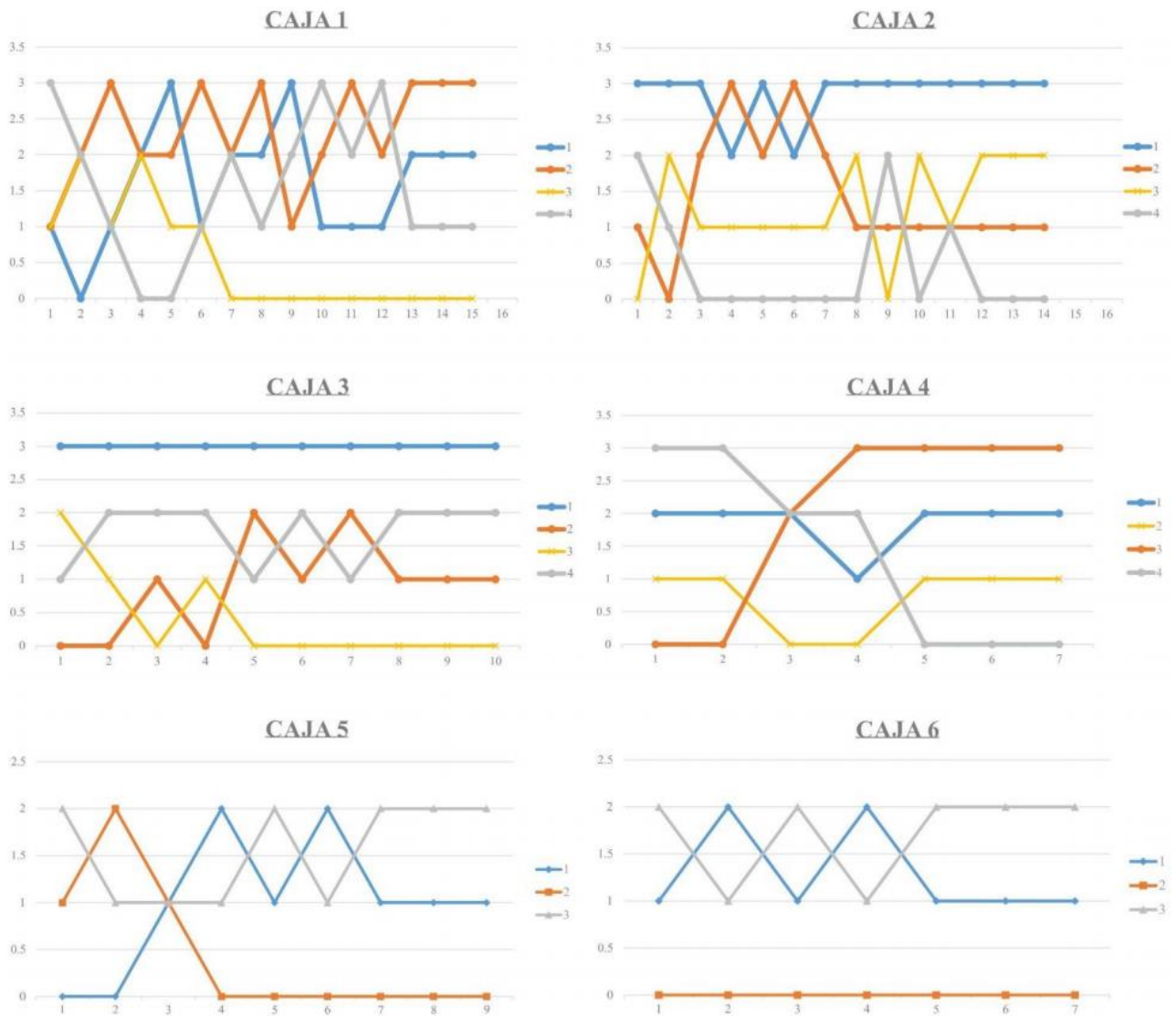


Figura Complementaria 1. Jerarquías establecidas en cada jaula mediante la realización del test de tubo. En el eje X se representan los días de realización del test, mientras que en el eje Y se representan las victorias ganadas por cada ratón en los días de enfrentamientos. Las cajas 1, 2, 3 y 4 contaban con 4 ratones por jaula, mientras que las cajas 5 y 6 contaban con 3 ratones por jaula.

ANEXO B: Anticuerpos utilizados en los ensayos inmunohistoquímicos

Tabla Complementaria 1. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en los ensayos inmunohistoquímicos.

Ensayo 1					
Anticuerpos primarios					
Anticuerpo	Especie	Dilución	Casa comercial	Referencia	
cFos	Conejo	1:5000	Synaptic Systems	226 003	
Parvalbúmina	Ratón	1:4000	Merck Millipore	MAB1572	
Anticuerpos secundarios					
Anticuerpo	Especie	Dilución	Excitación (λ)	Casa comercial	Referencia
Donkey anti-rabbit Alexa	Burro	1:1000	594 - Rojo	Invitrogen	A-21207
Donkey anti-mousse Alexa	Burro	1:1000	488 - Verde	Invitrogen	A-21202
Ensayo 2					
Anticuerpos primarios					
Anticuerpo	Especie	Dilución	Casa comercial	Referencia	
cFos	Guinea pig	1:2000	Synaptic Systems	156 004	
Oxitocina	Conejo	1:1500	Inmunostar	20068	
Anticuerpos secundarios					
Anticuerpo	Especie	Dilución	Excitación (λ)	Casa comercial	Referencia
Donkey anti-guinea pig Alexa	Burro	1:1000	594 - Rojo	Jackson Immuno Research	706-585-148
Donkey anti-rabbit Alexa	Burro	1:1000	488 - Verde	Invitrogen	A-21206

ANEXO C: Comparaciones por pareja (ANOVA)

Tabla Complementaria 2. Comparaciones por parejas basadas en medias marginales estimadas de las variables densidad celular OT+ y cFos+ del núcleo paraventricular. Realización de un test ANOVA multivariante de efectos fijos: Rango y Orina. No se observan diferencias significativas.

Comparaciones por parejas							Comparaciones por parejas												
Variable dependiente			Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	95% de intervalo de confianza		Variable dependiente			Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	95% de intervalo de confianza					
						Límite inferior	Límite superior							Límite inferior	Límite superior				
OT+	POOL	DOMINANTE	INTERMEDIO2	-572,877	1323,913	0,999	-4671,679	3525,925	CFOS	DOMINANTE	POOL	CONTROL	-1009,692	1323,913	0,459	-3869,831	1850,448		
			INTERMEDIO3	-848,149	1480,179	0,994	-5430,749	3734,451			CONTROL	POOL	1009,692	1323,913	0,459	-1850,448	3869,831		
			SUBORDINAD	-1325,555	1323,913	0,914	-5424,357	2773,247			CONTROL	CONTROL	-2150,705	1323,913	0,128	-5010,844	709,434		
		INTERMEDIO2	DOMINANTE	572,877	1323,913	0,999	-3525,925	4671,679		INTERMEDIO2	POOL	CONTROL	2150,705	1323,913	0,128	-709,434	5010,844		
			INTERMEDIO3	-275,272	1480,179	1,000	-4857,872	4307,328		INTERMEDIO3	POOL	CONTROL	-2120,373	1621,455	0,214	-5623,314	1382,568		
			SUBORDINAD	-752,678	1323,913	0,994	-4851,480	3346,124		CONTROL	POOL	2120,373	1621,455	0,214	-1382,568	5623,314			
		INTERMEDIO3	DOMINANTE	848,149	1480,179	0,994	-3734,451	5430,749		SUBORDINAD	POOL	CONTROL	-183,048	1480,179	0,903	-3380,781	3014,685		
			INTERMEDIO2	275,272	1480,179	1,000	-4307,328	4857,872			CONTROL	POOL	183,048	1480,179	0,903	-3014,685	3380,781		
			SUBORDINAD	-477,406	1480,179	1,000	-5060,006	4105,194			CONTROL	CONTROL	368,856	578,116	0,535	-880,088	1617,800		
		SUBORDINAD	DOMINANTE	1325,555	1323,913	0,914	-2773,247	5424,357		CONTROL	CONTROL	-368,856	578,116	0,535	-1617,800	880,088			
			INTERMEDIO2	752,678	1323,913	0,994	-3346,124	4851,480		INTERMEDIO2	POOL	CONTROL	-1024,604	578,116	0,100	-2273,548	224,340		
			INTERMEDIO3	477,406	1480,179	1,000	-4105,194	5060,006		CONTROL	POOL	1024,604	578,116	0,100	-224,340	2273,548			
		CONTROL	DOMINANTE	INTERMEDIO2	-1713,890	1323,913	0,771	-5812,693		2384,912	INTERMEDIO3	POOL	CONTROL	-67,439	708,045	0,926	-1597,077	1462,198	
				INTERMEDIO3	-1958,831	1480,179	0,754	-6541,431		2623,769	CONTROL	POOL	67,439	708,045	0,926	-1462,198	1597,077		
				SUBORDINAD	-498,912	1480,179	1,000	-5081,512		4083,688	SUBORDINAD	POOL	CONTROL	-919,465	646,353	0,178	-2315,827	476,896	
			DOMINANTE	1713,890	1323,913	0,771	-2384,912	5812,693		CONTROL		POOL	919,465	646,353	0,178	-476,896	2315,827		
			INTERMEDIO2	1713,890	1323,913	0,771	-2384,912	5812,693		CONTROL		CONTROL	1214,978	1480,179	0,964	-3367,622	5797,579		
			INTERMEDIO2	DOMINANTE	1958,831	1480,179	0,754	-2623,769		6541,431	INTERMEDIO2	POOL	CONTROL	244,940	1480,179	1,000	-4337,660	4827,540	
	INTERMEDIO3			244,940	1480,179	1,000	-4337,660	4827,540	SUBORDINAD	POOL	CONTROL	1459,919	1621,455	0,946	-3560,068	6479,906			
	SUBORDINAD			1459,919	1621,455	0,946	-3560,068	6479,906	SUBORDINAD	DOMINANTE	INTERMEDIO2	498,912	1480,179	1,000	-4083,688	5081,512			
	DOMINANTE		498,912	1480,179	1,000	-4083,688	5081,512	INTERMEDIO2		INTERMEDIO2	-1214,978	1480,179	0,964	-5797,579	3367,622				
	INTERMEDIO2		-1214,978	1480,179	0,964	-5797,579	3367,622	INTERMEDIO3		INTERMEDIO2	-1459,919	1621,455	0,946	-6479,906	3560,068				
	CFOS		POOL	DOMINANTE	INTERMEDIO2	1197,018	578,116	0,305	-592,816	2986,851	CONTROL	DOMINANTE	INTERMEDIO2	INTERMEDIO2	-196,442	578,116	1,000	-1986,276	1593,391
					INTERMEDIO3	544,065	646,353	0,960	-1457,030	2545,160			INTERMEDIO3	INTERMEDIO2	107,770	646,353	1,000	-1893,325	2108,865
					SUBORDINAD	909,286	578,116	0,595	-880,547	2699,120			SUBORDINAD	INTERMEDIO2	379,035	646,353	0,993	-2380,130	1622,060
				INTERMEDIO2	DOMINANTE	-1197,018	578,116	0,305	-2986,851	592,816		INTERMEDIO3	INTERMEDIO2	196,442	578,116	1,000	-1593,391	1986,276	
					INTERMEDIO3	-652,952	646,353	0,910	-2654,047	1348,143		SUBORDINAD	INTERMEDIO3	304,212	646,353	0,998	-1696,883	2305,307	
					SUBORDINAD	-287,731	578,116	0,997	-2077,565	1502,103		SUBORDINAD	INTERMEDIO2	-182,593	646,353	1,000	-2183,688	1818,502	
				INTERMEDIO3	DOMINANTE	-544,065	646,353	0,960	-2545,160	1457,030		SUBORDINAD	DOMINANTE	INTERMEDIO2	-107,770	646,353	1,000	-2108,865	1893,325
					INTERMEDIO2	652,952	646,353	0,910	-1348,143	2654,047			INTERMEDIO2	INTERMEDIO2	-304,212	646,353	0,998	-2305,307	1696,883
		SUBORDINAD			365,221	646,353	0,995	-1635,874	2366,316	SUBORDINAD			INTERMEDIO2	-486,805	708,045	0,985	-2678,895	1705,285	
		SUBORDINAD		DOMINANTE	-909,286	578,116	0,595	-2699,120	880,547	SUBORDINAD		DOMINANTE	INTERMEDIO2	379,035	646,353	0,993	-1622,060	2380,130	
				INTERMEDIO2	287,731	578,116	0,997	-1502,103	2077,565			INTERMEDIO2	INTERMEDIO2	182,593	646,353	1,000	-1818,502	2183,688	
				INTERMEDIO3	-365,221	646,353	0,995	-2366,316	1635,874			INTERMEDIO3	INTERMEDIO2	486,805	708,045	0,985	-1705,285	2678,895	

Se basa en medias marginales estimadas

Tabla Complementaria 3. Comparaciones por parejas basadas en medias marginales estimadas de la variable densidad celular PV+ de la corteza prefrontal. Realización de un test ANOVA multivariante de efectos fijos: Rango y Orina. Las diferencias significativas y tendencias entre parejas se encuentran marcadas en color amarillo.

Comparaciones por parejas								Comparaciones por parejas								
Variable dependiente: PV+								Variable dependiente: PV+								
			Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	95% de intervalo de confianza					Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	95% de intervalo de confianza		
						Límite inferior	Límite superior							Límite inferior	Límite superior	
ORINA	POOL	DOMINANTE	INTERMEDIO 2	-2118,367	1437,370	0,655	-6513,940	2277,206	DOMINANTE	POOL	CONTROL	328,250	1437,370	0,823	-2754,602	3411,103
			INTERMEDIO 3	25,591	1607,029	1,000	-4888,809	4939,991		CONTROL	POOL	-328,250	1437,370	0,823	-3411,103	2754,602
			SUBORDINADO	-367,916	1437,370	1,000	-4763,489	4027,657		INTERMEDIO 2	POOL	CONTROL	2990,349	1437,370	0,056	-92,504
	INTERMEDIO 2	DOMINANTE	INTERMEDIO 2	2118,367	1437,370	0,655	-2277,206	6513,940	CONTROL	POOL	-2990,349	1437,370	0,056	-6073,202	92,504	
			INTERMEDIO 3	2143,958	1607,029	0,745	-2770,442	7058,358	INTERMEDIO 3	POOL	CONTROL	272,017	1760,412	0,879	-3503,692	4047,725
			SUBORDINADO	1750,451	1437,370	0,812	-2645,122	6146,024	CONTROL	POOL	-272,017	1760,412	0,879	-4047,725	3503,692	
	INTERMEDIO 3	DOMINANTE	INTERMEDIO 2	-2143,958	1607,029	0,745	-7058,358	2770,442	SUBORDINADO	POOL	CONTROL	903,462	1437,370	0,540	-2179,390	3986,315
			INTERMEDIO 3	-393,507	1607,029	1,000	-5307,907	4520,893		CONTROL	POOL	-903,462	1437,370	0,540	-3986,315	2179,390
			SUBORDINADO	367,916	1437,370	1,000	-4027,657	4763,489		Se basa en medias marginales estimadas						
	SUBORDINADO	DOMINANTE	INTERMEDIO 2	-1750,451	1437,370	0,812	-6146,024	2645,122								
			INTERMEDIO 3	393,507	1607,029	1,000	-4520,893	5307,907								
	CONTROL	DOMINANTE	INTERMEDIO 2	543,732	1437,370	0,999	-3851,841	4939,305								
			INTERMEDIO 3	-30,643	1607,029	1,000	-4945,043	4883,757								
			SUBORDINADO	207,296	1437,370	1,000	-4188,277	4602,869								
INTERMEDIO 2		DOMINANTE	INTERMEDIO 2	-543,732	1437,370	0,999	-4939,305	3851,841								
			INTERMEDIO 3	-574,375	1607,029	1,000	-5488,775	4340,025								
			SUBORDINADO	-336,436	1437,370	1,000	-4732,009	4059,137								
INTERMEDIO 3		DOMINANTE	INTERMEDIO 2	30,643	1607,029	1,000	-4883,757	4945,043								
			INTERMEDIO 2	574,375	1607,029	1,000	-4340,025	5488,775								
			SUBORDINADO	237,939	1607,029	1,000	-4676,461	5152,339								
SUBORDINADO		DOMINANTE	INTERMEDIO 2	-207,296	1437,370	1,000	-4602,869	4188,277								
			INTERMEDIO 2	336,436	1437,370	1,000	-4059,137	4732,009								
			INTERMEDIO 3	-237,939	1607,029	1,000	-5152,339	4676,461								
Se basa en medias marginales estimadas																

Tabla Complementaria 4. Comparaciones por parejas basadas en medias marginales estimadas de las variables densidad celular PV+ y cFos+ de la corteza piriforme. Realización de un test ANOVA multivariante de efectos fijos: Rango y Orina. Las diferencias significativas y tendencias entre parejas se encuentran marcadas en color amarillo.

Comparaciones por parejas									Comparaciones por parejas																	
Variable dependiente				Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	95% de intervalo de confianza		Variable dependiente			Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	95% de intervalo de confianza											
							Límite inferior	Límite superior							Límite inferior	Límite superior										
PV+	POOL	DOMINANTE	INTERMEDIO	1960,970	1000,792	0,388	-1305,881	5227,822	PV+	DOMINANTE	POOL	CONTROL	229,451	1415,333	0,874	-2924,107	3383,010									
			INTERMEDIO	-474,254	1118,919	0,999	-4126,705	3178,197		CONTROL	POOL	CONTROL	-229,451	1415,333	0,874	-3383,010	2924,107									
			SUBORDINAD	1185,540	1000,792	0,840	-2081,311	4452,392		POOL	CONTROL	CONTROL	-1938,367	1000,792	0,082	-4168,270	291,535									
		INTERMEDIO 2	DOMINANTE	-1960,970	1000,792	0,388	-5227,822	1305,881	CONTROL	POOL	CONTROL	1938,367	1000,792	0,082	-291,535	4168,270										
			INTERMEDIO	-2435,224	1118,919	0,286	-6087,675	1217,227	POOL	CONTROL	CONTROL	1750,934	1501,187	0,271	-1593,920	5095,788										
			SUBORDINAD	-775,430	1000,792	0,974	-4042,281	2491,421	CONTROL	POOL	CONTROL	-1750,934	1501,187	0,271	-5095,788	1593,920										
		INTERMEDIO 3	DOMINANTE	474,254	1118,919	0,999	-3178,197	4126,705	SUBORDINADO	POOL	CONTROL	CONTROL	-1312,560	1118,919	0,268	-3805,667	1180,547									
			INTERMEDIO	2435,224	1118,919	0,286	-1217,227	6087,675		POOL	CONTROL	CONTROL	1312,560	1118,919	0,268	-1180,547	3805,667									
			SUBORDINAD	1659,794	1118,919	0,670	-1992,657	5312,245		CONTROL	POOL	CONTROL	-1224,946	3945,715	0,763	-10016,547	7566,654									
		SUBORDINADO	DOMINANTE	-1185,540	1000,792	0,840	-4452,392	2081,311	INTERMEDIO 2	CONTROL	POOL	CONTROL	1224,946	3945,715	0,763	-7566,654	10016,547									
			INTERMEDIO	775,430	1000,792	0,974	-2491,421	4042,281		POOL	CONTROL	CONTROL	-4925,158	2790,042	0,108	-11141,759	1291,442									
			INTERMEDIO	-1659,794	1118,919	0,670	-5312,245	1992,657		CONTROL	POOL	CONTROL	4925,158	2790,042	0,108	-1291,442	11141,759									
	CONTROL	DOMINANTE	INTERMEDIO	-206,848	1415,333	1,000	-4826,874	4413,177	INTERMEDIO 3	POOL	CONTROL	CONTROL	-1791,106	4185,063	0,678	-11116,006	7533,795									
			INTERMEDIO	1047,229	1733,422	0,993	-4611,124	6705,582		POOL	CONTROL	CONTROL	1791,106	4185,063	0,678	-7533,795	11116,006									
			SUBORDINAD	-356,471	1501,187	1,000	-5256,748	4543,806		CONTROL	POOL	CONTROL	1638,741	3119,361	0,611	-5311,629	8589,111									
		INTERMEDIO 2	DOMINANTE	206,848	1415,333	1,000	-4413,177	4826,874	SUBORDINADO	POOL	CONTROL	CONTROL	-1638,741	3119,361	0,611	-8589,111	5311,629									
			INTERMEDIO	1254,077	1415,333	0,952	-3365,948	5874,103		CONTROL	POOL	CONTROL	1638,741	3119,361	0,611	-5311,629	8589,111									
			SUBORDINAD	-149,623	1118,919	1,000	-3802,074	3502,828		CONTROL	POOL	CONTROL	-1638,741	3119,361	0,611	-8589,111	5311,629									
		INTERMEDIO 3	DOMINANTE	-1047,229	1733,422	0,993	-6705,582	4611,124	Se basa en medias marginales estimadas																	
			INTERMEDIO	-1254,077	1415,333	0,952	-5874,103	3365,948																		
			SUBORDINAD	-1403,700	1501,187	0,939	-6303,977	3496,577																		
		SUBORDINADO	DOMINANTE	356,471	1501,187	1,000	-4543,806	5256,748																		
			INTERMEDIO	149,623	1118,919	1,000	-3502,828	3802,074																		
			INTERMEDIO	1403,700	1501,187	0,939	-3496,577	6303,977																		
cFOS+	POOL	DOMINANTE	INTERMEDIO	9453,607 ^a	2790,042	0,041	346,164	18561,050										PV+	DOMINANTE	POOL	CONTROL	229,451	1415,333	0,874	-2924,107	3383,010
			INTERMEDIO	9051,503	3119,361	0,091	-1130,928	19233,934											CONTROL	POOL	CONTROL	-229,451	1415,333	0,874	-3383,010	2924,107
			SUBORDINAD	8133,365	2790,042	0,089	-974,078	17240,808											POOL	CONTROL	CONTROL	-1938,367	1000,792	0,082	-4168,270	291,535
		INTERMEDIO 2	DOMINANTE	-9453,607 ^a	2790,042	0,041	-18561,050	-346,164										CONTROL	POOL	CONTROL	1938,367	1000,792	0,082	-291,535	4168,270	
			INTERMEDIO	-402,104	3119,361	1,000	-10584,535	9780,327										POOL	CONTROL	CONTROL	1750,934	1501,187	0,271	-1593,920	5095,788	
			SUBORDINAD	-1320,243	2790,042	0,998	-10427,686	7787,200										CONTROL	POOL	CONTROL	-1750,934	1501,187	0,271	-5095,788	1593,920	
		INTERMEDIO 3	DOMINANTE	-9051,503	3119,361	0,091	-19233,934	1130,928	SUBORDINADO	POOL	CONTROL	CONTROL	-1312,560	1118,919	0,268	-3805,667	1180,547									
			INTERMEDIO	402,104	3119,361	1,000	-9780,327	10584,535		POOL	CONTROL	CONTROL	1312,560	1118,919	0,268	-1180,547	3805,667									
			SUBORDINAD	-918,138	3119,361	1,000	-11100,569	9264,292		CONTROL	POOL	CONTROL	-1224,946	3945,715	0,763	-10016,547	7566,654									
		SUBORDINADO	DOMINANTE	-8133,365	2790,042	0,089	-17240,808	974,078	INTERMEDIO 2	CONTROL	POOL	CONTROL	1224,946	3945,715	0,763	-7566,654	10016,547									
			INTERMEDIO	1320,243	2790,042	0,998	-7787,200	10427,686		POOL	CONTROL	CONTROL	-4925,158	2790,042	0,108	-11141,759	1291,442									
			INTERMEDIO	918,138	3119,361	1,000	-9264,292	11100,569		CONTROL	POOL	CONTROL	4925,158	2790,042	0,108	-1291,442	11141,759									
	CONTROL	DOMINANTE	INTERMEDIO	5753,395	3945,715	0,686	-7126,474	18633,265	INTERMEDIO 3	POOL	CONTROL	CONTROL	-1791,106	4185,063	0,678	-11116,006	7533,795									
			INTERMEDIO	8485,344	4832,494	0,502	-7289,210	24259,898		POOL	CONTROL	CONTROL	1791,106	4185,063	0,678	-7533,795	11116,006									
			SUBORDINAD	10997,052	4185,063	0,142	-2664,113	24658,217		CONTROL	POOL	CONTROL	1638,741	3119,361	0,611	-5311,629	8589,111									
		INTERMEDIO 2	DOMINANTE	-5753,395	3945,715	0,686	-18633,265	7126,474	SUBORDINADO	POOL	CONTROL	CONTROL	-1638,741	3119,361	0,611	-8589,111	5311,629									
			INTERMEDIO	2731,949	3945,715	0,985	-10147,921	15611,818		CONTROL	POOL	CONTROL	1638,741	3119,361	0,611	-5311,629	8589,111									
			SUBORDINAD	5243,657	3119,361	0,547	-4938,774	15426,088		CONTROL	POOL	CONTROL	-1638,741	3119,361	0,611	-8589,111	5311,629									
		INTERMEDIO 3	DOMINANTE	-8485,344	4832,494	0,502	-24259,898	7289,210	Se basa en medias marginales estimadas																	
			INTERMEDIO	-2731,949	3945,715	0,985	-15611,818	10147,921																		
			SUBORDINAD	2511,708	4185,063	0,993	-11149,457	16172,873																		
		SUBORDINADO	DOMINANTE	-10997,052	4185,063	0,142	-24658,217	2664,113																		
			INTERMEDIO	-5243,657	3119,361	0,547	-15426,088	4938,774																		
			INTERMEDIO	-2511,708	4185,063	0,993	-16172,873	11149,457																		