



# BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

## INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA

Laboratorio de Ecología de la Conducta

“El carácter social del bostezo en las ratas  
Sprague-Dawley”

## TESIS

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS**

Presenta:

**QFB. Adzaira Irais Quiterio Navarro**

Director de tesis:

**Dr. Alejandro Moyaho Martínez**

Puebla, Pue. Enero 2022

*A Dios por permitirme culminar una etapa más de esta vida, por la sapiencia que me ha brindado, por la salud y por nunca abandonarme aun en los días menos brillantes.*

*A mi abuelo Profesor Socimo Quiterio Leyva quien me demostró su amor incondicional e impulso a seguir el camino del conocimiento.*

*A mi familia y amigos, quienes me han acompañado durante esta trayectoria llena de altibajos. Gracias por su paciencia y apoyo. Gracias por confiar en mi y brindarme las palabras adecuadas en el momento oportuno.*

## **Agradecimientos**

Agradezco al Dr. Alejandro Moyaho por sus enseñanzas, por su paciencia durante mi formación profesional y por permitirme pertenecer al laboratorio de Ecología de la Conducta en donde me permitió desarrollar este proyecto bajo su tutela. A la Dra. Ma. de Jesús Gómez Villalobos quien me permitió realizar los experimentos de EIA en el laboratorio de Fisiología Cardiovascular. A la Dra. Evelyn Beristaín por sus contribuciones a mi proyecto. Al Biól. José Luis Bautista por la ayuda que me brindo durante los experimentos, así como el empeño que puso para trabar y conocer a la especie (*Sprague-Dawley*). Le agradezco a Luisa Navarro por toda su ayuda observando los videos. Al Dr. Oscar Juárez por el apoyo que me brindó durante toda la maestría y por su amistad. A la Dra. Alejandra Díaz y la Mtra. Ana Karina Bocanegra quienes me ayudaron con la realización de las pruebas EIA. A mis compañeros de laboratorio por sus opiniones y aportes a mi proyecto. Finalmente, estoy agradecida con mi comité revisor: la Dra. Amira del R. Flores Urbina y el Dr. Rubén A. Vázquez Roque por su paciencia y aporte a mi proyecto de tesis. Gracias al Instituto de Fisiología, mis maestros y compañeros.

## Resumen

La mayoría de los vertebrados bostezan, pero sólo algunos presentan contagio del bostezo. Algunos autores han relacionado al bostezo contagioso con la empatía, aunque otros han puesto en duda tal relación porque el contagio se ha observado en animales desconocidos entre sí. Este hallazgo, y el resultado de que una condición de aislamiento disminuye la frecuencia de bostezo en algunos animales como las ratas, hacen pensar que el bostezo puede tener una función comunicativa que depende de la experiencia social. Poner a prueba esta hipótesis ha sido el objetivo de este estudio. Con este fin sometí a ratas Sprague-Dawley a distintos grados de socialización durante un mes. Luego las reuní, como desconocidas, en pares y les conté la frecuencia de bostezo y medí su susceptibilidad al contagio. Así mismo, y puesto que se conoce que la frecuencia de bostezo puede estar relacionada con andrógenos y con estrés, medí los niveles de testosterona y del glucocorticoide corticosterona en muestras de excretas de las ratas del estudio. El análisis de los resultados indica que, en efecto, el bostezo en ratas es un comportamiento cuya frecuencia depende de la condición social: las ratas que permanecieron aisladas bostezaron con una frecuencia menor que las que vivieron en grupos de 2 a 4 ratas. De modo similar, la intensidad del contagio del bostezo fue menor cuando las ratas vivieron aisladas que cuando vivieron en grupo. La testosterona y la corticosterona tuvieron un efecto positivo pero reducido en la frecuencia de bostezo. La testosterona también tuvo un efecto positivo, aunque ligero en la frecuencia de erecciones del pene. Estos resultados

permiten concluir que la experiencia social es un factor que favorece la presencia de bostezo y su contagio en ratas, posiblemente porque ambos comportamientos tienen una función comunicativa.

# Contenido

<b>1. SUSTENTO TEÓRICO</b>	<b>9</b>
1.1. Introducción .....	9
1.2. El bostezo .....	10
1.3. Mecanismos fisiológicos del bostezo .....	11
1.4. Efecto de la testosterona en la socialización .....	13
1.5. Hipótesis sobre la función del bostezo .....	14
1.5.1. La función homeostática del bostezo .....	15
1.5.2. La función comunicativa del bostezo .....	15
<b>2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>19</b>
<b>3. HIPÓTESIS Y PRECCIONES</b>	<b>20</b>
3.1. Hipótesis .....	20
3.2. Predicciones .....	20
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
4.1. General .....	20

4.2. Objetivos particulares .....	20
<b>5. MATERIAL Y MÉTODO</b>	<b>21</b>
5.1. Animales de estudio .....	22
5.2. Material y arreglo experimental.....	23
5.2.1. Cajas de observación y registro de bostezo .....	23
5.2.2. Arreglo experimental .....	23
5.3. Diseño experimental .....	24
5.4. Procedimiento experimental .....	26
5.4.1. Condición experimental .....	26
5.4.2. Modo de observación y registro de bostezo y erecciones del pene . . .	28
5.4.3. Ensayo inmuno-enzimático .....	30
5.5. Medición del contagio del bostezo .....	34
5.6. Análisis estadístico de los datos.....	36
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>42</b>
6.1. Frecuencia de bostezo .....	42

6.1.1.Efecto de la testosterona y corticosterona . . . . .	50
6.2. Frecuencia de erecciones . . . . .	56
6.2.1.Efecto de la testosterona y corticosterona . . . . .	61
6.3. Contagio de bostezo. . . . .	67
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>70</b>
<b>8. REFERENCIAS</b>	<b>78</b>

# 1. SUSTENTO TEÓRICO

## 1.1 Introducción

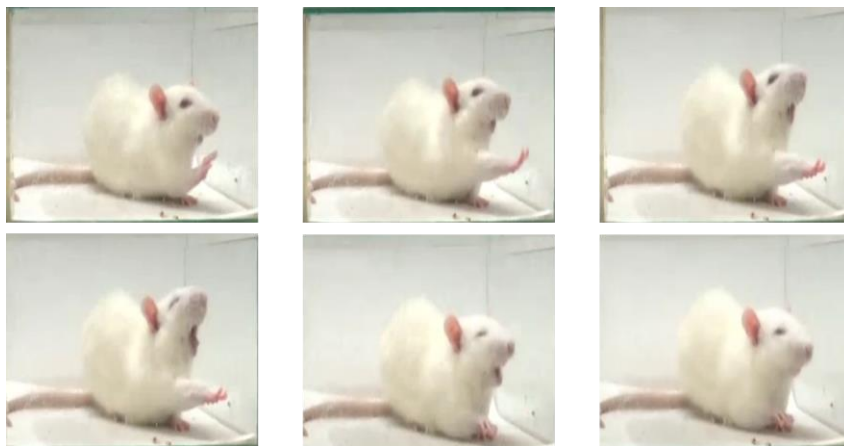
El bostezo es un comportamiento que presentan muchas especies de vertebrados. A pesar de la variedad de contextos en los que se le ha observado, se le puede clasificar en (i) bostezo fisiológico (i.e. homeostático) y (ii) bostezo comunicativo. Aun así, no se sabe definitivamente qué restaura y qué comunica. Se han adjudicado varias funciones al bostezo fisiológico, pero ninguna ha sido corroborada de manera definitiva. Con respecto al bostezo comunicativo, motivo de este estudio, se han sugerido menos hipótesis, pero tampoco se ha aportado evidencia definitiva para alguna de ellas. Parece que la expresión del bostezo comunicativo está vinculada a la experiencia social de los individuos, pues se sabe, por ejemplo, que ratas viviendo en condiciones de aislamiento disminuyeron su frecuencia de bostezo respecto de ratas que vivieron en grupo.

En este estudio puse a prueba la hipótesis de que el bostezo posee un carácter social. Con este fin sometí a ratas de la cepa Sprague-Dawley a distintos grados de socialización para luego presentarlas en pares, viniendo de jaulas distintas (i.e. ratas desconocidas), y medirles la intensidad del bostezo y contagio del mismo. Además, medí los niveles de testosterona y corticosterona presentes en las excretas de las ratas para luego controlar estadísticamente por el efecto de tales hormonas en el bostezo. También conté la frecuencia de erecciones del pene porque es un indicador de la acción de la

testosterona. En lo que sigue describiré lo que se conoce acerca del bostezo en general, y en particular del bostezo comunicativo con el fin de apoyar la hipótesis del estudio.

## 1.2 El bostezo

El bostezo es un comportamiento común a muchas especies de vertebrados. Se caracteriza por una apertura amplia de la boca acompañada de una profunda inspiración, seguida de un periodo de contracción de los músculos faciales y un cierre lento de la mandíbula en la espiración (Barbizet, 1958). A la vez, suele presentarse un estiramiento del esqueleto muscular orofacial (Figura 1), acompañado de un movimiento de la cabeza, salivación, lagrimeo, cierre de los ojos y una apertura de las trompas de Eustaquio (Provine, 2012).



**Figura 1:** Secuencia fotográfica de un bostezo en una rata Sprague-Dawley.

### 1.3 Mecanismos fisiológicos del bostezo

Las estructuras neuronales esenciales para bostezar se localizan en el tronco encefálico (Heusner, 1946), aunque las mismas parecen tener una conexión con las regiones corticales (Joshi y cols., 2017). Hay evidencia de que ciertos neurotransmisores, así como neuropéptidos, controlan la expresión del bostezo actuando principalmente en el núcleo paraventricular del hipotálamo (Collins y Eguibar, 2010). Actúan por medio de tres vías neuronales que convergen a través de neuronas colinérgicas en el hipocampo (Collins y Eguibar, 2010). Los dos tipos de neuromensajeros pueden ejercer un efecto excitatorio como se sabe que lo hacen la dopamina, acetilcolina, serotonina, oxitocina, el óxido nítrico, los aminoácidos excitatorios, y péptidos relacionados con la hormona adrenocorticotropina (Figura 2). Los péptidos opiáceos, en particular, ejercen un efecto inhibitorio (Argiolas y Melis, 1998; Daquin y cols., 2001).

Es importante mencionar que estos efectos generalmente han sido vinculados con el bostezo fisiológico, muchas veces estimulado farmacológicamente. Los mecanismos fisiológicos del bostezo comunicativo se han estudiado poco. La hipótesis de que el bostezo contagioso se basa en la capacidad de los individuos para empatizar, asume que las estructuras cerebrales responsables son las que subyacen a la empatía. Recientemente se publicó un artículo que indica que otras estructuras como la amígdala también podrían estar relacionadas con el bostezo comunicativo (Kubota, 2019).



positiva entre el nivel de estrés que pueden experimentar y la cantidad de corticosterona que segregan (Szuran y cols., 2000; Cockrem, 2007).

Además, se ha documentado la existencia de una correlación positiva entre el número de bostezos y los niveles de testosterona en mamíferos (Phoenix y Chambers, 1982). Al respecto, Holmgren y cols. (1980) observaron que el número de bostezos disminuyó en ratas castradas; por el contrario, el número aumentó cuando inyectaron testosterona a éstas (Holmgren y cols., 1980). Graves y Wallen (2006) también observaron un aumento en la frecuencia de bostezo en hembras adultas de macacos *Rhesus* cuando les inyectaron dihidrotestosterona. En conjunto, estos resultados sugieren que la testosterona participa en la actividad del sistema nervioso central relacionada con la generación del bostezo, aunque aún no hay un mecanismo descrito de su vía de acción.

#### **1.4 Efecto de la testosterona en la socialización**

Las hormonas sexuales como la testosterona en los machos y la progesterona en las hembras, juegan un rol esencial en el mantenimiento de varios aspectos de la vida de los animales. Por ejemplo, de las interacciones sociales que ocurren entre los individuos de una especie (López y cols., 1999). Así, se sabe que los niveles de testosterona aumentan en los monos macho *Alouatta pigra* que viven en grupo (Rangel–Negrin y cols., 2011). La socialización puede definirse como la condición durante la cual dos o más individuos responden recíprocamente a su comportamiento, y de manera persistente en el tiempo y

espacio (Slater y Halliday, 1994). Dichas interacciones pueden ser tanto cooperativas como competitivas; aun así, generalmente conducen a una unidad social estable.

La testosterona entonces está relacionada con las relaciones de dominancia y subordinación establecidas en una jerarquía. Por ejemplo, Ketterson (1992) encontró que la disposición de lucha de machos junco ojos negros (*Junco hyemalis*) estaba relacionada con una concentración elevada de testosterona, aunque los niveles de ésta podían variar con la edad y el peso corporal de los individuos de una especie (Ketterson, y cols., 1992). También existe evidencia que vincula a los comportamientos agresivos de los animales con un aumento de la testosterona; nuevamente, en los grupos en los que se establecen relaciones de dominancia y subordinación (Stenstrom y col., 2011). Puesto que el estatus social de los individuos en un grupo está relacionado con los niveles relativos de testosterona que presentan, puede inferirse por éstos el rol dominante o sumiso que aquellos desempeñan en una jerarquía de dominancia (Neave y cols., 2003). En conjunto estas evidencias sugieren que los niveles de testosterona, y otros esteroides sexuales, afectan la condición social de los animales (Oliveira y cols., 1996).

## **1.5 Hipótesis sobre la función del bostezo**

Existen varias hipótesis acerca de la función del bostezo, pero podríamos clasificarlas en dos grupos: las que proponen que tiene una función homeostática (i.e. bostezo fisiológico) y las que le atribuyen una función comunicativa. Los bostezos fisiológicos son espontáneos; es decir, no hay un estímulo externo aparente que los provoque. En cambio,

el bostezo comunicativo se presenta en un contexto social, en la presencia de conespecíficos (i.e. individuos de la misma especie); un caso particular es el bostezo que ocurre por contagio.

### **1.5.1 La función homeostática del bostezo**

Ejemplos de esta función putativa son la oxigenación del cerebro, hipótesis que ha sido ya descartada experimentalmente (Provine y cols., 1987); la que sugiere que hay una activación de la vigilia (Provine, 2005), ésta cuenta con evidencias encontradas. Otra hipótesis más es la que dice que el bostezo sirve como un mecanismo de termorregulación cerebral (Gallup y Eldakar, 2013), pero cuya evidencia es inconclusa. El bostezo (su frecuencia) también puede funcionar como un marcador de estados fisiológicos. Por ejemplo, del restablecimiento de un estado de calma (Moyaho y Valencia, 2002).

### **1.5.2 La función comunicativa del bostezo**

La existencia de este tipo de bostezo está documentada en especies de primates diferentes a los humanos, particularmente los que presentan un dimorfismo sexual en el tamaño corporal, los caninos, y la agresividad (Darwin, 1872). Por lo mismo, no sorprende que sea por la observación de que algunos de ellos muestran sus caninos cuando bostezan, que este comportamiento sea interpretado como una señal de amenaza (Redican, 1982; Troisi y cols., 1990; Deputte, 1994). También se ha propuesto que la

exhibición de los caninos durante el bostezo podría estar asociada con la identidad del individuo dominante en grupos de primates (Deputte, 1994).

Morfológicamente estos bostezos pueden tener una expresión diferente al bostezo fisiológico, pues algunos individuos como los babuinos (*Cercocebus albigea*) y los macacos (*Macacus fascicularis*) fijan su atención en el individuo blanco para monitorear su reacción en lugar de cerrar los ojos (Deputte, 1994), lo cual sí ocurre comúnmente en el bostezo fisiológico. Por eso este tipo de bostezo comunicativo ha sido vinculado con las manifestaciones intimidatorias que hacen los machos dominantes a los machos sumisos (Troisi y cols., 1990; Zucker y cols., 1998). Otra hipótesis sugiere que el bostezo facilita la disminución de la tensión social en un grupo (McKenzie, 1994). También, el bostezo se ha asociado con las conductas sustitutivas que exhiben algunos animales (Dellius, 1967). Sin embargo, en ninguno de estos casos existe evidencia experimental que apoye o refute la hipótesis correspondiente.

En otras especies como los peces siameses (*Betta splendens*) también hay evidencia que indica que el bostezo desempeña una función comunicativa. Díaz-Loyo (2016) encontró que los peces de esta especie ajustan su comportamiento después de presenciar bostezos, sugiriendo que hay comunicación entre los animales. Más aún, la frecuencia de bostezo de los peces siameses está directamente relacionada con una medición experimental de su capacidad fisiológica (Díaz-Loyo, 2021), por lo que puede suponerse que ésta es el mensaje comunicado en el bostezo.

Estudios recientes sugieren que incluso el bostezo contagioso en ratas es una manifestación comunicativa (Moyaho, 2015). Aunque tradicionalmente el bostezo contagioso ha sido asociado con la capacidad de empatía que poseen los primates, el modelo de acción-percepción descrito por de Waal y Preston (2017) sugiere que la mayoría de los mamíferos pueden tener la capacidad de empatizar, por lo que no sería inesperado hallar bostezo contagioso en diversas especies de vertebrados. También se ha sugerido que el bostezo contagioso serviría para promover la sincronización de las actividades grupales (Guggisberg y col., 2010). Sin embargo, otros autores como Gallup (2011) han advertido que los posibles mensajes transmitidos por el bostezo contagioso podrían ser inespecíficos, porque ocurren en circunstancias variadas. Por lo tanto, podrían ser interpretados incorrectamente. No obstante, sigue siendo común encontrar que el bostezo contagioso sea visto como un marcador de la capacidad que tienen los individuos para empatizar (Franzen y cols., 2018).

Aun cuando el vínculo entre la empatía y el contagio del bostezo fue propuesto hace más de 40 años (Lehmann, 1979), actualmente su existencia es debatida. Inicialmente se pensó que el bostezo era un fenómeno emocional, puesto que ocurría en situaciones de aburrimiento. Por lo tanto, el contagio del bostezo podría ser explicado como parte del contagio emocional, una forma rudimentaria de la empatía (Preston y deWaal, 2003). Otros estudios sugieren otras explicaciones. Por ejemplo, que los bostezos contagiosos son solo una imitación involuntaria que no involucra la empatía (Yoon y Tennie, 2010).

En general, hay evidencia creciente que descarta un nexo único o directo entre la empatía y el contagio, tanto del bostezo como de otros comportamientos (Hoole y cols., 2012; Hare y cols., 2015; Yu y cols., 2017). Aunado a esto, evidencia reciente proveniente de un estudio realizado en humanos (Juárez-Mora, 2021) hace concluir que la relación entre la actividad neurológica asociada con la empatía y la probabilidad de contagio del bostezo es escasa. Además, hay evidencia que sugiere que la susceptibilidad de una persona a contagiarse del bostezo de otra persona, podría estar determinada por la variación en los procesos de percepción (Provine, 1989) y significación del bostezo. De hecho, estos procesos presentan asimetrías hemisféricas cerebrales en la población humana (Juárez-Mora, 2021).

También hay evidencia que descarta, o al menos no pone como relación única, el nexo entre empatía y el contagio de bostezo. Por ejemplo, Moyaho y col. (2015) encontraron contagio de bostezo entre pares de ratas desconocidas que eran puestas en cajas contiguas transparentes con una división opaca y con perforaciones; este arreglo experimental permitía a las ratas mantener comunicación auditiva y olfatoria.

Moyaho y cols. (2015) usaron para el estudio descrito arriba ratas que han sido seleccionadas para bostezar frecuentemente (HY). Urbá-Holmgren y cols. (1990) obtuvieron este grupo de ratas a partir de cruzamientos selectivos que iniciaron con un macho Sprague-Dawley que bostezaba espontáneamente con una frecuencia elevada. Una cepa de ratas de este tipo ha ofrecido ventajas especiales, pues a la par se seleccionó

una cepa con una frecuencia relativamente baja de bostezo, lo que ha hecho posible estudiar comparativamente varios aspectos del bostezo. Por ejemplo, Moyaho y cols. (2008) hallaron inesperadamente que las ratas HY que habían sido destetadas y puestas luego en jaulas individuales, disminuían su tasa de bostezo en comparación con las que vivían en condiciones típicas. Este resultado llevó a los autores a sugerir que de alguna manera la vida en grupo mantenía la frecuencia elevada de bostezo (2008). Sin embargo, la validez externa de esos resultados es restringida, ya que se trata de una cepa de ratas con características particulares. Además, la condición social no fue manipulada experimentalmente, lo que hace pensar que otros factores pudieran ser los responsables de la disminución de la frecuencia de bostezo.

## **2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

Considerando lo expuesto arriba, en particular el hecho de que las ratas HY disminuyen su frecuencia de bostezo después de pasar un tiempo en aislamiento social, surge la pregunta siguiente:

¿Por qué las ratas disminuirían su frecuencia de bostezo luego de permanecer aisladas?

¿Y cómo ese aislamiento afecta su susceptibilidad a contagiarse el bostezo?

### **3. HIPÓTESIS Y PREDICCIONES**

#### **3.1 Hipótesis**

El bostezo y su contagio tienen un carácter social

#### **3.2 Predicciones**

Si la hipótesis que planteé es correcta esperaba hallar que:

- i. La frecuencia de bostezo aumentaría con el incremento en el número de individuos viviendo en grupo;
- ii. La intensidad del contagio de bostezo entre pares de ratas desconocidas aumentaría en la medida en que el número de ratas viviendo juntas también aumentara.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 General**

Confirmar que en efecto el bostezo y su contagio tienen un carácter social

#### **4.2 Objetivos particulares**

- i. Confirmar que existe contagio de bostezo por contacto olfatorio en ratas Sprague-Dawley;

- ii. Determinar el efecto que la condición social pudiera tener en la intensidad del contagio del bostezo;
- iii. Determinar el efecto que la testosterona pudiera tener en el bostezo;
- iv. Determinar el vínculo que la corticosterona pudiera tener con el bostezo.

## **5. MATERIAL Y MÉTODO**

Para poner a prueba las predicciones de la hipótesis llevé a cabo experimentos que consistieron en contar la frecuencia de bostezo y medir el contagio del mismo en pares de ratas desconocidas puestas en cajas de vidrio contiguas. Las cajas tienen 24 orificios distribuidos equidistantemente en uno de sus lados, fabricado de acrílico. Entre las cajas había una lámina hecha de acrílico opaco con 24 orificios que coinciden con los orificios de ambas cajas de vidrio. Colocaba una rata en cada caja y video filmaba su bostezo y erecciones del pene por una hora. Terminada la prueba experimental pesaba a las ratas y recogía sus deposiciones fecales que luego usaría para estimar la cantidad de testosterona y corticosterona aplicando pruebas de inmunoensayo enzimático, específicamente ELISA. Los videos eran observados por un observador ajeno al interés del estudio para registrar la frecuencia de bostezos y erecciones del pene. Las deposiciones fecales fueron observadas y registradas para contar con un correlato directo de las mediciones de testosterona.

## 5.1 Animales de estudio

Utilicé 96 ratas macho adultas de la cepa Sprague-Dawley; sus edades variaron entre 51 y 57 días de vida. Las ratas provinieron del Bioterio Claude Bernard. Ahí fueron mantenidas habitualmente en condiciones controladas de temperatura y un periodo de luz oscuridad de 12 horas (las luces son encendidas a las 7:00 horas). Las ratas tenían acceso ilimitado a alimento y agua. El Bioterio Claude Bernard está certificado, por lo que las condiciones de manejo y cuidado de los animales siguen estándares establecidos institucionalmente. La Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la BUAP aprobó el estudio y el número de animales empleados para el mismo (No. de proyecto: 0109).

Las ratas eran transportadas al laboratorio de Ecología de la Conducta un día antes de iniciar los experimentos. Ahí, las condiciones de mantenimiento eran similares a las del Bioterio Claude Bernard: temperatura ambiente de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y ciclo de luz oscuridad de 12 horas. El alimento, las jaulas y la paja para mantener a las ratas durante los experimentos fueron proporcionados por el Bioterio Claude Barnard; el agua para los bebederos se tomaba de garrafones de agua potable comercialmente disponibles. La manipulación de las ratas se apegó a los criterios de cuidado recomendadas por ABS y ASAB (Buchanan y cols., 2012).

## **5.2 Material y arreglo experimental**

### **5.2.1 Cajas de observación y registro de bostezo**

Para las observaciones y registros de bostezo y erecciones del pene usé cajas de vidrio (19 x 19 cm de lado x 10 cm de altura y 3 mm de espesor) con una de sus paredes hecha de acrílico (19 X 10 cm y 3 mm de espesor), la cual tiene 24 orificios (0.5 cm de diámetro) que permitían a las ratas olfatearse. El par de cajas contiguas dispuestas para las observaciones (ver más abajo) tenía una división de acrílico opaco (19 cm de ancho, 30 cm de altura, 3 mm de espesor) con igual número y correspondencia de perforaciones que las cajas de observación. Por lo tanto, se creó una condición experimental en la que las ratas tuvieron comunicación olfatoria, y probablemente auditiva.

Las cajas de observación eran limpiadas antes de cada ensayo experimental. Con este fin preparé una solución: alcohol isopropílico, 50 mL; alcohol etílico, 150 mL; extran, 100 mL; pinol, 100 mL; hidróxido de amonio, 5 mL; y agua, 595 mL. Usaba la misma solución para limpiar las cajas de acrílico que utilizaba para pesar a las ratas antes de cada ensayo experimental. Y también con ella limpiaba la mesa en la que se colocaban las cajas de observación.

### **5.2.2 Arreglo experimental**

Para los ensayos experimentales ponía a las ratas en sus respectivas cajas de observación dentro de un cuarto diseñado ex profeso. Para ello, primero ponía en el piso de cada caja de observación un cuadrado (19 cm) de papel filtro (grado 615; tamaño de

poro 8  $\mu\text{m}$ ; y velocidad media de flujo) que cubría completamente la superficie de vidrio. Luego colocaba ambas cajas sobre una mesa plana de madera (99 cm de largo, 89 cm de ancho, 85 cm de altura). Finalmente, colocaba un par de videocámaras (2K Series – 1080p HD; Swann) que me servían para filmar cada ensayo experimental; dos lámparas de 75 W (Slimline, Osram, Alemania) que prendían del techo iluminaban el arreglo experimental. Las videocámaras estaban sobre la mesa de madera, en lados opuestos, paralelas al arreglo de las cajas de observación para tener imágenes desde ángulos opuestos. De ese modo aseguraba una observación completa de las ocurrencias de bostezo y erecciones de pene.

Las video cámaras estaban conectadas a una computadora que estaba afuera del cuarto de observación. Antes de iniciar cada video filmación me cercioraba de la correcta disposición de las cámaras y filmación. Utilicé el software Windows Live Movie Maker (Windows 7, Microsoft Corporation) para video grabar las observaciones.

### **5.3 Diseño experimental**

Usé un diseño unifactorial con 4 niveles; esto es, las 4 condiciones experimentales a las que sometí a las ratas: 1) ratas viviendo solas, 2) viviendo en pares, 3) viviendo en tríos, y 4) viviendo en cuartetos. En adelante me referiré a estas condiciones experimentales como condición solitaria, condición díada, condición tríada, y condición cuarteto, respectivamente.

Usé 10 pares de ratas para cada condición experimental, para tener el mismo número de videograbaciones de cada condición experimental, 16 ratas tomadas aleatoriamente no fueron utilizadas. Pero, como no tuve acceso a todas las ratas a la vez, agrupé los experimentos en función de la disponibilidad de las mismas. Usé por lo tanto 4 bloques experimentales incompletos balanceados (Moyaho y Beristain-Castillo, 2015); el primer y tercer bloque consistieron de 3 pares de ratas de la condición cuarteto; 3 pares de ratas de la condición tríada; 2 pares de ratas de la condición díada; y 2 pares de ratas de la condición solitaria. El segundo y cuarto bloque los formé con 2 pares de ratas de la condición cuarteto; 2 pares de ratas de la condición tríada; 3 pares de ratas de la condición díada; y 3 pares de ratas de la condición solitaria (Tabla 1).

**Tabla 1.** Diseño unifactorial con 4 niveles y 4 bloques experimentales incompletos balanceados.

<b>Condiciones experimentales</b>				
<b>Bloques</b>	Solitarios	Díadas	Tríadas	Cuartetos
<b>I</b>	2*	2	3	3
<b>II</b>	3	3	2	2
<b>III</b>	2	2	3	3
<b>IV</b>	3	3	2	2

\*Los números se refieren al número de parejas utilizadas.

En cada bloque experimental, las camadas de ratas nacieron en días cercanos entre sí, de 1 a 7 días de diferencia. El día en que las ratas de esas camadas fueron destetadas,

primero elegí aleatoriamente a los machos requeridos de cada camada para formar las condiciones experimentales. Y luego puse a las ratas de cada condición experimental en jaulas (49 x 36 x 19 cm, largo x ancho x altura). Así, conseguí que (i) no hubiera hermanos en la misma condición experimental, y que (ii) obtuviera al final jaulas donde había una, dos, tres o cuatro ratas. Dependiendo del número de camadas disponibles para cada bloque experimental, algunas veces tuve más de una condición experimental (e.g. cuatro jaulas con la condición díada).

Para los experimentos elegía aleatoriamente pares de machos, cada uno de los machos de jaulas distintas, pero de la misma condición experimental. Por ejemplo, tomaba 2 machos, cada uno de jaulas donde estaban viviendo 3 ratas en cada jaula. De este modo podía formar, como en este caso particular, un par de machos desconocidos que representaban a la condición tríada.

## **5.4 Procedimiento experimental**

### **5.4.1 Condición experimental**

Tres días antes del destete de las ratas, acudía al Bioterio Claude Bernard a marcar a las ratas (con un plumón permanente) en la cola para asignarles un número de identificación. El número de ratas macho varió de 2 a 9 machos por camada. Luego realizaba—en el laboratorio—una asignación aleatoria de las jaulas donde alojaría a las ratas. Por ejemplo, si una camada tenía 6 machos, el macho número 3 podía ser asignado a la condición

día, el macho número 5 a la condición solitaria, el macho número 2 a la condición tríada, el macho número 6 a la condición cuarteto; y los dos machos restantes (1 y 4) no ser asignados a ninguna condición experimental. Al realizar la asignación a las condiciones experimentales verificaba que no quedaran ratas hermanas en la misma condición experimental; es decir, dos ratas macho de la misma camada no podían estar ambas en la condición cuarteto, ésta tenía que ser formada con machos de 8 camadas diferentes.

Los días del destete de los críos acudía nuevamente al Bioterio Claude Bernard a pesar a cada una de las ratas que utilizaría para formar las condiciones experimentales. Alojaba a las ratas en las jaulas que les correspondían con base en la aleatorización previa, y volvía a marcarlas. Así mismo, tomaba el peso corporal de cada una de ellas. Una vez formadas las condiciones experimentales, asignaba un número a cada jaula. Después aleatorizaba los números de las jaulas para saber en qué orden las acomodaría en los estantes del cuarto donde permanecerían 30 días con agua y comida ad libitum, y con las condiciones que el personal del Bioterio Claude Bernard provee habitualmente a todas las ratas.

Al cabo de los 30 días, las ratas eran trasladadas del Bioterio Claude Bernard a un cuarto de animales en el Instituto de Fisiología; el cuarto es contiguo al laboratorio de Ecología de la Conducta. Las jaulas con las ratas eran acomodadas con base en un arreglo aleatorio en los estantes que tiene el cuarto de animales. Aprovechaba la ocasión para remarcar los números de las ratas. Las condiciones ambientales del cuarto de animales se

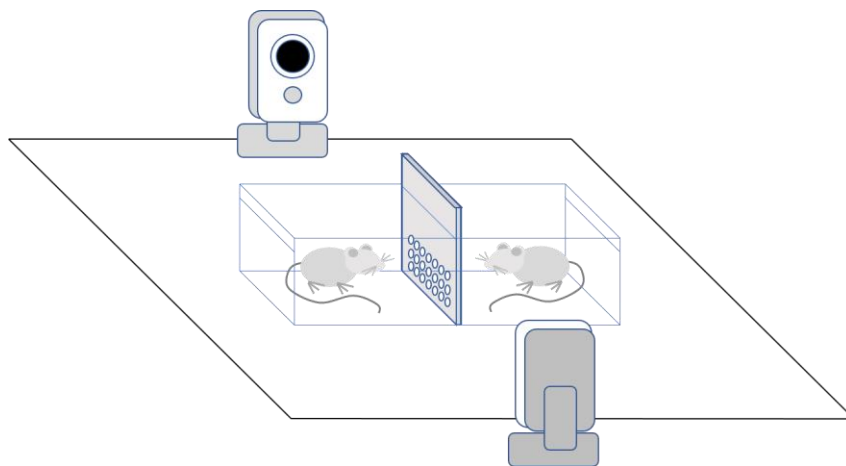
mantuvieron constantes; la temperatura se mantenía  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y con un ciclo de luz oscuridad 12/12 h (las luces se encienden a las 7:00 h).

#### **5.4.2 Modo de observación y registro del bostezo y erecciones de pene**

Un día después de que trasladaba a las ratas al cuarto de alojamiento, comenzaba a hacer las observaciones y registro de bostezo y erecciones de pene. Determinaba diariamente y de modo aleatorio el par de ratas a observar, y con ello, la condición experimental. Por ejemplo, podía elegir a la rata 3 de una jaula de condición cuarteto, con la rata 2 de otra jaula de condición cuarteto. Luego aleatorizaba el orden de ejecución de los ensayos experimentales; realizaba dos ensayos experimentales por día, con excepción de dos días cuando realicé 3.

Trasladaba al laboratorio a las dos jaulas con las ratas alojadas en ellas, incluidas las ratas del par a observar. Posteriormente pesaba a las ratas del par y trasladaba las jaulas al cuarto de observación donde realizaría las observaciones y video grabaciones. La temperatura del cuarto de observación fue aproximadamente constante:  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Pasado un periodo de aclimatación de 15 min colocaba individualmente a las ratas del par en las cajas de observación. Luego retiraba las jaulas con el resto de las ratas del cuarto de observación. Las cajas de observación habían sido colocadas previamente en la mesa para ese fin, una junto a la otra y con la división de acrílico opaco en medio de las dos. Inmediatamente después de colocar cada una de las ratas en las cajas de observación, iniciaba las grabaciones de donde obtendría después la frecuencia de bostezo y

erecciones de pene (Figura 3). La observación y registro duraba una hora; la primera grabación comenzaba a las 8:30 am, la segunda grabación iniciaba a las 10:00 am, y la tercera grabación iniciaba a las 11:30 am.



**Figura 3:** Esquema del arreglo de las condiciones de observación y video grabación del bostezo y erecciones de pene en pares de ratas alojadas en cajas contiguas con una separación opaca y con perforaciones.

La frecuencia y duración de bostezo, y las erecciones de pene fueron los comportamientos observados y registrados a través de las video grabaciones. También las deposiciones fecales fueron contadas una vez concluida la observación correspondiente. Los bostezos se definen como una apertura de la boca, retención de la posición de la boca abierta por unos instantes y un cierre repentino (Barbizet, 1958). Las erecciones de pene consisten en envites pélvicos con la rata sentada en posición vertical, un pene hinchado y posteriormente el lamido del área perigenital, e incluso la ingesta de la eyaculación (Bagdy y Makara, 1995). Las deposiciones fueron la cantidad de los bolos fecales dejados por las ratas en el papel filtro del piso de las cajas de observación.

Al finalizar cada ensayo experimental las ratas eran pesadas y regresadas a sus jaulas habituales. Posteriormente volvía a pesar las cajas de observación, las cuales contenían las deposiciones fecales dejadas por las ratas del ensayo experimental concluido. Ponía las deposiciones fecales en tubos de microcentrífuga (1.5 mL, Eppendorf) que luego refrigeraba en un ultracongelador (-80° Celsius, Revco) donde permanecían hasta que realicé los ensayos inmuno-enzimáticos EIA para medir las hormonas (ver más adelante). Este procedimiento inmuno enzimático no invasivo se usa regularmente en varias especies de mamíferos para cuantificar esteroides (Touma y Palme, 2005); la finalidad es evitar el estrés que una extracción sanguínea puede causar.

#### **5.4.3 Ensayo inmuno-enzimático**

Usé un *kit* comercial de un ensayo inmuno-enzimático (Enzo Biochem, Inc., Farmingdale, Nueva York) para hacer por triplicado las estimaciones de los niveles de la testosterona y corticosterona, incluidos todos los estándares (Figura 4). Extraje los esteroides totales siguiendo el siguiente protocolo.

- i. En un vaso de precipitado (200 mL) preparaba 50 mL de una solución denominada solución B, la cual estaba compuesta por metanol/agua 80:20 por ciento.
- ii. Enseguida trasladaba las muestras fecales desde donde estaban almacenadas (ultracongelador) hasta el laboratorio en donde las secaba y homogenizaba. Para secar las muestras, abría los tubos donde estaban almacenadas y los metía en un deshidratador (Deshidratador de Alimentos Hamilton Beach Blanco, modelo 32100,

potencia 500 W, voltaje 120 V) a 50° C durante 48 horas. Posteriormente homogenizaba cada muestra con un mortero liso, y las almacenaba en nuevos tubos de polipropileno (Eppendorf) que colocaba en bolsas de plástico (Siplock) donde permanecían hasta el momento de procesarlas.

- iii. Cuando tuve todas las muestras secas, tomaba 0.05 gramos de cada una y los colocaba en un tubo de polipropileno limpio (1.5 mL, Eppendorf); luego los disolvía en 1 mL de la solución B y los colocaba en un agitador en vórtice (Barnstead/Thermolyne 2555, Modelo No. M16715, Serie No. 268000856723) durante 5 segundos.
- iv. Una vez realizada la disolución, tomaba 5 tubos y los agitaba con su homogenizado en el agitador en vórtice por 10 minutos.
- v. Al terminar, centrifugaba los tubos en una microcentrífuga (Centrifuga 5430/5430 R) por 15 minutos a 2500G.
- vi. Recolectaba con una micropipeta 100 µL del sobrenadante de cada una de las muestras y los transfería a microtubos de polipropileno estériles (1.5 mL; Eppendorf) que almacenaba en un refrigerador (Mabe, modelo: RM10BM, No. De serie: 9712A042234) a -20°C hasta el momento de correr el ensayo. Realizaba este procedimiento por duplicado debido a que necesitaba 100 µL para medir la concentración de testosterona, y también necesitaba 100 µL para medir la concentración de corticosterona.

- vii. Para realizar la cuantificación de las hormonas utilizaba *kits* comerciales de testosterona y corticosterona (ENZO), y seguía las instrucciones que los acompañan para la preparación y corrimiento de las muestras.



**Figura 4.** Esquema general que muestra las diversas etapas de la extracción y cuantificación de los metabolitos de testosterona y corticosterona.

El procedimiento que seguí para medir la testosterona es como sigue: primero vertía con una pipeta 100  $\mu\text{L}$  de diluyente estándar (amortiguador de ensayo 3 o medio de cultivo tisular) en los pozos NSB y pozos Bo (0 pg/mL estándar). Luego colocaba con una pipeta 100  $\mu\text{L}$  de los estándares número 1 a número 5 en los pozos apropiados. Enseguida transfería con una micropipeta 100  $\mu\text{L}$  de las muestras, previamente diluidas (1:10 con amortiguador estándar), en los pocillos correspondientes. Después transfería 50  $\mu\text{L}$  del tampón de ensayo número 3 al pozo del NSB, y depositaba 50  $\mu\text{L}$  del anticuerpo amarillo en cada pocillo, excepto los pocillos blanco, TA y NSB. Inmediatamente incubaba la placa a temperatura ambiente en un agitador de placas (Barnstead/ Thermolyne M71735 Slow

Speed Roto Mix) durante una hora a 500 rpm. Posteriormente vertía con una pipeta 50  $\mu\text{L}$  de conjugado azul en cada pocillo, excepto en los pocillos de actividad total (TA) y en el pocillo blanco. Posteriormente volvía a incubar la placa a temperatura ambiente en un agitador de placas durante una hora a 500 rpm.

Una vez finalizada esa fase de agitación, vaciaba el contenido de los pocillos y los lavaba añadiendo 400  $\mu\text{L}$  de solución de lavado en cada uno de los pozos; repetía el lavado 2 veces más. Cuando finalizaba los lavados, vaciaba los pocillos y golpeaba el plato sobre una toalla de papel sin pelusa para quitar los restos de cualquier tampón de lavado. Después añadía 5  $\mu\text{L}$  del conjugado azul a los pocillos TA y agregaba 200  $\mu\text{L}$  de la solución de sustrato pNpp (solución cromóforo) a cada pocillo. Entonces cubría el plato con el sellador de placas proporcionado en el *kit*, y luego lo incubaba a 37 ° C durante una hora sin agitarlo. Transcurrida la incubación añadía 50  $\mu\text{L}$  de la solución de retención de la reacción en cada pozo. Finalmente leía la placa con un lector de placas (BioTek, Synergy HT). Lo hacía poniendo en blanco el lector de placas contra los pocillos en blanco; leía la densidad óptica a 405 nm con corrección entre 570 y 590 nm, y utilizando una curva de calibración estándar, realizaba el cálculo de la medición de la testosterona.

Seguí un procedimiento similar para medir la corticosterona, excepto que en este caso añadía inmediatamente el anticuerpo amarillo después de añadir el anticuerpo azul; al terminar, incubaba la placa con agitación por dos horas. Luego de la incubación, realizaba los lavados, agregaba el pNpp e incubaba la placa a temperatura ambiente

durante una hora. Al finalizar la segunda incubación, seguía los mismos pasos que seguí para la medición de la testosterona.

## **5.5 Medición del contagio del bostezo**

Los videos fueron revisados por un observador voluntario quien fue entrenado para observar e identificar los bostezos y erecciones de pene; usé definiciones operacionales y videos de prueba para tal fin. El observador anotaba el minuto y segundo de ocurrencia de cada bostezo de cada rata en hojas de papel diseñadas ex profeso, y la presencia y duración de las erecciones de pene. Vací los registros hechos por el observador en una hoja de cálculo para el análisis estadístico posterior.

Además de analizar la frecuencia de bostezos y erecciones de pene, hice un análisis para determinar la presencia de contagio del bostezo. Definí a éste como un aumento en la probabilidad de bostezar de una rata después de que la rata en la caja de observación contigua había bostezado (Moyaho y cols., 2014). Para medirlo usé el procedimiento sugerido por Moyaho y cols. (2019). Este procedimiento consiste en ponderar el número total de bostezos de una rata, dentro y fuera de una ventana de tiempo determinada, tomando en cuenta la proporción del tiempo de observación correspondiente a los bostezos dentro y fuera de la ventana de tiempo.

Por ejemplo, supongamos que observo 12 min a las ratas A y B, y que registro bostezos en los siguientes tiempos (Tabla 2):

**Tabla 2.** Relación del tiempo en el que dos ratas bostezan.

<b>Ratas</b>	<b>Tiempo en minutos</b>		
<b>Rata A</b>	2.5*	5.4	7.3
<b>Rata B</b>	1.2	6.4	9.5

\*Secuencia temporal (12 min) de la ocurrencia de bostezo en dos ratas.

Supongamos también que 3 min es la ventana que estoy usando como criterio para determinar la presencia de contagio de bostezo. Bien, desde la perspectiva de la rata A, los periodos de tiempo durante los cuales la rata B no bostezó dentro de los pasados 3 minutos fueron de 0 a 1.2 minutos, de 4.2 a 6.2 y de 9.2 a 9.5 minutos (es decir, 3.5 minutos de tiempo sin bostezo). El número de veces que la rata A bostezó durante esos tiempos fue 1, por lo que la tasa de bostezo producido por un estímulo distinto al bostezo es de  $1/3.5$  (es decir, 0.29). En consecuencia—recordemos que la rata A bostezó 3 veces—la tasa de bostezo producido por un estímulo bostezo es de  $2/8.5$  (es decir, 0.24). Del mismo modo, desde la perspectiva de la rata B, los periodos de tiempo durante los cuales la rata A no bostezó dentro de los últimos 3 minutos fueron de 0 a 2.5 minutos y de 10.3 a 12 minutos, lo que da un total de 4.2 minutos. El número de veces que la rata B bostezó dentro de esos periodos fue 1, por lo que la tasa de bostezo producido por un estímulo diferente al bostezo es de  $1/4.2$  (es decir, 0.24). Entonces, la tasa de bostezo estimulado por bostezo es  $2/7.8$  (es decir, 0.26).

Usé una secuencia continua de ventanas de tiempo con duraciones consecutivamente crecientes. Comparé la curva resultante con una distribución aleatoria del número de bostezos de cada rata. Y desde luego, apliqué el mismo análisis tratando de identificar contagio de bostezo a lo largo de las ventanas de tiempo. Así conseguí contrastar lo que observé en cuanto a intensidad de contagio del bostezo contra lo que esperaba obtener si la ocurrencia de bostezos caía aleatoriamente en el tiempo de observación. En la sección de resultados haré una descripción detallada de esta comparación.

## 5.6 Análisis estadístico de los datos

Los datos fueron analizados aplicando estadística bayesiana. Así se hizo por dos razones. La primera es que los datos provienen de una muestra pequeña, y la estadística tradicional no puede, en general, aplicarse a este tipo de muestras (McElreath, 2020). La segunda razón es que los paquetes estadísticos provenientes de la estadística tradicional son inestables, cuando se usan para ajustar modelos lineales generalizados mixtos (Zuur y cols., 2017), que es el caso en esta tesis. Los paquetes que provienen de la estadística bayesiana no parecen presentar estos inconvenientes.

De manera muy simplificada se puede decir que la aplicación de modelos estadísticos bayesianos provee una distribución llamada distribución *a posteriori* (posterior en el idioma inglés) de las probabilidades relativas de los distintos valores que puede tomar cada parámetro (o una combinación de éstos). Para lograrlo, el modelo estadístico (el *software*) requiere que se le informe lo que se sabe acerca del parámetro o relación entre

parámetros. Esa información previa se conoce como la distribución *a priori* (prior en el idioma inglés), y con ella el modelo hace una actualización de las probabilidades relativas de todas las combinaciones posibles de los valores que pueden tomar los parámetros del modelo estadístico. A diferencia de la estadística convencional, cuya aplicación resulta en un solo valor para cada parámetro del modelo estadístico, la estadística bayesiana ofrece una distribución de probabilidades relativas de los valores que podría tomar el/los parámetro.

Para los análisis estadísticos se utilizaron distribuciones *a priori* reguladoras; es decir, que su rango de valores se establece de manera que no haya un sobre ajuste o sub-ajuste del modelo estadístico aplicado. Consecuentemente, son distribuciones *a priori* que se determinan de acuerdo con suposiciones razonables acerca de los datos, antes de conocer éstos. Los valores de las distribuciones *a priori* utilizados aquí se determinaron a partir de los resultados, aunque vagos, de investigaciones previas acerca de la frecuencia de bostezo en la cepa de ratas Sprague-Dawley. (Dorantes-Nieto y cols., 2020).

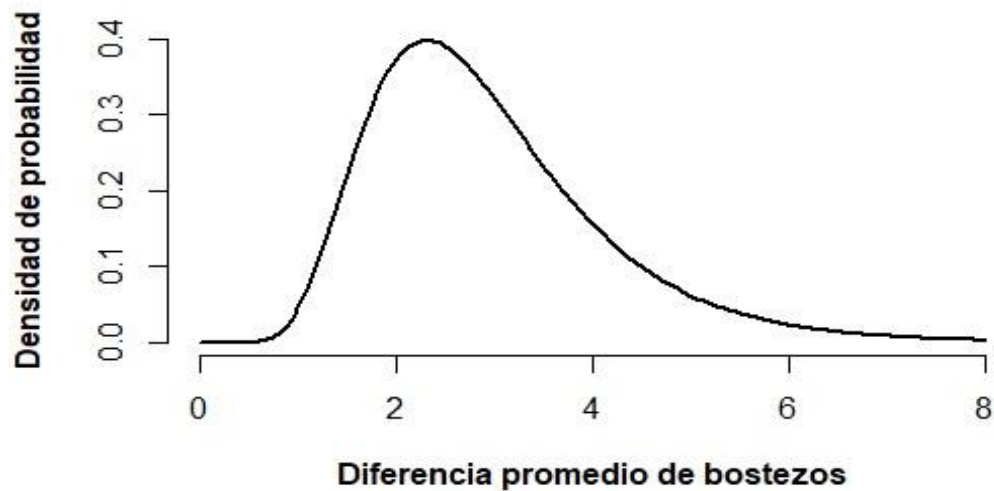
Puesto que se ha documentado una correlación positiva entre la frecuencia de bostezo y de erecciones del pene en ratas (Argiolas, y cols., 1986; Argiolas, y cols., 2000), utilicé las mismas distribuciones *a priori* para ambos comportamientos. A continuación, presento las distribuciones *a priori* para la frecuencia de bostezos (Figura 5); puede apreciarse que en efecto el rango de valores es consistente con la frecuencia baja de bostezo que se ha reportado para esta cepa de ratas.



**Figura 5.** Distribución *a priori* del número promedio de bostezos por rata de la cepa Sprague-Dawley.

El reporte referido más arriba indica que el número promedio de bostezos por hora oscila entre 1 y 4, siendo poco probable observar frecuencias más altas que esas. El promedio de la distribución *a priori* de la Figura 5 es de 2.27 bostezos. Es despreciable la diferencia con respecto a lo que se ha reportado para las ratas Sprague- Dawley ( $1.8 \pm 0.45$ ; promedio  $\pm$  desviación estándar).

De acuerdo con la escasez de bostezo reportado para la cepa de ratas Sprague-Dawley, no se esperaría que la diferencia entre las condiciones experimentales, a las que fueron sometidas las ratas en este estudio, fuera abundante. Por esta razón la distribución *a priori* respectiva (Figura 6) tiene un rango de valores cuyo promedio por hora ( $2.94 \pm 1.23$ ) es relativamente bajo.



**Figura 6.** Distribución *a priori* de la diferencia promedio esperada de bostezos entre las condiciones experimentales a las que fueron sometidas las ratas en este estudio.

En el análisis estadístico la frecuencia de bostezos y erecciones de pene representan variables dependientes; mientras que la condición experimental representa la variable independiente; es decir, una variable de efectos fijos en el modelo estadístico. Además, como cada par de ratas fue observada bajo la misma condición, y, por lo tanto, ésta puede producir mediciones correlacionadas, la identidad de cada par de ratas fue incluida en el análisis estadístico como una variable de efectos aleatorios. La misma asignación procedió para el bloque experimental. De ahí la razón de aplicar modelos lineales generalizados mixtos. La condición de mixto también se conoce como multi nivel, y jerárquico (McElreath, 2020). Los niveles de corticosterona y testosterona fueron incluidos en el modelo estadístico como covariables.

Se asumió una distribución Poisson para las frecuencias de los bostezos y erecciones de pene. En la estadística bayesiana ambas distribuciones son las funciones de verosimilitud de los datos, dado el parámetro o los parámetros. Y es el producto de ésta y la distribución *a priori* que resulta en la distribución *a posteriori*. El procedimiento matemático correspondiente es variado; los más populares son INLA, Integrated Nested Laplace Integration (Zuur et al. 2017) y MCMC, Markov Chain Monte Carlo (McElreath, 2020). Aquí se utilizó el paquete *rethinking* en R (el cual usa MCMC) para hacer los análisis estadísticos. Este paquete depende a su vez del paquete *rstan*.

Presento los resultados como distribuciones marginales y gráficas de las distribuciones *a posteriori*. Estas gráficas contienen la probabilidad relativa de los valores distintos que puede adoptar cada parámetro del modelo en función de los datos y el modelo estadístico aplicado (McElreath, 2020). Es decir, la compatibilidad relativa de los distintos valores estimados para cada parámetro con los datos, de acuerdo con el modelo aplicado. Las distribuciones marginales presentan el promedio de los valores estimados del parámetro que se trate, junto con un intervalo de compatibilidad al 89 %. El valor de este intervalo varía dependiendo del propósito que cada investigador tiene respecto a lo que desea comunicar. El utilizado aquí es el que utiliza el paquete *rethinking* por defecto.

La estructura matemática del modelo ajustado a los datos aparece enseguida. Es una forma de presentación convencional entre los estadísticos, y aunque la serie de

términos puede parecer intrincada, sigue en realidad una relación lógica. El modelo, además de incluir la asociación esperada entre las condiciones experimentales y la frecuencia de bostezo/erecciones, también pone a prueba si las diferencias en las concentraciones de testosterona y corticosterona entre las ratas, covarían con las diferencias promedio en la frecuencia de bostezo/erecciones.

$$B_i \sim \text{Poisson}(\lambda_i)$$

$$\log \lambda_i = \alpha_{rata[i]} + \gamma_{par[i]} + \delta_{bloque[i]} + \beta_{testosterona[i]} T_i + \beta_{corticosterona[i]} C_i$$

$$\beta_j \sim \text{Normal}(1, 0.4), \text{paraj} = 1..4$$

$$\alpha_j \sim \text{Normal}(\bar{\alpha}, \sigma_\alpha), \text{paraj} = 1..20$$

$$\gamma_j \sim \text{Normal}(0, \sigma_\gamma), \text{paraj} = 1..10$$

$$\delta_j \sim \text{Normal}(0, \sigma_\delta), \text{paraj} = 1..4$$

$$\bar{\alpha} \sim \text{Normal}(0.5, 0.8)$$

$$\sigma_\alpha \sim \text{Exponential}(1)$$

$$\sigma_\gamma \sim \text{Exponential}(1)$$

$$\sigma_\delta \sim \text{Exponential}(1)$$

$$R \sim \text{LKJcorr}(2)$$

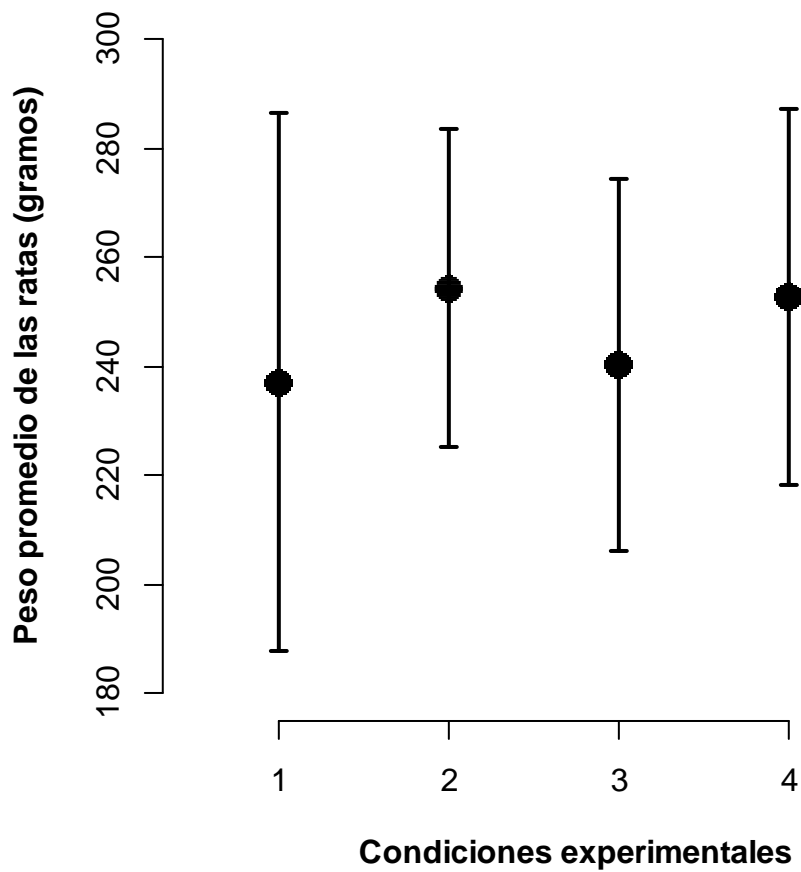
Como no todas las ratas defecaron, solo tomé en cuenta los datos de las ratas que sí lo hicieron. Presento los resultados como distribuciones marginales de las estimaciones de los parámetros, junto con intervalos de compatibilidad del 89% (IC<sub>89%</sub>). Además, incluyo las distribuciones que resultan de los contrastes de interés. Estas distribuciones de densidad de probabilidad son extraídas de la distribución *a posteriori* que arroja la aplicación del modelo estadístico.

Para el caso de la concentración de testosterona utilicé los siguientes valores para las distribuciones *a priori*: Intercepto (no. promedio de bostezos): 0.5 y desviación estándar (sigma) de 0.8; pendiente (promedio): -1 y sigma de 0.5; diferencia promedio entre condiciones experimentales: 1 y sigma de 0.4. Usé los mismos valores para el caso de la corticosterona, pues como ocurre entre el bostezo y la testosterona, el estrés, y por lo tanto indirectamente la corticosterona, está asociado positivamente con el bostezo. Los valores de la concentración de la testosterona fueron estandarizados para agilizar el desempeño computacional del programa estadístico.

Para medir el contagio de bostezo tomé para el análisis respectivo sólo los pares de ratas en las que ambas ratas habían bostezado al menos una vez.

## **6. RESULTADOS**

La Figura 7 muestra los valores esperados del peso promedio para las ratas que fueron expuestas a las distintas condiciones experimentales. Puede advertirse que, el peso promedio no se vió afectado por las condiciones experimentales a las que las ratas fueron expuestas.

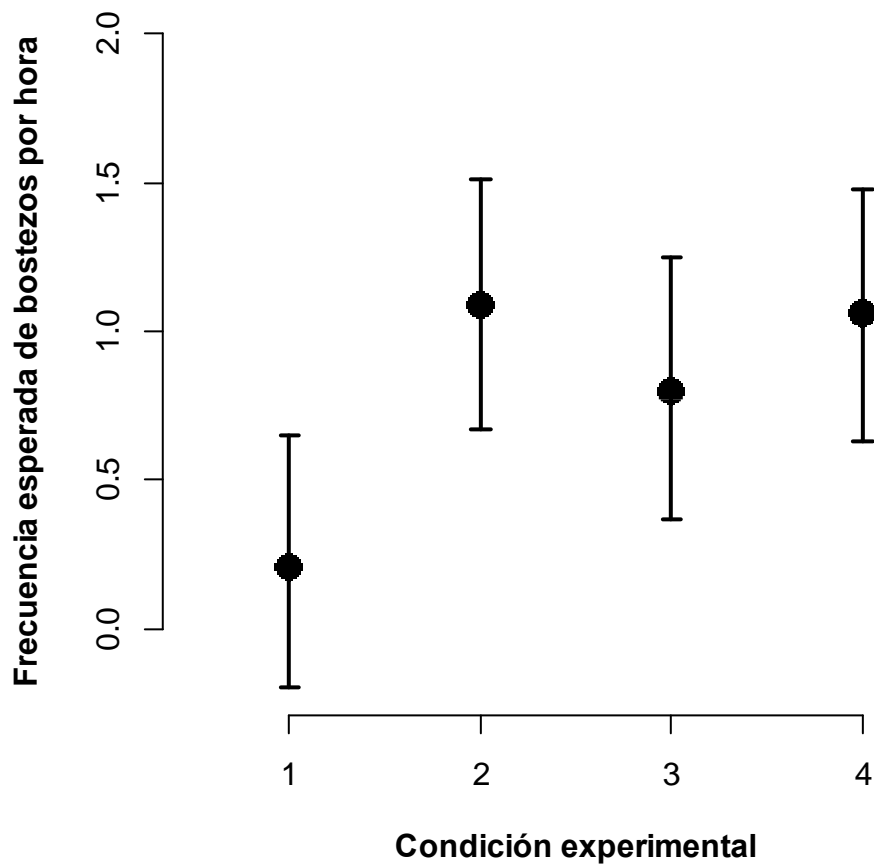


**Figura 7.** Peso promedio de las ratas en gramos en función de las condiciones experimentales a las que las ratas fueron expuestas. Los círculos representan los promedios esperados y las barras la desviación estándar del promedio.

### 6.1 Frecuencia de bostezo

La Figura 8 muestra el efecto de la condición experimental en la frecuencia de bostezo, habiendo controlado (i.e. tomado en cuenta) por el efecto de la testosterona y corticosterona. En la figura podemos observar diferencias aparentes entre la condición

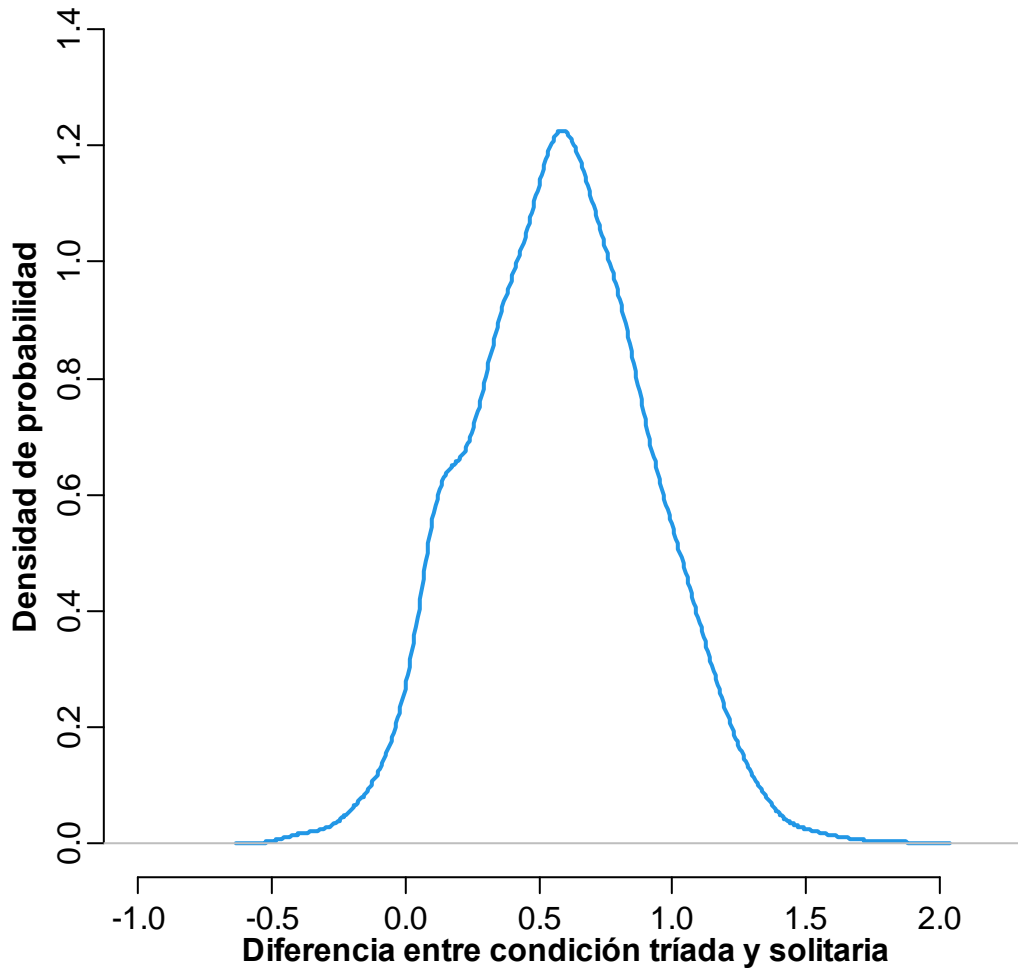
experimental solitaria y díada, y entre la condición experimental solitaria y cuarteto; aunque también se observan diferencias menos obvias entre la condición experimental solitaria y tríada.



**Figura 8.** Frecuencia esperada de bostezos por hora en función de la condición experimental (no. de ratas por grupo). Los círculos representan los promedios esperados y las barras el intervalo de compatibilidad al 89 %.

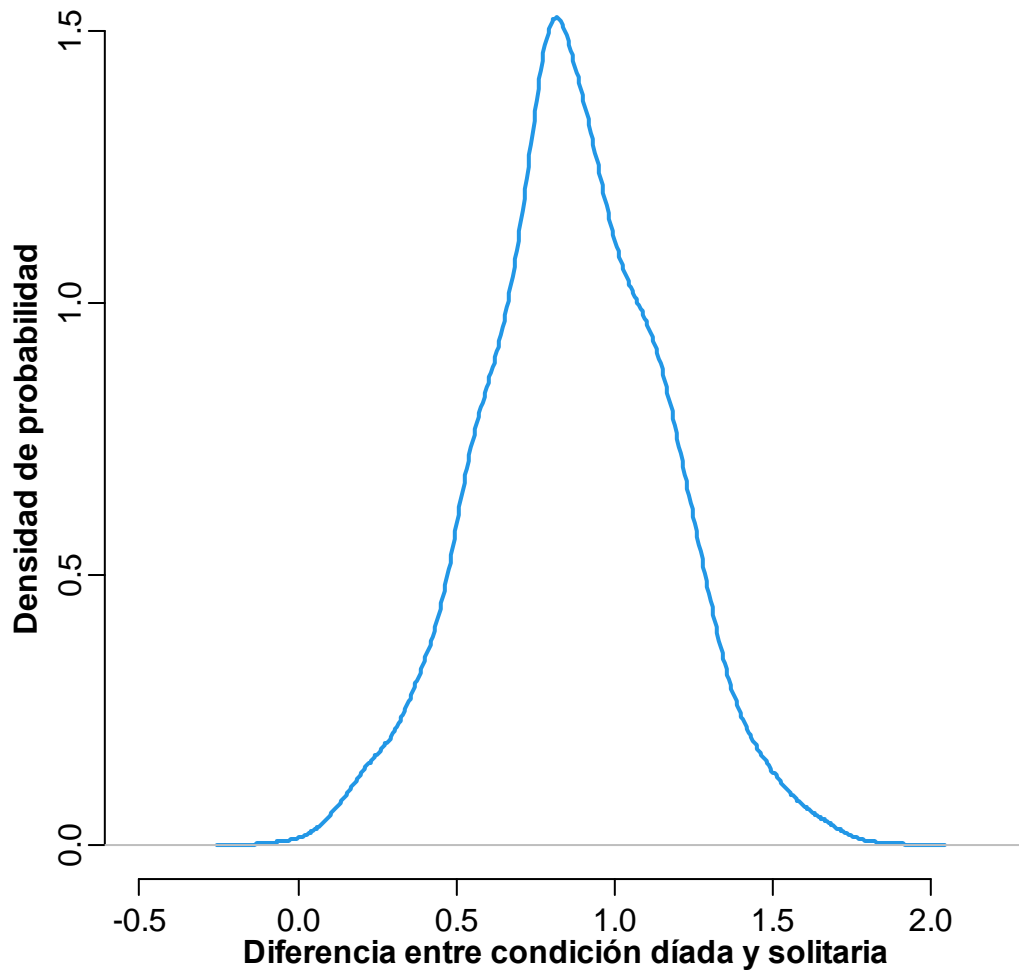
Un análisis más detallado de las distribuciones *a posteriori* de estos contrastes indica lo que sigue. En la Figura 9 podemos observar la distribución de las diferencias posibles entre la condición tríada y la condición solitaria. Una diferencia nula (i.e. 0) es

poco probable de ocurrir en comparación con el valor esperado (0.58; IC<sub>89%</sub>: de 0.08 a 1.1; promedio; intervalo de compatibilidad).



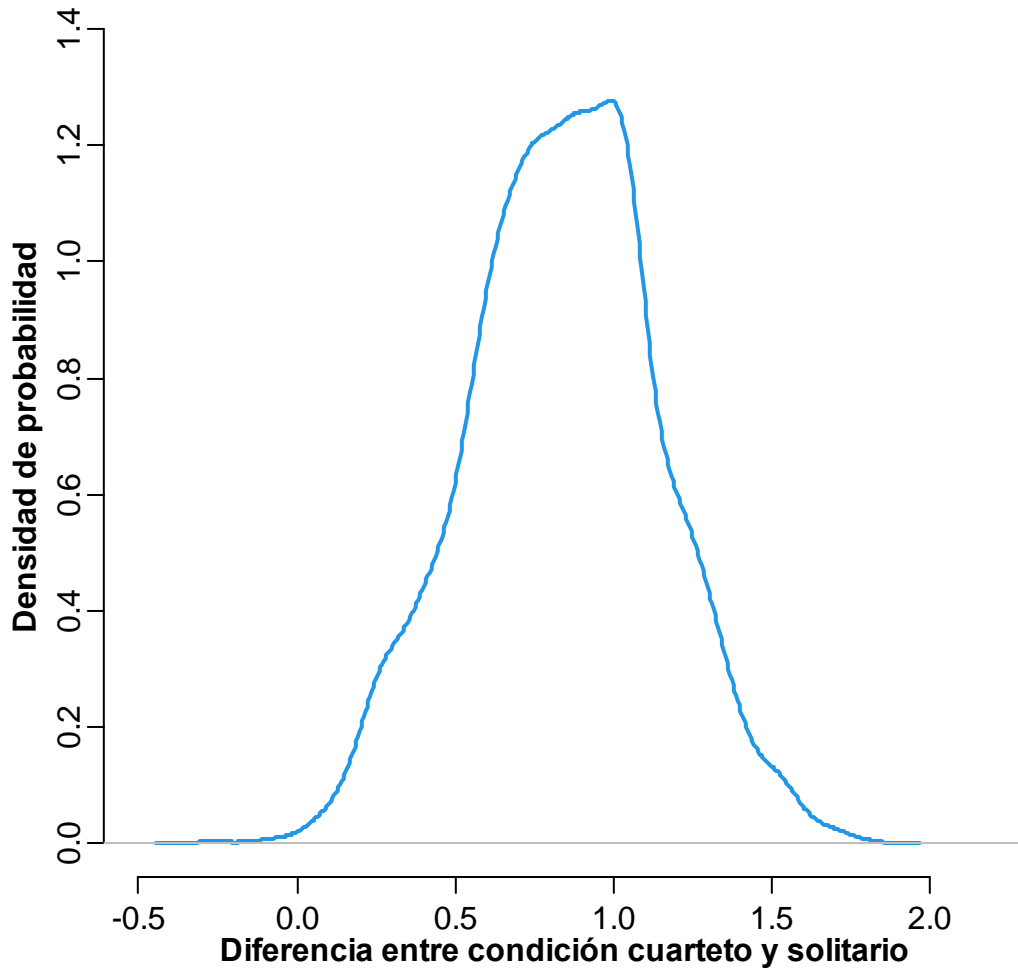
**Figura 9.** Distribución *a posteriori* de las diferencias posibles en la frecuencia de bostezo entre la condición tríada y solitaria.

Una diferencia más acentuada en la frecuencia de bostezos ocurrió entre la condición día y solitaria (Figura 10). La diferencia esperada (0.87; IC<sub>89%</sub>: de 0.4 a 1.32) indica que las ratas de la condición día bostezaron con más frecuencia que las ratas de la condición solitaria.



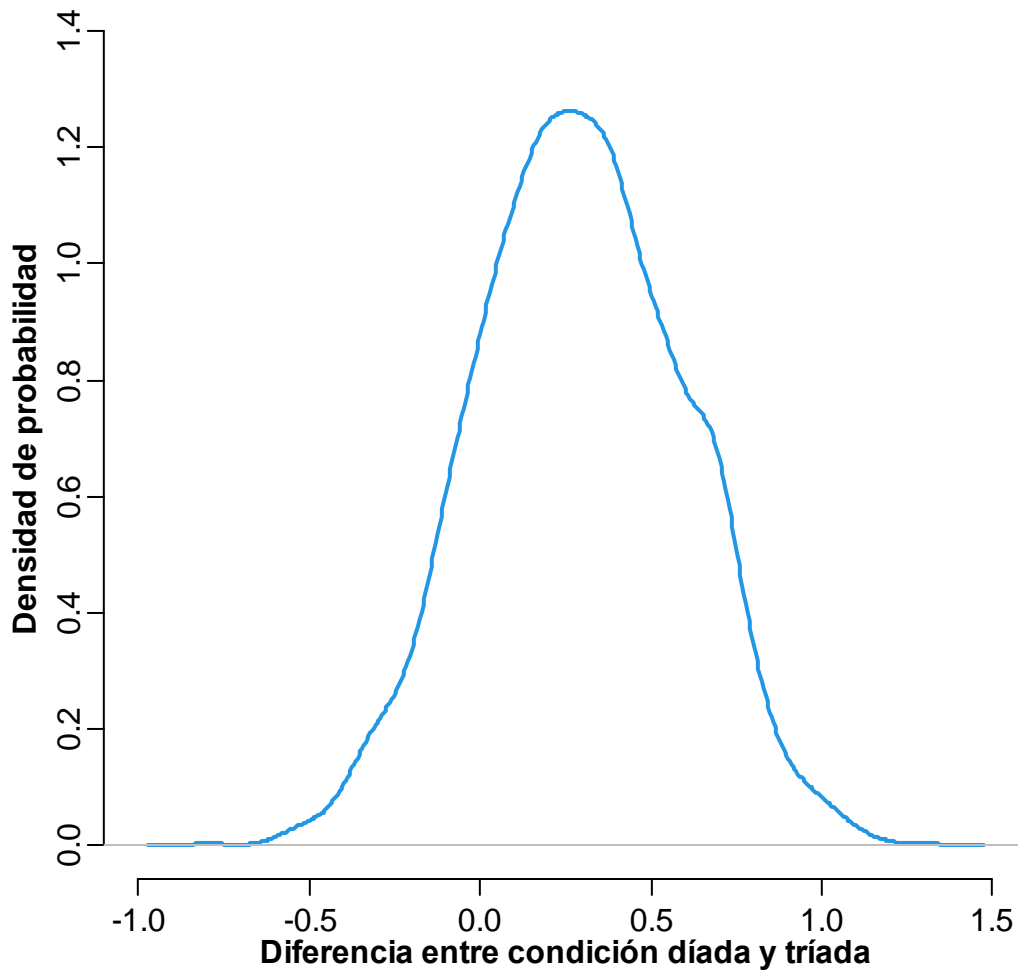
**Figura 10.** Distribución *a posteriori* de las diferencias posibles en la frecuencia de bostezo entre la condición día y solitaria.

Igualmente, las ratas en la condición cuarteto bostezaron con más frecuencia que las ratas en la condición solitaria (Figura 11). La diferencia esperada (0.84) y el intervalo de compatibilidad (IC<sub>89%</sub>: de 0.33 a 1.32) así lo indican. Una diferencia nula entre las dos condiciones experimentales es poco probable que ocurra.



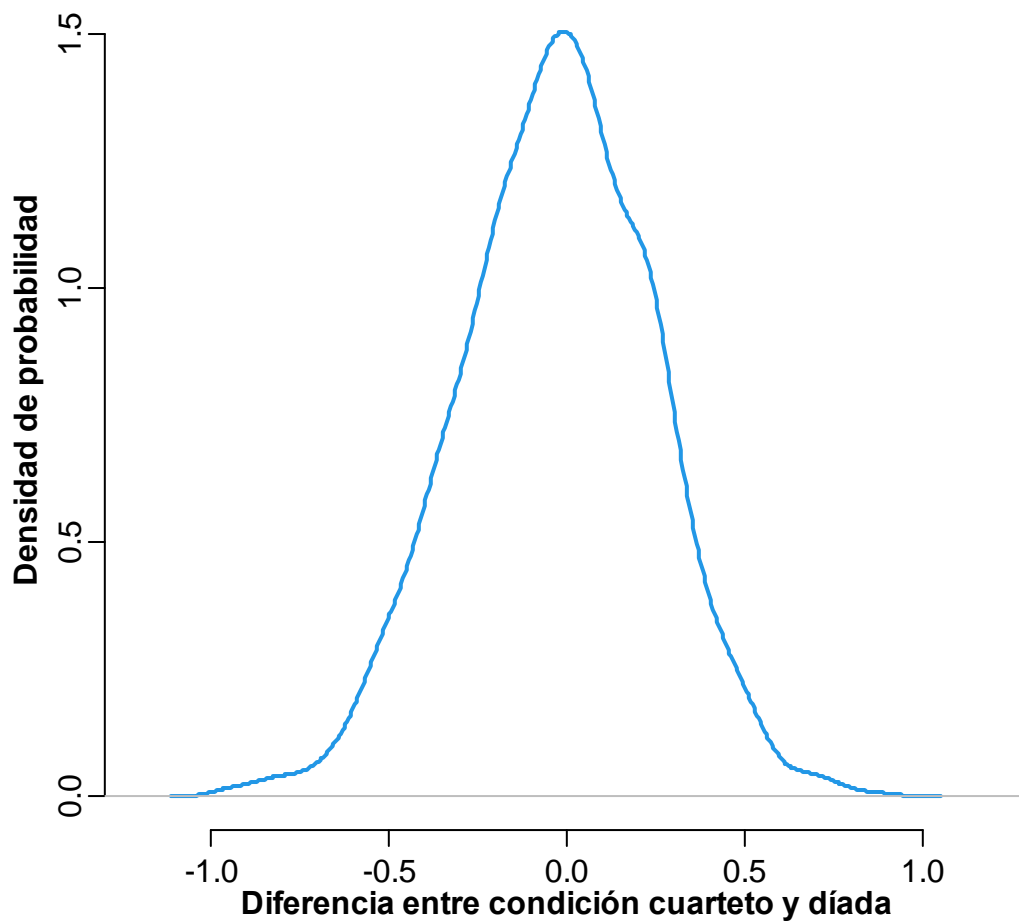
**Figura 11.** Distribución de las diferencias posibles en la frecuencia de bostezo entre la condición cuarteto y solitaria.

Quando comparé la frecuencia de bostezos entre las ratas de la condición díada contra la condición tríada, la diferencia entre ellas ya no fue tan obvia (Figura 12). El valor de la diferencia esperada (0.29) y, sobre todo, el intervalo de compatibilidad correspondiente (IC<sub>89%</sub> = de -0.18 a 0.76) indican que una diferencia nula entre ambas condiciones experimentales es moderadamente posible.



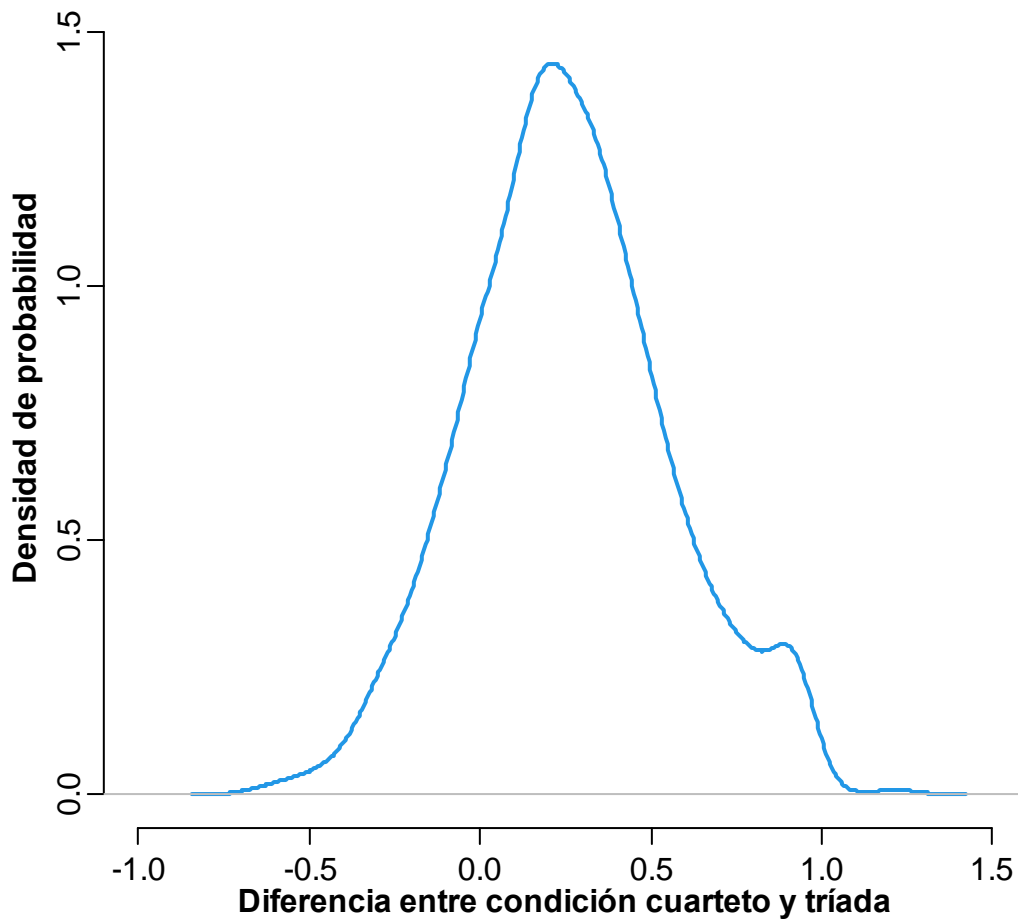
**Figura 12.** Distribución de las diferencias posibles en la frecuencia de bostezo entre la condición día y tríada.

Una similitud franca en la frecuencia de bostezo ocurrió entre las ratas sometidas a la condición cuarteto y día (Figura 13). La diferencia esperada es relativamente pequeña (-0.03) y el intervalo de compatibilidad sin duda que comprende una diferencia de cero:  $IC_{89\%} =$  de -0.47 a 0.39. No hay, en este caso, evidencia para sustentar una diferencia respecto al efecto social entre ambas condiciones.



**Figura 13.** Distribución de las diferencias posibles en la frecuencia de bostezo entre la condición cuarteto y díada.

La magnitud de la diferencia esperada entre las ratas de la condición cuarteto y tríada (0.26; Figura 14), es muy parecida a la que se encontró para las condiciones díada y tríada. Y, como en este caso, el intervalo de compatibilidad ( $IC_{89\%}$  = de -0.21 a 0.8) también indica que una diferencia nula es posible que ocurra con una probabilidad relativa moderada.



**Figura 14.** Distribución de las diferencias posibles en la frecuencia de bostezo entre la condición cuarteto y tríada.

### 6.1.1 Efecto de la testosterona y corticosterona

Los resultados del análisis estadístico indican que la testosterona como la corticosterona tienen un efecto positivo en la frecuencia de bostezo (Tabla 3). Puesto que los valores de la concentración de testosterona fueron estandarizados para el análisis, el intercepto ( $\alpha$ ) representa el número promedio esperado de bostezos para la concentración promedio de la testosterona en el conjunto de datos. Es decir, cuando el valor de la concentración de la

testosterona es 30.25  $\mu\text{mol/g}$ , se espera que una rata bostece 0.58 veces en promedio (Tabla 3). La pendiente promedio ( $\beta_{\text{testosterona}}$ ) representa el efecto de la testosterona en la frecuencia de bostezo condicionado al efecto promedio de las condiciones experimentales. En este caso, es el cambio en bostezo para una unidad de cambio en la concentración de testosterona (valores estandarizados). En otras palabras, cada vez que la concentración de testosterona cambia una desviación estándar, se espera que la frecuencia de bostezo cambie 0.86 bostezos. Algo similar ocurre con el efecto de la corticosterona: se espera que una desviación estándar de cambio de concentración produzca un cambio de 0.78 bostezos.

**Tabla 3.** Resumen estadístico del efecto de la testosterona y corticosterona en la frecuencia de bostezo.

	Promedio	Desviación estándar	5.5 %	94.5 %
A	0.58	1.51	0.30	1.11
$\beta_{\text{testosterona}}$	0.86	1.61	0.36	1.58
$\beta_{\text{corticosterona}}$	0.78	1.46	0.39	1.27

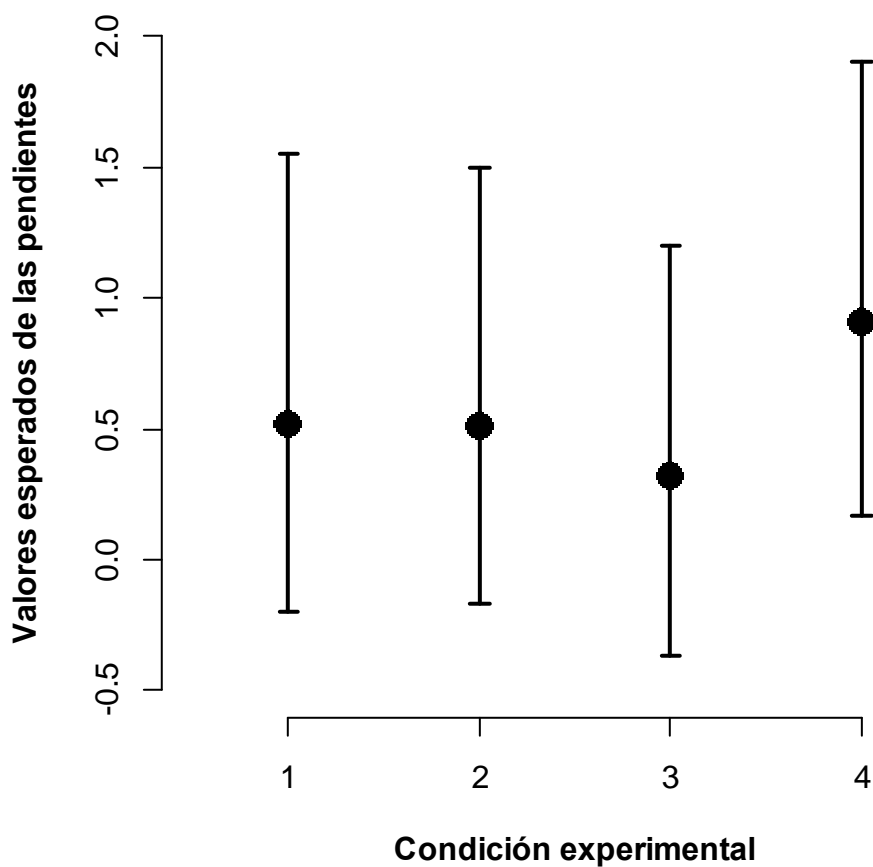
El promedio y desviación estándar están acompañados por los límites inferior y superior de compatibilidad al 89%.

La intensidad de la asociación entre la concentración de testosterona y bostezo es baja: 0.35 ( $IC_{89\%}$ : de -0.35 a 0.86). Esto quiere decir que ratas con más bostezos no necesariamente tienen más testosterona. De modo similar, la asociación entre la concentración de la corticosterona y el bostezo es apenas 0.07 ( $IC_{89\%}$ : de -0.66 a 0.69). De

hecho, la asociación entre la concentración de la testosterona y la corticosterona es más fuerte: 0.16 (IC<sub>89%</sub>: de -0.49 a 0.74).

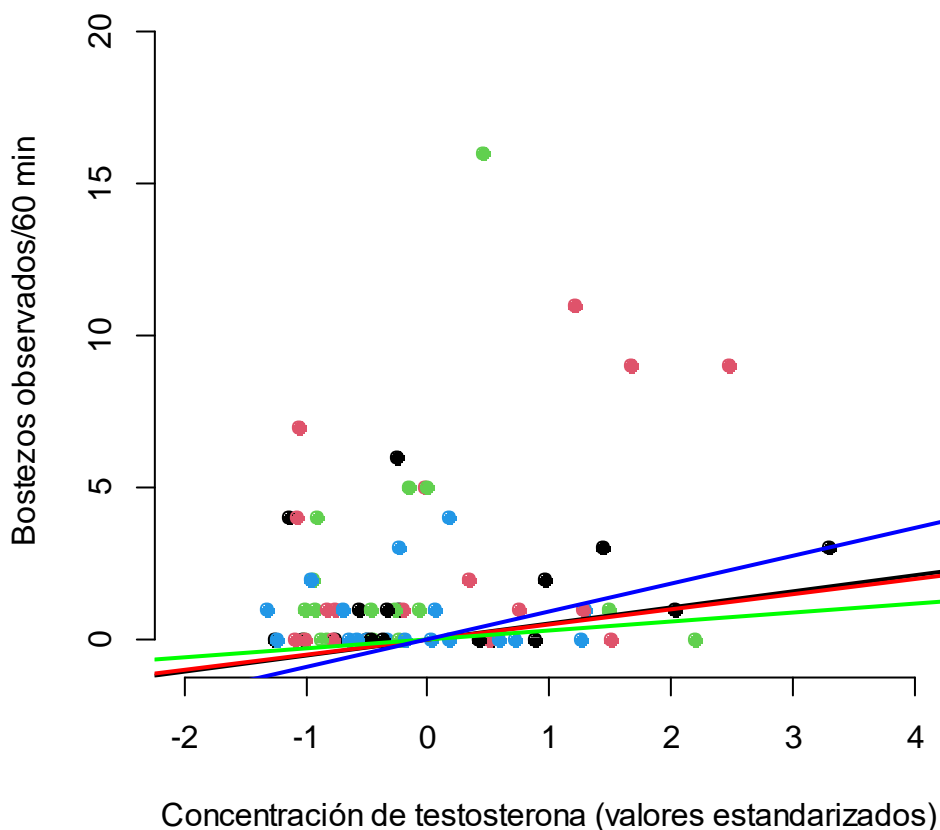
La Figura 15 muestra los valores esperados promedio, junto con los intervalos de compatibilidad respectivos, de las pendientes de las 4 condiciones experimentales.

Destaca la aparente diferencia entre las pendientes que corresponden a las condiciones tríada y cuarteto.



**Figura 15.** Valores esperados de las pendientes de bostezo sobre la concentración de testosterona, en función de las condiciones experimentales (no. de ratas por grupo).

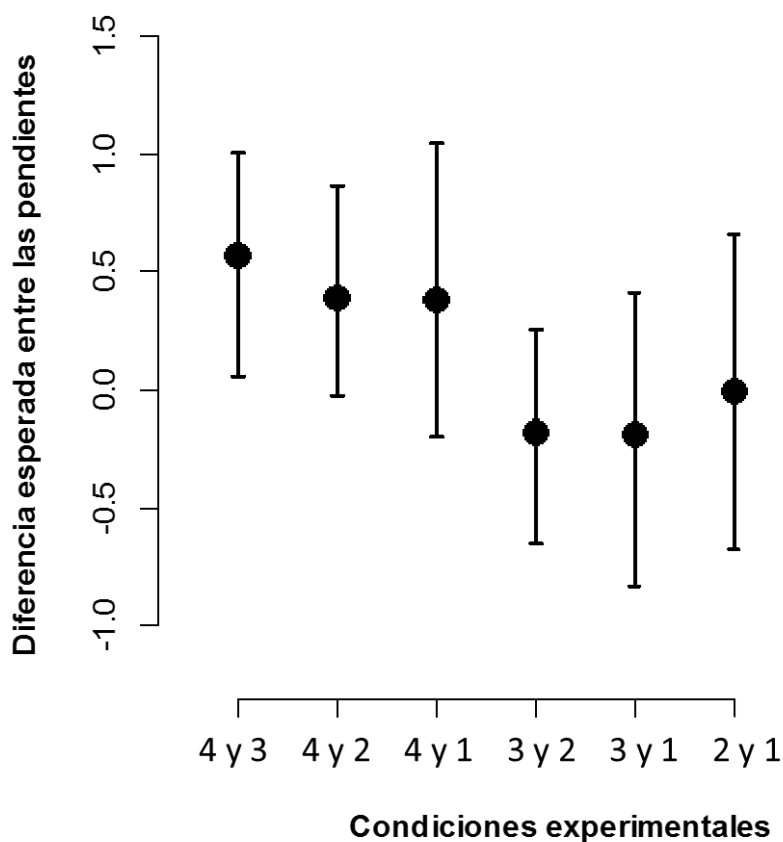
En la siguiente gráfica (Figura 16) podemos observar las diferencias aparentes entre estas pendientes. Puede apreciarse la escasa relación entre la frecuencia de bostezo y la concentración de la testosterona, aunque también puede confirmarse la aparente diferencia entre las pendientes.



**Figura 16.** La frecuencia de bostezo en función de los valores estandarizados de la concentración de testosterona. Las líneas representan las pendientes esperadas para las 4 condiciones experimentales: la línea negra pertenece a las ratas de la condición solitaria; la línea roja a las ratas de la condición díada; la línea verde a las ratas de la condición tríada; y la línea azul a las ratas de la condición cuarteto.

La Figura 17 muestra una relación de los contrastes posibles entre las pendientes de las 4 condiciones experimentales. Y en efecto destaca la diferencia entre las pendientes

de las condiciones experimentales cuartetos y tríadas, siendo la primera mayor que la segunda.

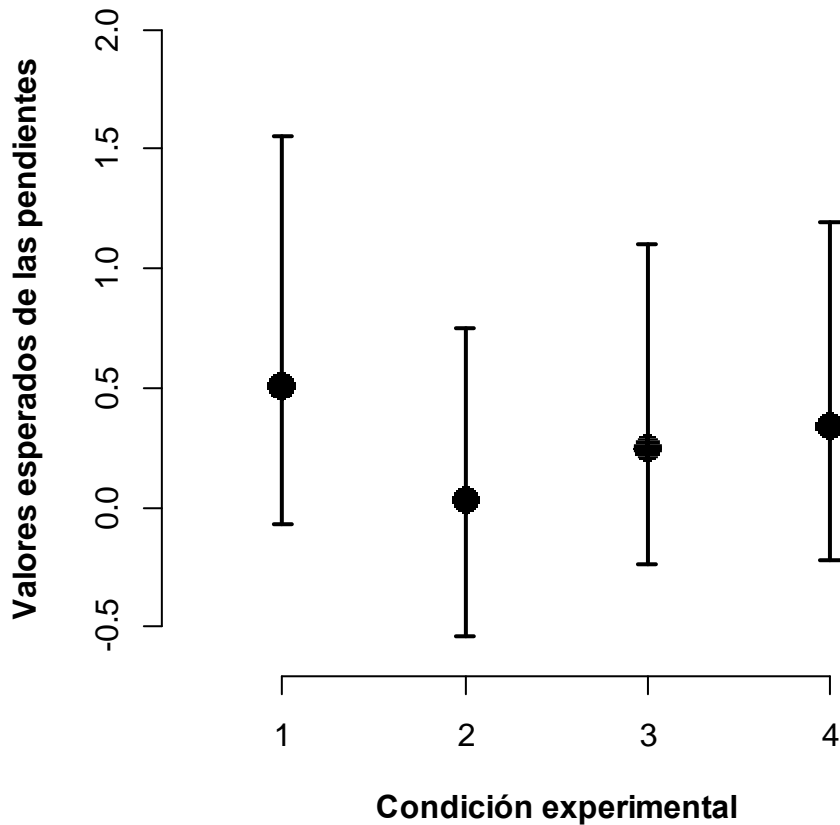


**Figura 17.** Contraste entre los valores esperados de las pendientes de las diferentes condiciones experimentales.

### 6.1.2 Efecto de la corticosterona

La Figura 18 muestra los valores esperados de las pendientes con sus respectivos intervalos de compatibilidad. La impresión general sugiere que en la condición solitaria las

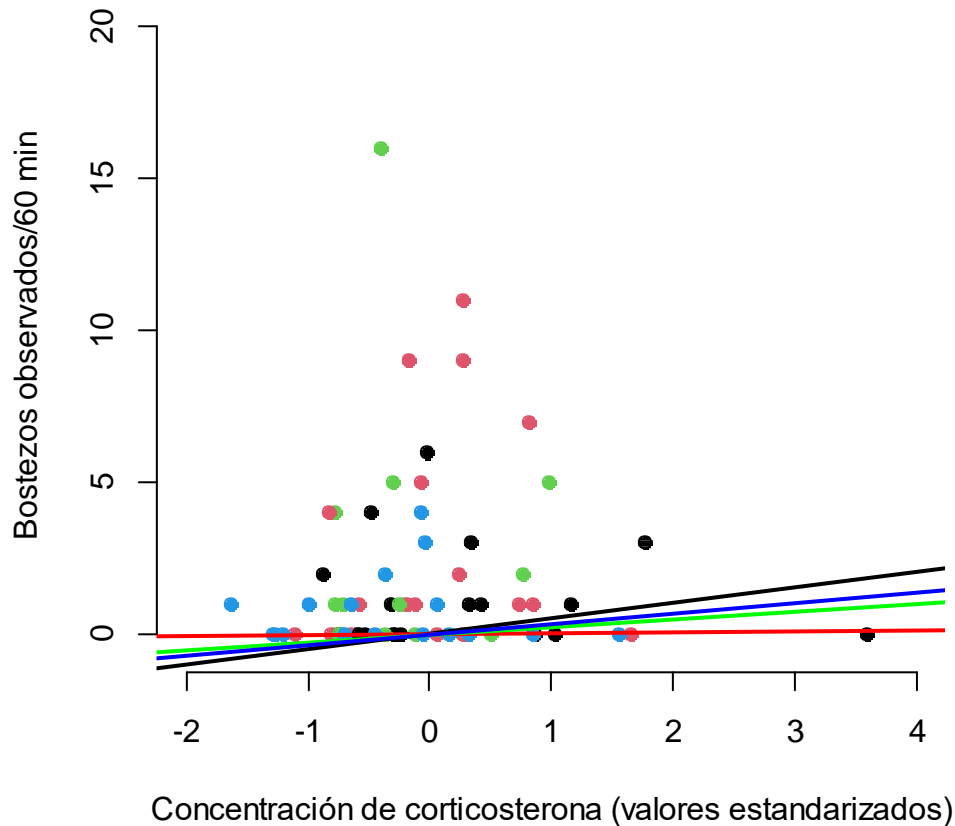
ratas bostezaron más cuanto más corticosterona tenían, en comparación con las otras condiciones experimentales.



**Figura 18.** Valores esperados (IC<sub>89%</sub>) de las pendientes de las condiciones experimentales (no. de ratas por grupo) cuando se relaciona a la frecuencia de bostezo con los niveles de corticosterona.

En la Figura 19 podemos observar las pendientes de las 4 condiciones experimentales cuando se evalúa el efecto de la corticosterona en la frecuencia de bostezos. En términos generales se confirma que la influencia de la corticosterona en la frecuencia de bostezo no está condicionada al efecto de las condiciones experimentales. Sin embargo, también puede apreciarse que posiblemente concentraciones de

corticosterona por abajo del valor promedio estimulan el bostezo, mientras que concentraciones superiores lo inhiben.

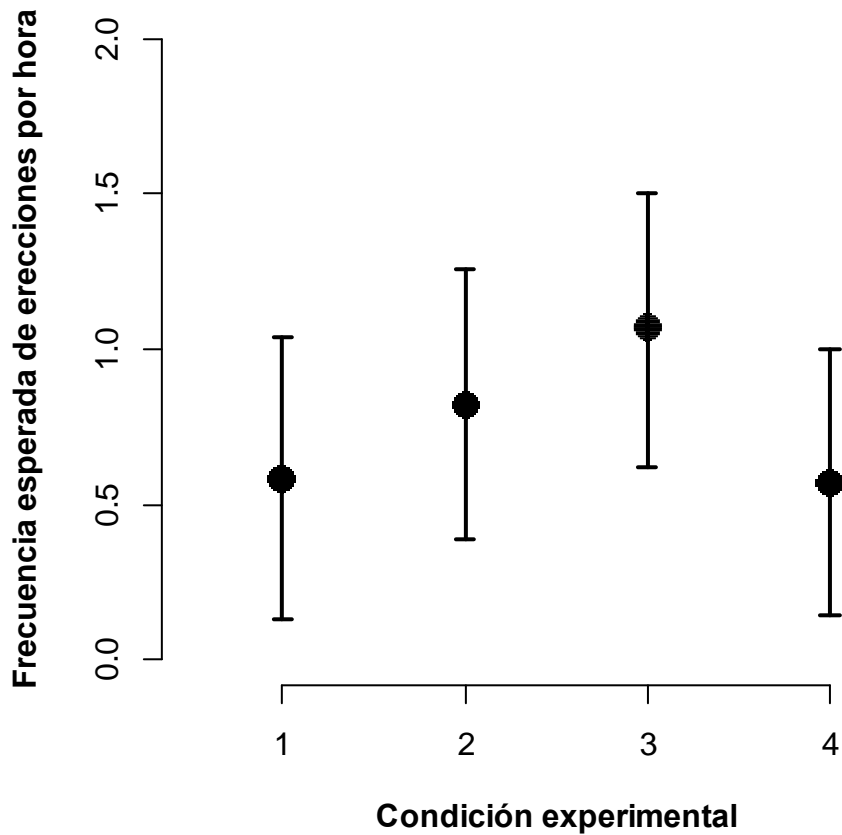


**Figura 19.** La frecuencia observada de bostezo en función de los valores estandarizados de la concentración de corticosterona. Las líneas representan los efectos de las condiciones experimentales. La línea negra corresponde a la condición solitaria; la línea roja a la condición díada; la línea verde a la condición tríada; y la línea azul a la condición cuarteto.

## 6.2 Frecuencia de erecciones

La Figura 20 muestra los valores esperados, junto con los intervalos de compatibilidad respectivos, de la frecuencia de erecciones de pene para las ratas que fueron expuestas a las distintas condiciones experimentales. Puede advertirse que, como en el caso del

bostezo, la frecuencia de las erecciones de pene también se vió afectada por las condiciones experimentales a las que las ratas fueron expuestas.

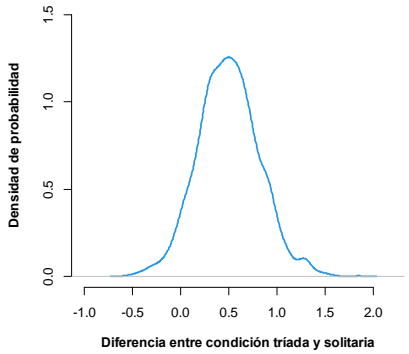


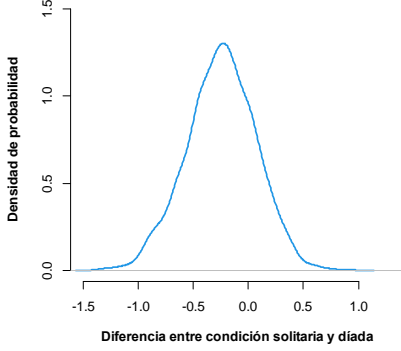
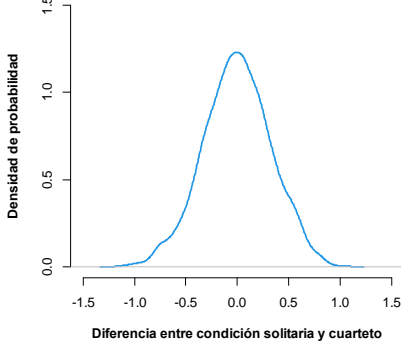
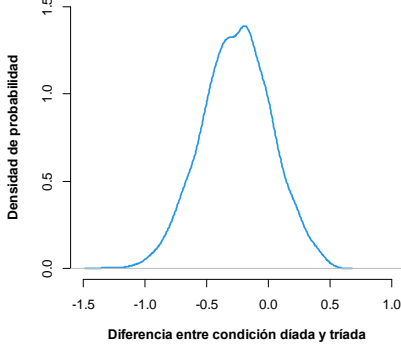
**Figura 20.** Frecuencia de las erecciones del pene en función de las 4 condiciones experimentales (no. de ratas por grupo). Los círculos representan los valores promedio esperados, y las barras representan los intervalos de compatibilidad al 89%.

Excepto por la condición experimental cuarteto, la frecuencia de erecciones de pene crece con el número de ratas por condición experimental. Este patrón no coincide con el observado para el caso de la frecuencia de bostezo.

La Tabla 4 muestra una relación de los contrastes de las distintas condiciones experimentales. Además de las distribuciones respectivas, la Tabla 4 también contiene el valor esperado promedio de cada contraste junto con el intervalo de compatibilidad al 89 %. Como era predecible, de acuerdo con la Figura 20, solo las diferencias entre la condición tríada y la condición solitaria, y cuarteto, son notoriamente discrepantes de cero. Los otros contrastes muestran una probabilidad alta de incluir una diferencia nula.

**Tabla 4.** Representación gráfica de los contrastes de las diferentes condiciones experimentales.

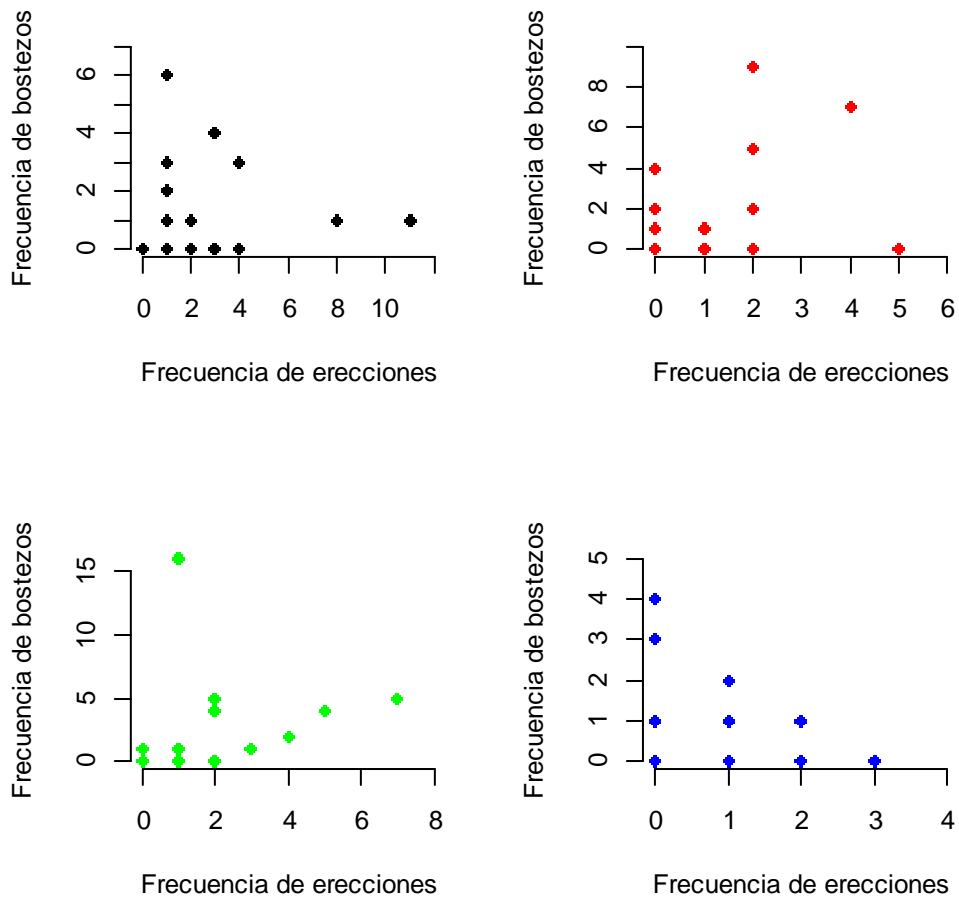
Contrastes entre las condiciones experimentales	Promedio	Intervalo de compatibilidad (IC <sub>89%</sub> )	Gráficas de distribución de probabilidad entre los diferentes tratamientos
Tríada y solitaria	0.5	<b>0.01, 1</b>	

Solitaria y díada	-0.25	-0.78, 0.24	
Solitaria y cuarteto	0	-0.53, 0.54	
Díada y tríada	-0.25	-0.71, 0.2	

Díada y cuarteto	0.24	-0.23, 0.71	
Tríada y cuarteto	0.5	<b>0.08, 0.93</b>	

El promedio está acompañado por los límites inferior y superior de compatibilidad al 89%.

La Figura 21 es un panel que relaciona a la frecuencia de bostezo con la frecuencia de erecciones de pene, de acuerdo con las condiciones experimentales a las que la ratas fueron expuestas. Excepto por las condiciones solitaria y cuarteto, que presentan una asociación negativa, las otras condiciones experimentales no sugieren un patrón definido entre las frecuencias de bostezo y erecciones de pene. Ambos casos contrastan con lo que otros autores han reportado en estudios previos.



**Figura 21.** Relación entre la frecuencia de bostezos y la frecuencia de erecciones para las diferentes condiciones experimentales a las que las ratas fueron expuestas. Condición solitaria, extremo superior izquierdo; condición díada, extremo superior derecho; condición tríada, extremo inferior izquierdo; condición cuarteto, extremo inferior derecho.

### 6.2.1 Efecto de la testosterona y corticosterona

Los resultados del análisis estadístico indican que la testosterona y corticosterona tienen un efecto positivo en la frecuencia de erecciones de pene en las ratas del estudio (Tabla 5).

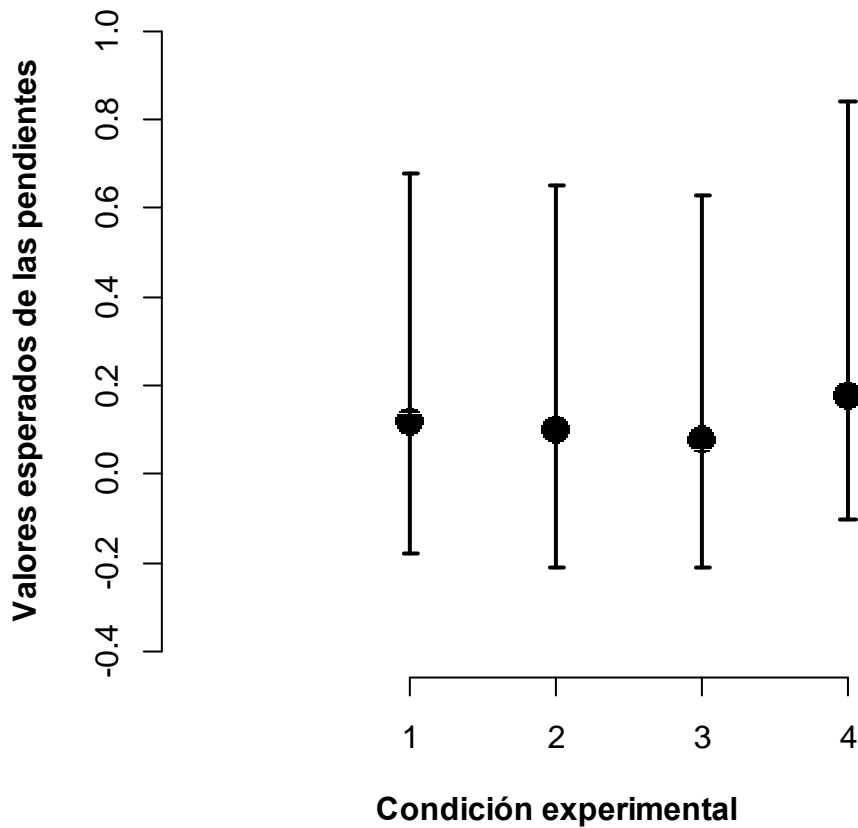
Como los valores de la concentración de testosterona están estandarizados, el intercepto ( $\alpha$ ) representa el número promedio esperado de erecciones para la concentración promedio de la testosterona en el conjunto de los datos. Esto quiere decir que cuando el valor de la concentración de la testosterona es 30.25  $\mu\text{mol/g}$ , se espera que una rata tenga en promedio 0.67 erecciones (Tabla 5). La pendiente promedio ( $\beta_{\text{testosterona}}$ ) representa el efecto de la testosterona en las erecciones de pene, condicionado al efecto promedio de las condiciones experimentales. En este caso, es el cambio en la cantidad de erecciones para una unidad de cambio en la concentración de testosterona (valores estandarizados). Dicho de otra manera, cada vez que la concentración de testosterona cambia una desviación estándar, se espera que la frecuencia de erecciones cambie 0.76. Algo similar ocurre con el efecto de la corticosterona: se espera que una desviación estándar de cambio de concentración produzca un cambio de 0.86 erecciones.

**Tabla 5.** Resumen estadístico del efecto de la testosterona y corticosterona en las erecciones del pene en las ratas de estudio.

	Promedio	Desviación estándar	5.5 % *	94.5 % *
A	0.67	1.61	0.33	1.49
$\beta_{\text{testosterona}}$	0.76	1.32	0.45	1.07
$\beta_{\text{corticosterona}}$	0.86	1.50	0.39	1.37

\*Los porcentajes se refieren a los límites inferior y superior del intervalo de compatibilidad al 89% de los valores esperados promedio.

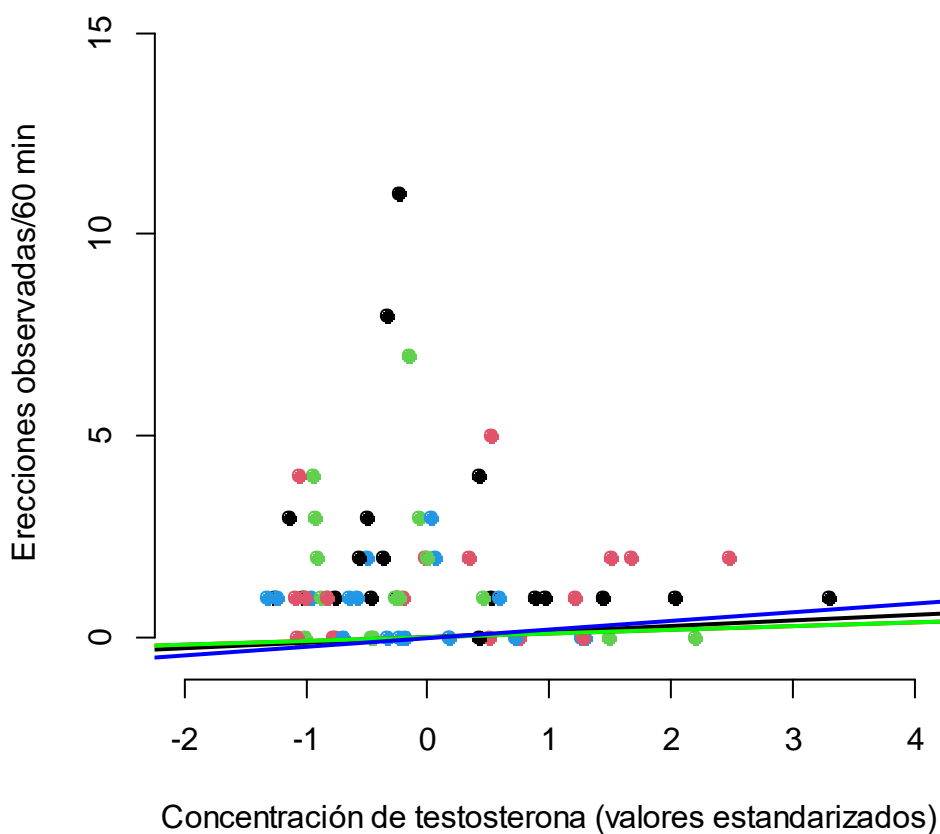
La Figura 22 muestra los valores esperados promedio de las pendientes, junto con los intervalos de compatibilidad respectivos, de las 4 condiciones experimentales. Lo más notorio es la amplitud de los intervalos de compatibilidad, lo que sugiere que la inclinación de las pendientes es escasa, excepto quizá por la condición cuarteto.



**Figura 22.** Valores esperados de las pendientes, junto con los valores de los intervalos de compatibilidad respectivos, en función de las 4 condiciones experimentales. Las pendientes resultan cuando el efecto de la testosterona en la frecuencia de erecciones de pene se condiciona al efecto de las condición experimentales (no. de ratas por grupo).

En la Figura 23 podemos observar los valores de estas pendientes cuando se grafica el número de erecciones de pene en función de los valores estandarizados de la

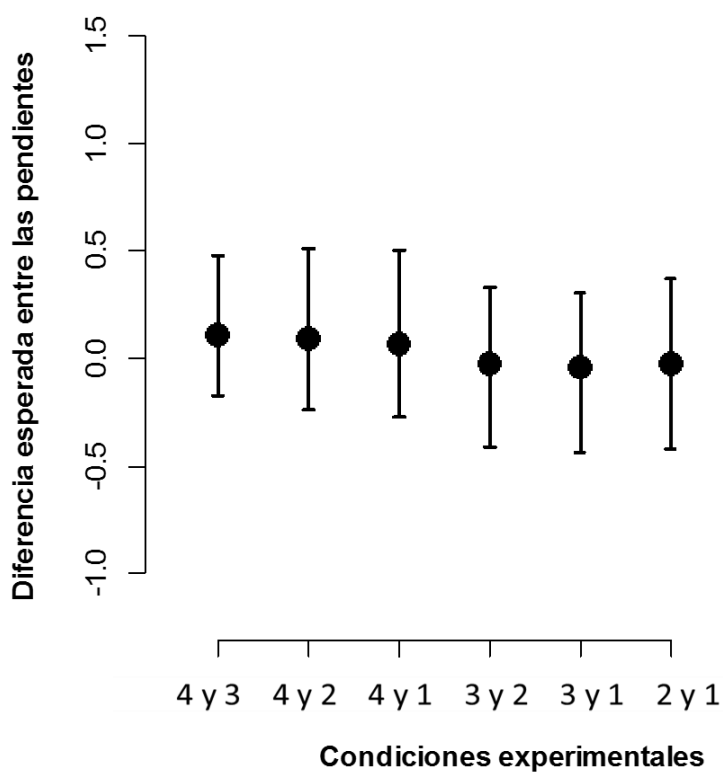
concentración de testosterona. Puede apreciarse una escasa inclinación de las pendientes, aunque sí una interacción entre ellas. También parece ser que dosis de testosterona inferiores al promedio de la concentración estimulan las erecciones de pene, mientras que dosis superiores las inhiben.



**Figura 23.** Frecuencia de las erecciones de pene en función de los valores estandarizados de la concentración de testosterona, con las pendientes debidas al efecto de las 4 condiciones experimentales. La línea negra representa a la condición solitaria; la línea roja a la condición díada; la línea verde a la condición tríada; y la línea azul a la condición cuarteto.

La Figura 24 muestra una relación de los contrastes posibles de las pendientes de las 4 condiciones experimentales. Como anticipa la Figura 21, las diferencias entre las

pendientes son escasas, en todos los casos las diferencias nulas (i.e. cero) son muy probables de ocurrir.



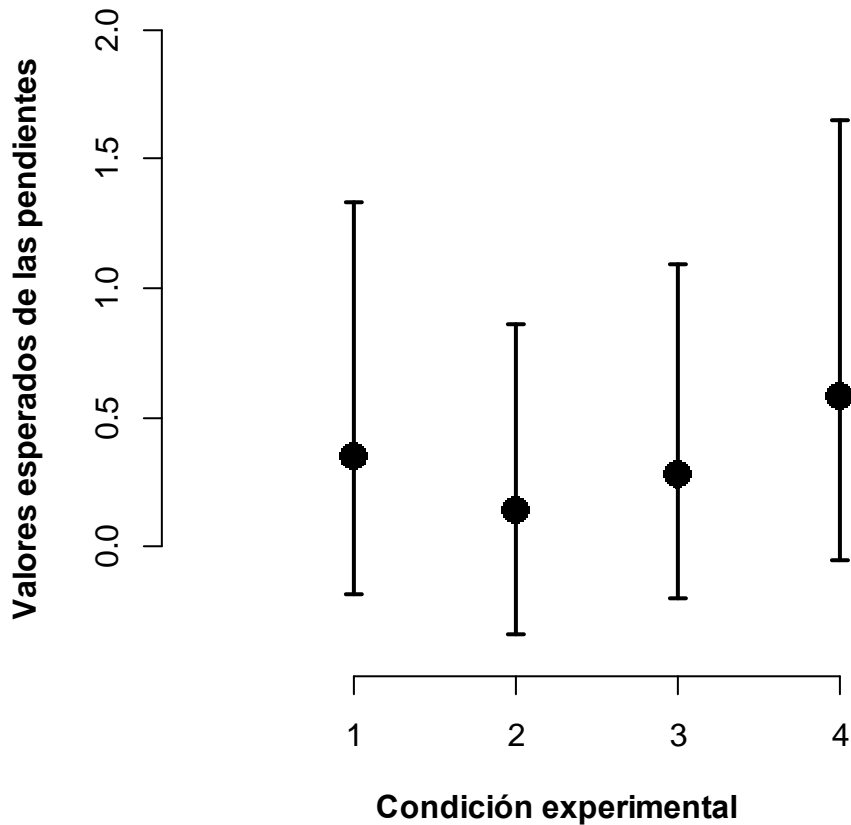
**Figura 24.** Contraste entre los valores esperados de las pendientes de las diferentes condiciones experimentales.

### 6.2.2 Efecto de la corticosterona

La Figura 25 muestra los valores esperados promedio, junto con los intervalos de compatibilidad respectivos, de las pendientes de las 4 condiciones experimentales.

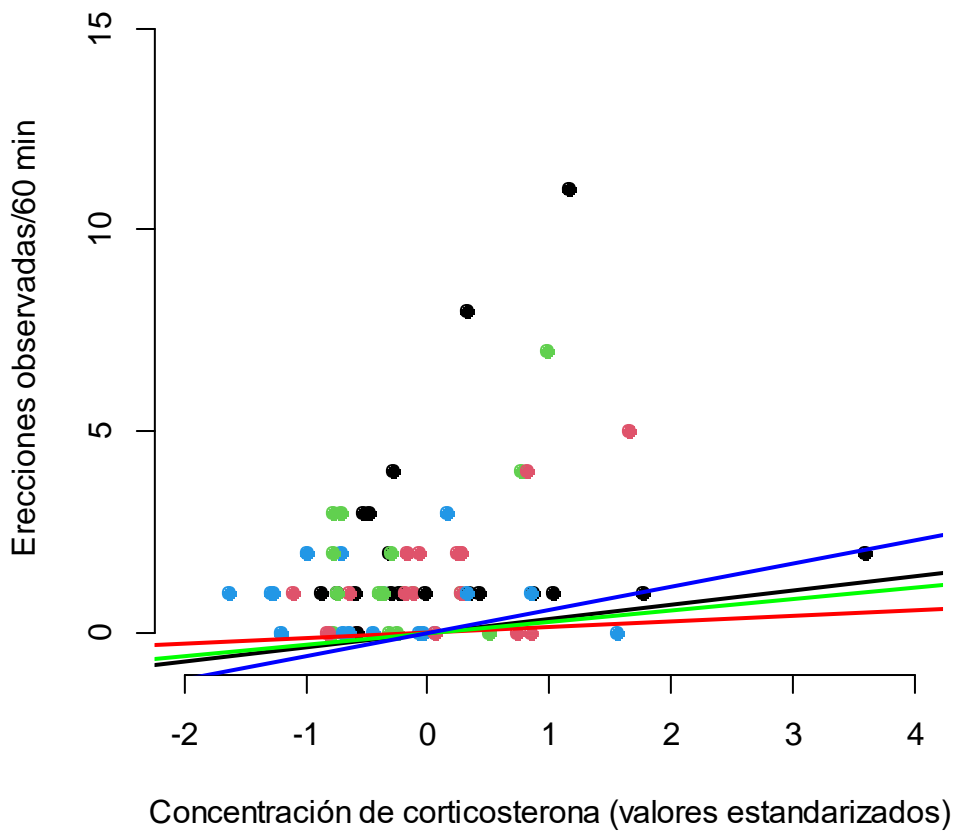
Excepto por la condición solitaria, la frecuencia de erecciones de pene creció a la vez que

crecieron los niveles de corticosterona. Así mismo, destaca la diferencia aparente entre las pendientes debidas a la condición cuarteto y díada.



**Figura 25.** Valores esperados promedio, y límites de compatibilidad respectivos al 89%, de las pendientes del efecto de las 4 condiciones experimentales (no. de ratas por grupo), cuando se midió el efecto de la corticosterona en la frecuencia de erecciones de pene.

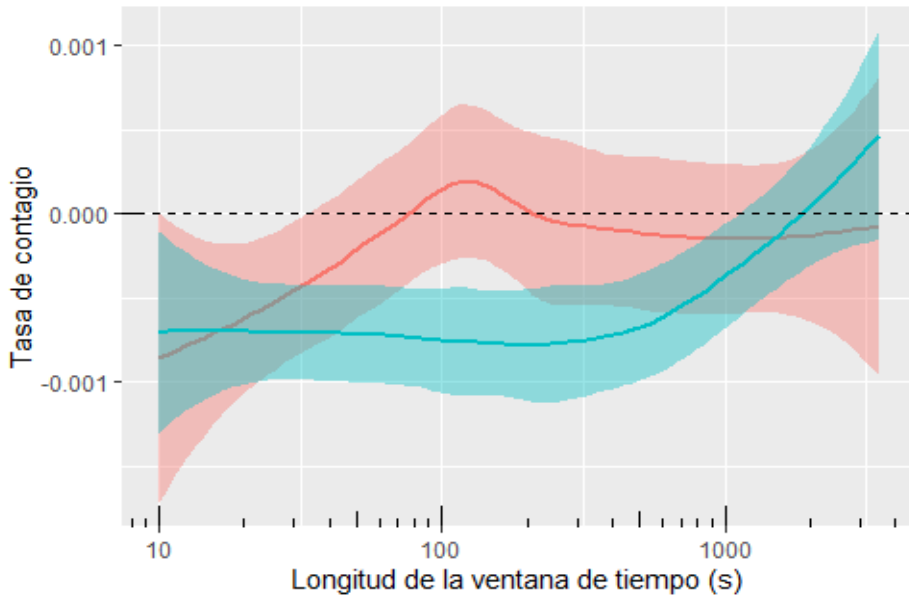
La Figura 26 muestra la frecuencia de las erecciones de pene en función de los valores estandarizados de la concentración de corticosterona, condicionada al efecto de las condiciones experimentales. Como en los otros casos, se aprecia y se confirma que el efecto de la corticosterona en la frecuencia de erecciones de pene depende escasamente de las condiciones experimentales a las que las ratas fueron expuestas.



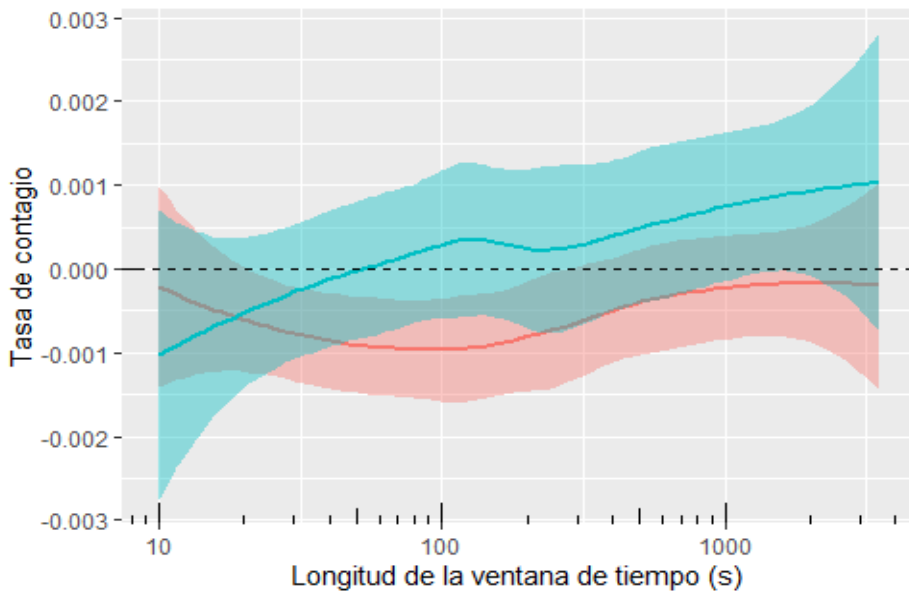
**Figura 26.** Frecuencia observada del número de erecciones de pene en función de los valores estandarizados de la concentración de corticosterona. Las líneas representan los efectos esperados de las 4 condiciones experimentales. La línea negra representa a la condición solitaria; la línea roja a la condición díada; la línea verde a la condición tríada 3; y la línea azul a la condición cuarteto.

### 6.3 Contagio de bostezo

Los resultados del análisis del contagio de bostezo indican que no ocurre contagio de bostezo cuando las ratas fueron expuestas a las condiciones solitaria (Figura 27), condición díada (Figura 28), y condición tríada (Figura 29). En los tres casos la tasa de bostezo no superó la línea umbral, excepto por la condición díada donde por una fracción de segundos se presentó contagio en ventanas mayores a los 1000 s.

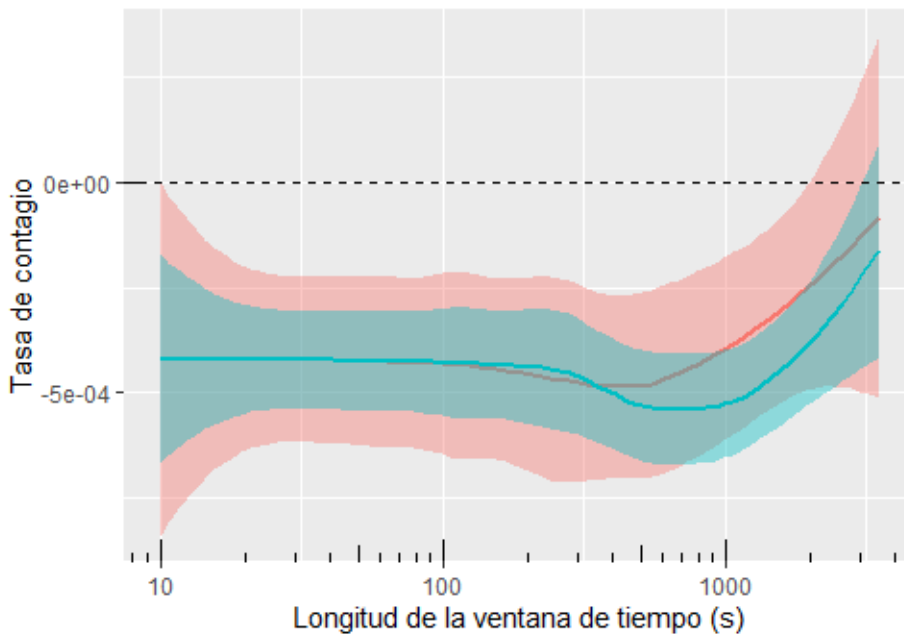


**Figura 27.** Curva de contagio de bostezo en la condición solitaria. En la gráfica puede observarse la tasa de contagio en función de la longitud de la ventana de tiempo en segundos, y en una escala logarítmica. La línea sólida azul y la banda respectiva representan el valor promedio e intervalo de confianza al 95%, respectivamente de la tasa de bostezo observado. La línea sólida roja y la banda correspondiente se refieren a la tasa de contagio para los mismos bostezos, solo que distribuidos aleatoriamente en el periodo de observación. La línea punteada representa el umbral, por encima del cual ocurre contagio.



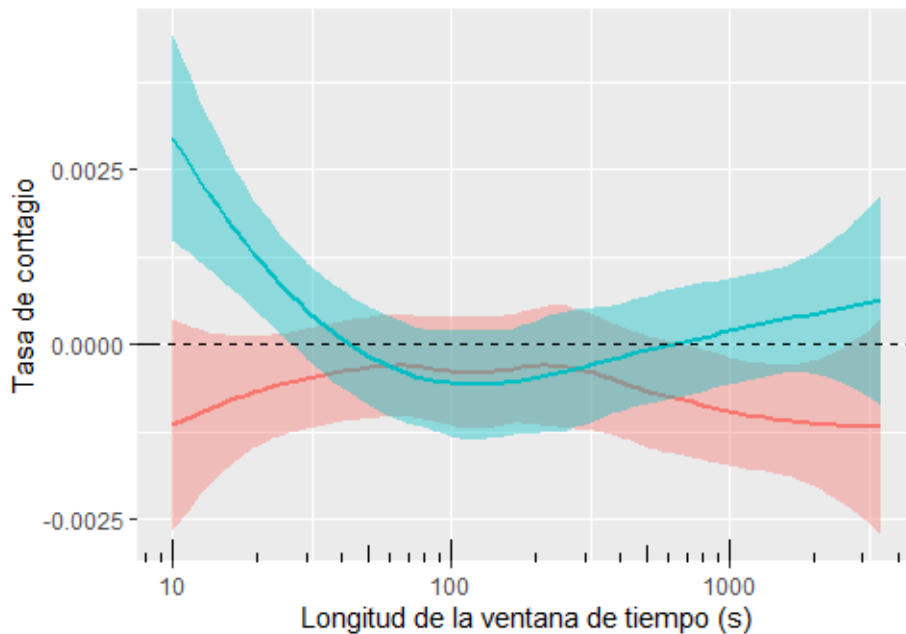
**Figura 28.** Curva de contagio de bostezo en la condición dáda. En la gráfica puede observarse la tasa de contagio en función de la longitud de la ventana de tiempo en segundos en escala

logarítmica. La línea sólida azul y la banda respectiva representan el valor promedio e intervalo de confianza al 95%, respectivamente de la tasa de bostezo observado. La línea sólida roja y la banda correspondiente se refieren a la tasa de contagio para los mismos bostezos, solo que distribuidos aleatoriamente en el periodo de observación. La línea punteada representa el umbral, por encima del cual ocurre contagio.



**Figura 29.** Curva de contagio de bostezo de la condición tríada. La gráfica ilustra la tasa de contagio en función de la longitud de ventana de tiempo en segundos (escala logarítmica). La línea sólida azul y la banda respectiva representan el valor promedio e intervalo de confianza al 95% de los bostezos observados. La línea sólida roja y la banda correspondiente se refieren a la tasa de contagio para los mismos bostezos, excepto que distribuidos aleatoriamente. Como se aprecia, no existe contagio de bostezo, pues las curvas están por abajo de la línea punteada (umbral de contagio).

En contraste con esas condiciones experimentales, las ratas en la condición cuarteto sí mostraron contagio de bostezo (Figura 30). El contagio ocurre únicamente en ventanas de tiempo breve: 30 a 40 segundos, después desaparece. La condición control, no obstante que contiene el mismo número de bostezos que la condición experimental, no muestra contagio de bostezo en ningún momento.



**Figura 30.** Curva de contagio de bostezo de la condición cuarteto. En la gráfica podemos observar la tasa de contagio en función de la longitud de ventana de tiempo en segundos, expresados éstos en una escala logarítmica. La línea sólida azul y la banda respectiva representan respectivamente el valor promedio e intervalo de confianza al 95% de los bostezos observados. La línea sólida roja y la banda correspondiente se refieren a la tasa de contagio para los mismos bostezos solo que distribuidos aleatoriamente. Existe contagio de bostezo con ventanas inferiores a 40 segundos; la curva correspondiente supera ampliamente el umbral (línea punteada).

## 7. DISCUSIÓN

Este estudio tuvo como objetivo primordial confirmar experimentalmente el carácter social de la frecuencia de bostezo y su contagio en ratas macho de la cepa Sprague-Dawley. Utilicé tratamientos experimentales que variaron la condición social de las ratas: alojamiento en solitario a alojamiento en grupo. El efecto de la condición de alojamiento en solitario (i. e. estrés) fue medido (controlado) a través de las mediciones de la corticosterona. Así mismo, el efecto del alojamiento en grupo (i.e. formación de jerarquías

de dominancia) fue valorado mediante las mediciones de la testosterona. Los resultados del estudio son consistentes con la hipótesis planteada, pues en efecto, la frecuencia de bostezo aumentó en general con el incremento en el número de individuos viviendo en grupo. Algo similar ocurrió con el contagio del bostezo: las ratas que vivieron en grupo de 4 por jaula mostraron contagio. La asociación de la testosterona y corticosterona con la frecuencia del bostezo y erecciones del pene coincide parcialmente con lo que se ha reportado con anterioridad.

Tal carencia de coincidencia total no parece tener una relación con el procedimiento no invasivo empleado aquí para hacer las mediciones de la testosterona y corticosterona. Hicimos las mediciones de los niveles de ambas hormonas en excretas mediante un inmunoensayo enzimático. Este es un procedimiento que se ha venido utilizando para medir esteroides en diversas especies de mamíferos (Touma y cols., 2003; Pavitt, y cols., 2015; Auer y cols., 2020). Y aunque este tipo de procedimiento puede parecer novedosos en ciertas áreas de la investigación científica, lo cierto es que es un procedimiento confiable. Auer (2020) realizó un estudio en el que inyectó H-testosterona marcada radioactivamente para verificar que podía medir la concentración de los metabolitos de la testosterona en excretas; demostró que la técnica de inmunoensayo aplicada era adecuada para estudios de comportamiento (Auer y cols., 2020), los cuales en general exigen afectar lo menos posible el estado natural de los animales. Puedo decir, entonces, que la técnica utilizada aquí para cuantificar esteroides no determina la presencia/ausencia de la relación de la testosterona y corticosterona con el bostezo.

Por otra parte, el procedimiento de privación social posterior al destete, es un procedimiento empleado frecuentemente en otros estudios (Tanaś y cols. 2015). La maniobra típica, como la empleada en este estudio, impide a las ratas tener interacciones sociales directas. Sin embargo, las jaulas con las ratas permanecen en el mismo ambiente que las ratas que viven en grupo. Por lo tanto, las ratas aisladas en jaulas viven expuestas a niveles similares de estímulos olfatorios, visuales y auditivos (Lukkes y cols., 2009; Tanaś y cols. 2015). Puesto que los tamaños de las jaulas fueron idénticos para todas las condiciones experimentales, puede afirmarse que la única diferencia fue la ausencia de interacciones sociales.

En la mayoría de los casos el procedimiento de aislamiento social después del destete se lleva a cabo en ratas cuya etapa de desarrollo es equivalente a la adolescencia en los humanos (Walker y cols., 2019). Así mismo, el momento del aislamiento corresponde a la iniciación y consolidación del comportamiento del juego, específicamente lo que se conoce como “jugar a pelear” (Walker y cols., 2019) o “juego social” (Tanaca y cols., 2019). No se sabe exactamente de qué manera el aislamiento social después del destete afecta el comportamiento del juego, pero se acepta que 5 son los principales efectos del aislamiento (Fone y Porkess, 2008): hiperactividad en un ambiente novedoso; ansiedad exacerbada; inhibición del pre-pulso de la respuesta de sobresalto causada por un estímulo acústico; agotamiento de serotonina; y, comportamiento social atípico. Se desconoce si estos efectos son ocasionados por la carencia de estimulación sensorial general, o bien por déficits específicos en la experiencia

social (Tanaś y cols. 2015). Aun cuando ninguno de ellos fue medido en este estudio, puede sugerirse que la disminución en la frecuencia de bostezo pertenece a la categoría del comportamiento social atípico. No hay estudios previos donde se hubiera analizado directamente el efecto del aislamiento social posterior al destete en la frecuencia de bostezo. Pero los estudios, y resultados respectivos, comentados arriba sugieren que el bostezo es un comportamiento cuyo significado social se consolida durante esas etapas de desarrollo. Parece que el bostezo es un elemento importante en las interacciones entre individuos cuando hay una preparación para la etapa reproductiva; muy probablemente como una señal envuelta en las relaciones de dominancia y subordinación que son típicas del juego de peleas.

El hallazgo de que la frecuencia de bostezo de las ratas que vivieron aisladas fue notoriamente más baja que la de las ratas que vivieron en grupo es concordante con lo reportado por Moyaho y cols., (2009): la frecuencia de bostezo de las ratas HY disminuyó luego de permanecer aisladas (Moyaho y cols., 2009). Esta coincidencia es importante porque abona la hipótesis de que el bostezo tiene una función comunicativa (Moyaho, 2015). No podría ser de otro modo, pues si el bostezo se expresa únicamente si las ratas han vivido en grupo, es porque éstas lo usan en las interacciones que caracterizan la vida grupal (Einon y Morgan, 1977).

Podría sugerirse que las ratas que vivieron en solitario no cambiaron su frecuencia de bostezo, sino más bien que las ratas que vivieron en grupo la aumentaron. Sin embargo, no fue así; las ratas que vivieron en solitario tuvieron una frecuencia de bostezo

menor que el promedio reportado (2.8 bostezos por hora) para ratas Sprague-Dawley que viven habitualmente en grupos de cuatro ratas por caja, después del destete (Dorantes-Nieto y cols., 2020). Desde luego, la frecuencia de bostezos de las ratas que vivieron en aislamiento social también fue menor que la mostrada por las demás ratas sometidas a las otras condiciones experimentales. Por lo tanto, la privación de interacciones sociales es el factor que disminuyó la frecuencia de bostezo.

Aunque las condiciones experimentales díada, tríada y cuarteto, todas, elevaron la frecuencia de bostezo por encima de la condición experimental solitaria, la condición experimental tríada produjo en las ratas menos bostezo que las condiciones experimentales díada, y cuarteto. La ausencia de un incremento de la frecuencia de bostezo proporcional al incremento en el número de ratas viviendo juntas, podría ser explicada con base en 2 aspectos. Primero, es posible que inconsistencia tenga que ver con la formación de las jerarquías de dominancia. Por ejemplo, podría ocurrir que la formación de parejas favorezca las disputas permanentes por recursos limitados, mientras que grupos de parejas incompletas (i. e. una tríada) promuevan que una de las ratas juegue permanentemente un rol de sumisión y, por lo tanto, exprese una tasa baja de bostezo. Segundo, puede ser que la inconsistencia sea el resultado de una variación aleatoria, y que sea suficiente que 2 o más ratas vivan juntas para facilitar un incremento en la frecuencia de bostezo. Los resultados de este estudio no permiten discriminar entre ambas posibilidades, aunque la segunda opción parece más parsimoniosa.

Los resultados de la medición del contagio de bostezo son consistentes con la segunda predicción que planteé, ya que el bostezo entre pares de ratas desconocidas aumentó en la medida en que el número de ratas viviendo juntas también aumentó. Las ratas de la condición cuarteto mostraron más contagio que las ratas que vivieron aisladas. Por lo tanto, la intensidad de la socialización influye en la susceptibilidad a presentar contagio de bostezo, lo que refuerza la hipótesis de que el bostezo y su contagio tienen un carácter social.

Este estudio confirma que las ratas desconocidas presentan contagio de bostezo, sobre todo si han vivido en una condición social habitual (i.e. 2 o más ratas por jaula). Tal resultado es similar al reportado por Moyaho y cols. (2015) y se suma a la evidencia que indica que el vínculo con la empatía es parcial (Neilands y cols. 2020). Podría insinuarse que el contagio del bostezo depende de la frecuencia del mismo; es decir, que solo se puede probar la presencia de contagio si ocurre frecuentemente. En principio esto podría tener sentido, puesto que se observó contagio en el grupo de ratas en el que la frecuencia de bostezo fue mayor: la condición cuarteto. Sin embargo, esto no es así. El análisis que realicé para determinar la existencia de contagio de bostezo incluye como control el mismo número de bostezos, solo que distribuidos aleatoriamente en el periodo de observación. Entonces, puede concluirse que el contagio de bostezo depende de la relación establecida entre las ratas participantes.

Siendo sociales, las ratas que vivieron en la condición experimental en solitario pudieron experimentar mayores niveles de estrés que las ratas que vivieron en las otras condiciones experimentales. Además, se sabe que los niveles de estrés (corticosterona) están relacionados positivamente con la frecuencia de bostezo (Cockrem, 2007). De manera que tal asociación podría confundir el efecto de alguna manipulación experimental, como la implementada en este estudio. Fue para evitar esta confusión que cuantifiqué los niveles de corticosterona. Por lo tanto, las diferencias entre las condiciones experimentales ya no pueden atribuirse a las diferencias en los niveles de corticosterona (estrés). Algo similar ocurrió con la testosterona. Esta tiene una relación positiva con la frecuencia de bostezo (Graves y cols., 2006), y por esa razón también medí sus niveles en las ratas para tomar en cuenta, remover estadísticamente, su efecto.

La participación de la testosterona en la formación de estructuras sociales está bien documentada (López y cols., 1999). En un grupo social es común que se creen jerarquías en donde los individuos dominantes tienen niveles más altos de testosterona que el resto de los individuos (Ketterson, y cols., 1992). Por lo tanto, haber medido los niveles de testosterona en las ratas de este estudio tuvo un beneficio adicional, pues puede inferirse que las ratas con más testosterona ocuparon la posición dominante en las jerarquías de dominancia formadas en las condiciones experimentales díada, tríada y cuarteto. Además, se sabe que la testosterona tiene una correlación positiva con la frecuencia de bostezos (Holmgren y cols. 1980). Por lo tanto, y de acuerdo con un estudio realizado por Graves y cols., (2006) en el que las hembras *Rhesus* que recibieron un

anabolito de la testosterona fueron las que más bostezaron (Graves y cols., 2006), las ratas del estudio que presento aquí, las que tuvieron una concentración mayor de testosterona, también serían las ratas dominantes y las que más bostezo mostrarían. En este estudio no presento esos análisis porque ya no fue posible hacerlos; en un futuro cercano los haré con la intención de confirmar que las ratas dominantes son probablemente las que más bostezo exhiben.

A pesar de lo que indica la evidencia acumulada, en este estudio el efecto de la testosterona y la corticosterona en la frecuencia de bostezo fue tenue: una correlación de 0.35 para la testosterona y de 0.07 para la corticosterona. Este efecto es bajo comparado con los resultados de otros estudios, como los realizados por Holmgren y cols. (1980) o el realizado por Graves y cols. (2006) en los que observaron una correlación más fuerte entre la frecuencia de bostezo y la concentración de testosterona. Sin embargo, en esos estudios se usaron otras cepas de ratas o especies, y las condiciones experimentales también fueron distintas. Estas diferencias podrían explicar, al menos en una parte, las diferencias con este estudio.

A diferencia de lo que ocurrió con el bostezo, la frecuencia de erecciones no parece depender del grado de socialización al que las ratas fueron expuestas, aunque si tuvieron un efecto tenue. Tampoco hay consistencia con lo reportado previamente (Holmgren y cols., 1985; Melis y cols., 1986), en el sentido de que hay una correlación positiva entre la frecuencia de erecciones y la frecuencia de bostezo. Como en el caso de la relación entre la testosterona y el bostezo, las diferencias podrían obedecer al uso de

animales/especies y procedimientos experimentales distintos. Lo que sí encontré en este estudio fue que la frecuencia de erecciones aumentó cuando el número de individuos en el grupo también aumentó, excepto en la condición cuarteto. Posiblemente, la excepción se deba a la carencia de una jerarquía de dominancia estable, por tratarse de un número de ratas relativamente grande compartiendo el mismo espacio.

En conclusión, estos resultados muestran que la frecuencia de bostezo y su contagio tienen un carácter social.

## 8. REFERENCIAS

Argiolas, A., & Melis, M. R. (1998). The neuropharmacology of yawning. *European journal of pharmacology*, 343(1), 1-16.

Argiolas, A., Melis, M. R., & Gessa, G. L. (1986). Oxytocin: an extremely potent inducer of penile erection and yawning in male rats. *European journal of pharmacology*, 130(3), 265-272.

Argiolas, A., Melis, M. R., Murgia, S., & Schiöth, H. B. (2000). ACTH-and  $\alpha$ -MSH-induced grooming, stretching, yawning and penile erection in male rats: site of action in the brain and role of melanocortin receptors. *Brain research bulletin*, 51(5), 425-431.

Auer, K. E., Kußmaul, M., Möstl, E., Hohlbaum, K., Rüllicke, T., & Palme, R. (2020). Measurement of fecal testosterone metabolites in mice: Replacement of invasive techniques. *Animals*, 10(1), 165.

Baker, K. C., & Aureli, F. (1997). Behavioural indicators of anxiety: an empirical test in chimpanzees. *Behaviour*, 134(13-14), 1031-1050.

Barbizet, J. (1958). Yawning. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 21(3), 203.

Buchanan, K., Burt de Perera, T., Carere, C., Carter, T., Hailey, A., Hubrecht, R., ... & Thompson, M. (2012). Guidelines for the treatment of animals in behavioural research and teaching. *Animal Behaviour*, 83(1), 301-309.

Campbell, M. W., & Cox, C. R. (2019). Observational data reveal evidence and parameters of contagious yawning in the behavioral repertoire of captive-reared chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Scientific reports*, 9(1), 1-13.

Cockrem, J. F. (2007). Stress, corticosterone responses and avian personalities. *Journal of Ornithology*, 148(2), 169-178.

Collins, G. T., & Eguibar, J. R. (2010). Neuropharmacology of yawning. In *The mystery of yawning in physiology and disease* (Vol. 28, pp. 90-106). Karger Publishers.

Daquin, G., Micallef, J., & Blin, O. (2001). Yawning. *Sleep medicine reviews*, 5(4), 299-312.

Darwin, C. (1872). *The expression of emotions in animals and man*. London: Murray.

Delius, J. (1967). Displacement activities and arousal. *Nature*, 214(5094), 1259-1260.

Deputte, B. L. (1994). Ethological study of yawning in primates. I. Quantitative analysis and study of causation in two species of old world monkeys (*Cercocebus albigena* and *Macaca fascicularis*). *Ethology*, 98(3-4), 221-245.

Dorantes-Nieto, Á., Cortes, C., Ugarte, A., Trujillo Hernández, A., Carrasco, Á., Cepeda-Freyre, H. A., & Eguibar, J. R. (2020). Yawning and Penile Erection Frequencies Are Resilient to Maternal Care Manipulation in the High-Yawning Subline of Sprague–Dawley Rats. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 14, 20.

Einon, D. F., & Morgan, M. J. (1977). A critical period for social isolation in the rat. *Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology*, 10(2), 123-132.

Fone, K. C., & Porkess, M. V. (2008). Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents—relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(6), 1087-1102.

Gallup, A. C., & Eldakar, O. T. (2013). The thermoregulatory theory of yawning: what we know from over 5 years of research. *Frontiers in neuroscience*, 6, 188.

Gallo, A., Zanolli, A., Caselli, M., Palagi, E., & Norscia, I. (2021). First evidence of yawn contagion in a wild monkey species. *Scientific reports*, 11(1), 1-8.

Graves, F. C., & Wallen, K. (2006). Androgen-induced yawning in rhesus monkey females is reversed with a nonsteroidal anti-androgen. *Hormones and behavior*, 49(2), 233-236.

Guggisberg, A. G., Mathis, J., Schnider, A., & Hess, C. W. (2010). Why do we yawn?. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 34(8), 1267-1276.

Heusner, A. P. (1946). Yawning and associated phenomena. *Physiological Reviews*, 26(1), 156-168.

Holle, H., Warne, K., Seth, A. K., Critchley, H. D., & Ward, J. (2012). Neural basis of contagious itch and why some people are more prone to it. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(48), 19816-19821.

Holmgren, B., Urba-Holmgren, R., Aguiar, M., & Rodriguez, R. (1980). Sex hormone influences on yawning behavior. *Acta Neurobiol Exp*, 40, 515-519.

Holmgren, B., Urbá-Holmgren, R., Trucios, N., Zermenó, M., & Eguibar, J. R. (1985). Association of spontaneous and dopaminergic-induced yawning and penile erections in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 22(1), 31-35.

Joshi, S., Bayat, A., Gagnon, L., Shields, D. C., & Koubeissi, M. Z. (2017). Yawning induced by focal electrical stimulation in the human brain. *Epilepsy & Behavior*, 66, 1-3.

Ketterson, E. D., Nolan Jr, V., Wolf, L., & Ziegenfus, C. (1992). Testosterone and avian life histories: effects of experimentally elevated testosterone on behavior and correlates of fitness in the dark-eyed junco (*Junco hyemalis*). *The American Naturalist*, 140(6), 980-999.

Kubota, N., Amemiya, S., Yanagita, S., Nishijima, T., & Kita, I. (2019). Central nucleus of the amygdala is involved in induction of yawning response in rats. *Behavioural brain research*, 371, 111974.

Lee, P. C. (1994). Social structure and evolution. *Behaviour and Evolution*. Editado por P. J. B. Slater y Halliday, T. R. Cambridge, Cambridge University Press. pp 266-303).

Lehmann, H. E. (1979). Yawning: a homeostatic reflex and its psychological significance. *Bulletin of the Menninger Clinic*, 43(2), 123.

López, H. H., Olster, D. H., & Ettenberg, A. (1999). Sexual motivation in the male rat: the role of primary incentives and copulatory experience. *Hormones and Behavior*, 36(2), 176-185.

Lukkes, J. L., Watt, M. J., Lowry, C. A., & Forster, G. L. (2009). Consequences of post-weaning social isolation on anxiety behavior and related neural circuits in rodents. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 3, 18.

Massen, J. J., & Gallup, A. C. (2017). Why contagious yawning does not (yet) equate to empathy. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 80, 573-585.

Melis, M. R., Argiolas, A., & Gessa, G. L. (1986). Oxytocin-induced penile erection and yawning: site of action in the brain. *Brain research*, 398(2), 259-265.

Moyaho, A., Barajas, M., Ugarte, A., & Eguibar, J. R. (2009). Genetic and littermate influences on yawning in two selectively bred strains of rats. *Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology*, 51(3), 243-248.

Moyaho, A., & Valencia, J. (2002). Grooming and yawning trace adjustment to unfamiliar environments in laboratory Sprague-Dawley rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, 116(3), 263.

Moyaho, A., Rivas-Zamudio, X., Ugarte, A., Eguibar, J. R., & Valencia, J. (2015). Smell facilitates auditory contagious yawning in stranger rats. *Animal cognition*, 18(1), 279-290.

Neave, N., Laing, S., Fink, B., & Manning, J. T. (2003). Second to fourth digit ratio, testosterone and perceived male dominance. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1529), 2167-2172.

Neilands, P., Claessens, S., Ren, I., Hassall, R., Bastos, A. P., & Taylor, A. H. (2020). Contagious yawning is not a signal of empathy: No evidence of familiarity, gender or prosociality biases in dogs. *Proceedings of the Royal Society B*, 287(1920), 20192236.

Oliveira, R. F., Almada, V. C., & Canario, A. V. M. (1996). Social modulation of sex steroid concentrations in the urine of male cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *Hormones and Behavior*, 30(1), 2-12.

Pavitt, A. T., Walling, C. A., Möstl, E., Pemberton, J. M., & Kruuk, L. E. (2015). Cortisol but not testosterone is repeatable and varies with reproductive effort in wild red deer stags. *General and Comparative Endocrinology*, 222, 62-68.

Phoenix, C. H., & Chambers, K. C. (1982). Sexual behavior in adult gonadectomized female pseudohermaphrodite, female, and male rhesus macaques (*Macaca mulatta*) treated with estradiol benzoate and testosterone propionate. *Journal of comparative and physiological psychology*, 96(5), 823.

Preston, S. D., & De Waal, F. B. (2002). The communication of emotions and the possibility of empathy in animals. *Altruism and altruistic love*, 284-308.

Provine, R. R., Tate, B. C., & Geldmacher, L. L. (1987). Yawning: no effect of 3–5% CO<sub>2</sub>, 100% O<sub>2</sub>, and exercise. *Behavioral and Neural Biology*, 48(3), 382-393.

Provine, R. R. (2005). Yawning: the yawn is primal, unstoppable and contagious, revealing the evolutionary and neural basis of empathy and unconscious behavior. *American scientist*, 93(6), 532-539.

Provine, R. R. (2012). *Curious behavior: Yawning, laughing, hiccupping, and beyond*. Harvard University Press.

Rangel-Negrín, A., Dias, P. A., Chavira, R., & Canales-Espinosa, D. (2011). Social modulation of testosterone levels in male black howlers (*Alouatta pigra*). *Hormones and behavior*, 59(1), 159-166.

Redican, W. K. (1982). An evolutionary perspective on human facial displays. *Emotion in the human face*, 2, 212-280.

Sipari, S., Ylönen, H., & Palme, R. (2017). Excretion and measurement of corticosterone and testosterone metabolites in bank voles (*Myodes glareolus*). *General and comparative endocrinology*, 243, 39-50.

Stenstrom, E., Saad, G., Nepomuceno, M. V., & Mendenhall, Z. (2011). Testosterone and domain-specific risk: Digit ratios (2D: 4D and rel2) as predictors of recreational, financial, and social risk-taking behaviors. *Personality and Individual Differences*, 51(4), 412-416.

Szuran, T. F., Pliška, V., Pokorny, J., & Welzl, H. (2000). Prenatal stress in rats: effects on plasma corticosterone, hippocampal glucocorticoid receptors, and maze performance. *Physiology & behavior*, 71(3-4), 353-362.

Tanaka, K., Osako, Y., Takahashi, K., Hidaka, C., Tomita, K., & Yuri, K. (2019). Effects of post-weaning social isolation on social behaviors and oxytocinergic activity in male and female rats. *Heliyon*, 5(5), e01646.

Tanaś, Ł., Ostaszewski, P., & Iwan, A. (2015). Effects of post-weaning social isolation and environmental enrichment on exploratory behavior and anxiety in Wistar rats. *Acta Neurobiol Exp*, 75, 72-79.

Touma, C. & Palme, R. (2005). Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1046, 54-74.

Touma, C., Sachser, N., Möstl, E., & Palme, R. (2003). Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *General and comparative endocrinology*, 130(3), 267-278.

Troisi, A., Aureli, F., Schino, G., Rinaldi, F., & de Angelis, N. (1990). The influence of age, sex, and rank on yawning behavior in two species of macaques (*Macaca fascicularis* and *M. fuscata*). *Ethology*, 86(4), 303-310.

Vick, S. J., & Paukner, A. (2010). Variation and context of yawns in captive chimpanzees (*Pan troglodytes*). *American Journal of Primatology: Official Journal of the American Society of Primatologists*, 72(3), 262-269.

de Waal, F. B., & Preston, S. D. (2017). Mammalian empathy: behavioural manifestations and neural basis. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(8), 498.

Walker, D. M., Cunningham, A. M., Gregory, J. K., & Nestler, E. J. (2019). Long-term behavioral effects of post-weaning social isolation in males and females. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 13, 66.

Yoon, J. M., & Tennie, C. (2010). Contagious yawning: a reflection of empathy, mimicry, or contagion?. *Animal Behaviour*, 79(5), e1-e3.

Yu, L., Zhou, H., Sun, J., Qin, F., Yu, F., Bao, J., ... & Ren, Z. (2017). Cu nanowires shelled with NiFe layered double hydroxide nanosheets as bifunctional electrocatalysts for overall water splitting. *Energy & Environmental Science*, 10(8), 1820-1827.

Zucker, E. L. (1998). Frequencies and contexts of gape yawn displays of free-ranging Patas Monkeys. *American Journal of Primatology*, 45, 215.

Zuur, A. F., Ieno, E. N., & Saveliev, A. A. 2017. *Spatial, Temporal and Spatial-Temporal Ecological Data Analysis with R-INLA. Volume I: Using GLM and GLMM*. Newburgh, U.K.: Highland and Statistics Ltd.