



Facultad de Ciencias  
*Universidad de la República*



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

---

## TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Efectos de las hormonas esteroides gonadales sobre la  
conducta agonística de *Gymnotus omarorum*

*Cecilia Jalabert*

*Orientadora: Ana Silva, Profesor Adjunto Laboratorio de Neurociencias,  
Facultad de Ciencias; UBNC, IIBCE*

*Tribunal: Felipe Sierra, Ana Silva, Bettina Tassino*

*Febrero 2012*

## Resumen

Los comportamientos agonísticos surgen en la competencia entre co-específicos por el acceso a recursos limitados. La conducta agonística implica el establecimiento de relaciones de dominancia y subordinación entre co-específicos. La experiencia adquirida en una contienda puede influenciar el resultado de futuros enfrentamientos. Una experiencia ganadora incrementa la probabilidad de ganar una futura interacción agonística contra otro oponente (efecto ganador). En teleósteos, se ha demostrado que los mecanismos neuroendócrinos que subyacen a la agresividad y al efecto ganador dependen de hormonas androgénicas. *Gymnotus omarorum* (solitario, reproductor estacional), es un pez eléctrico altamente agresivo que defiende su territorio en encuentros inter e intrasexuales a lo largo del año. Es llamativo que fuera del período reproductivo, cuando sus gónadas están regresadas y se encuentran valores bajos de hormonas androgénicas, *G. omarorum* mantiene su agresividad y exhibe efecto ganador. Esta tesis se propone estudiar la conducta agonística y el efecto ganador en su dependencia de hormonas esteroides gonadales. Se plantean dos hipótesis que sostienen que 1. *G. omarorum* presenta conducta agonística en ausencia de hormonas esteroides gonadales, 2. *G. omarorum* no presenta efecto ganador en ausencia de hormonas esteroides gonadales. Para poner a prueba estas hipótesis, evaluamos contiendas en díadas de individuos gonadectomizados (n=7) en tres tipos de encuentros: a) individuos naïve con asimetría de peso del 5-20%; b) individuos naïve vs individuos con experiencia perdedora con asimetría de peso del 5-20%, y c) individuos con experiencia ganadora vs naïve entre individuos sin diferencia significativa de peso. Estos datos se contrastaron con datos previos de contiendas equivalentes en individuos intactos. Se observó que los individuos gonadectomizados desarrollan conducta agonística y establecen relaciones de dominancia predecibles por las asimetrías de peso. Los parámetros locomotores y eléctricos de los encuentros entre gonadectomizados fueron indistinguibles de los controles. Estos resultados indican que la agresión y el establecimiento de dominancia en *G. omarorum* no dependen de hormonas de origen gonadal fuera del período reproductivo. Por otro lado, se encontró que, *G. omarorum* no presenta efecto ganador en ausencia de hormonas esteroides gonadales. Esto muestra que el establecimiento del efecto ganador en *G. omarorum* depende de hormonas de origen gonadal fuera del período reproductivo. Esto indicaría que los niveles basales de andrógenos circulantes en sangre durante el período no reproductivo son esenciales para la integración de la información obtenida en contiendas anteriores.

## Antecedentes

Los comportamientos agonísticos surgen como respuesta a situaciones de conflicto entre individuos de una misma especie. Los individuos compiten con sus co-específicos por el acceso a recursos limitados tales como pareja, sitios de nidificación, alimento o refugio (Austad, 1983; Hutingford et al., 1987). La lucha puede aparejarles altos costos energéticos a los contendientes. Estos costos serían: tiempo y energía (que podrían destinarse a otras actividades), lesiones físicas y mayor riesgo a depredación (porque los participantes pueden estar menos alerta y / o más visibles). Por esto, los costos y beneficios deben ser evaluados por los participantes para adoptar así un comportamiento adecuado. La experiencia adquirida en una contienda puede influenciar la percepción de los costos y beneficios que se obtienen en la misma e incluso influenciar los resultados en futuros enfrentamientos (Hsu et al., 2006). De esta manera, el resultado de un enfrentamiento no depende únicamente de las desigualdades en la capacidad de pelea y valor subjetivo del recurso, sino que también depende de la experiencia obtenida por los oponentes en contiendas previas (Oliveira et al., 2009).

Los conflictos en los animales están influenciados por la experiencia social previa de los individuos, de modo que una experiencia ganadora incrementa la probabilidad de ganar una futura interacción agonística contra un oponente distinto, mientras que, una experiencia perdedora, tiene el efecto opuesto (Hsu et al., 2006). Dichos fenómenos se conocen como efecto ganador y perdedor respectivamente, y se encuentran ampliamente representados en animales invertebrados y vertebrados (Rutte et al., 2006). Para explicar el valor adaptativo que presentan estos efectos se plantean dos hipótesis: (i) "social-cue hypothesis"; donde se plantea que las experiencias ganadoras y perdedoras dejan huellas en los individuos, que son detectados por rivales posteriores pudiendo afectar sus decisiones de combate, y (ii) "the self-assessment hypothesis"; que postula que al ganar o perder una lucha los individuos obtienen información acerca de su capacidad de lucha en relación con la población (Rutte et al., 2006). Por otro lado, los efectos de la experiencia sobre el comportamiento agresivo se han explicado por cambios fisiológicos que, a su vez, afectan el resultado de las contiendas posteriores (Hsu et al., 2006). Estos cambios incluyen una gran variedad de procesos como modificaciones en neuromoduladores y hormonas inducidos por la experiencia social previa (Oyegbile & Marler, 2005). En muchos casos existe una correspondencia entre el comportamiento exhibido en una contienda y los niveles de hormonas esteroides (Earley & Hsu, 2008). Wingfield et al. (1990) sugirieron que los niveles de Testosterona (T) que aumentan cuando un individuo se enfrenta a un co-específico, están relacionados con la expresión de altos niveles de agresión. El papel que se le atribuye a la T es el de sostener la motivación y la capacidad de competencia de los individuos (Wingfield et al., 2006). Estos cambios transitorios en los niveles de andrógenos dependientes de la experiencia previa (con efectos sobre la motivación agresiva) sugieren un posible mecanismo fisiológico del efecto ganador (Oliveira et al., 2009; Oyegbile & Marler, 2005). En peces, los niveles de 11-Ketotestosterona (11-KT), andrógeno bioactivo de teleósteos, son capaces de predecir la dominancia dentro de un grupo social (Oliveira et al., 1996). El uso de bloqueantes de andrógenos en estos individuos impide el establecimiento del efecto ganador (Oliveira et al., 2009). Es importante destacar que los andrógenos se han vinculado al efecto ganador en mamíferos (Oyegbile & Marler, 2005), en aves (Wingfield, 1994; Wingfield y Hahn, 1994) y en peces (Oliveira et al., 2009).

## Modelo experimental

Los peces eléctricos exhiben un sistema de comunicación a través del cual intercambian gran parte de la información social. Los despliegues eléctricos en estas especies son señales comunicativas tanto en individuos dominantes como subordinados. El sistema de comunicación se basa en modificaciones de la amplitud y frecuencia de descarga del órgano eléctrico (DOE), que constituyen entonces señales eléctricas sociales (SES). Los despliegues eléctricos que caracterizan a estos peces, responden a un circuito electrogenerador bien conocido en su sistema nervioso central (Bennett, 1971). Un aumento repentino y breve en la frecuencia de descarga llamado *chirp*, y una interrupción de la descarga llamada *off* son algunos de los despliegues eléctricos que exhiben estos peces, aunque pueden tener distinto significado social en las distintas especies. Los despliegues eléctricos se encuentran asociados a despliegues locomotores, y ambos son de fácil cuantificación permitiendo establecer un flujo de información entre los individuos. Por otro lado, en algunas especies de Gymnotiformes los andrógenos modulan la frecuencia y la duración de la DOE actuando a distintos niveles del sistema electromotor (Lorenzo et al., 2001).

La conducta agonística en Gymnotiformes (orden que nuclea los peces eléctricos sudamericanos) ha sido abordada básicamente en 2 géneros: *Gymnotus* y *Apteronotus* (Black-Cleworth, 1970; Triefenbach & Zakon, 2008). Los despliegues eléctricos que se exhiben en las contiendas en estos géneros son muy diversos y cumplen distintas funciones, señalizando tanto dominancia como subordinación. Un trabajo pionero de descripción de unidades conductuales agonísticas en *Gymnotus carapo*, realizado por Black-Cleworth (1970), expone el rol de las descargas eléctricas en el comportamiento social de esta especie. *G. carapo* exhibe aumentos y disminuciones transitorias en la frecuencia de la DOE (SIDs), señal de amenaza precedente a un ataque. Mientras que interrupciones de la DOE (*off*), se manifiestan como señales de sumisión (Black-Cleworth, 1970). En combates entre machos de *Apteronotus leptorhynchus*, los individuos efectúan aumentos abruptos y breves en la frecuencia de la DOE (llamados chirps) para comparar la habilidad de pelea y evitar el combate físico, asociándose esta señal a la agresión y dominancia (Triefenbach & Zakon, 2008). El efecto ganador ha sido recientemente reportado en Gymnotiformes (Batista, 2011). Sin embargo, es importante destacar que aún restan realizar estudios del efecto ganador en relación con los estados fisiológicos en este orden.

*Gymnotus omarorum* (Richer-de-Forges et al., 2009 Fig. 1), es un pez eléctrico de pulso que presenta conducta agonística durante todo el año, tanto en período reproductivo como no reproductivo (Batista, 2011). Esto ocurre de la misma manera en encuentros intrasexuales como intersexuales. La ausencia de dimorfismo sexual y la agresividad que se presenta durante todo el año hacen a esta especie un modelo biológico muy apropiado en los estudios de agresión exclusivamente territorial durante el período no reproductivo (Batista, 2011).



Figura 1. Ejemplar de *Gymnotus omarorum*.

## Antecedentes específicos

En *G. omarorum* la resolución del conflicto en el período no reproductivo está determinada por asimetrías de tamaño, independiente del sexo de los individuos (Batista, 2011). Es decir que *G. omarorum* presenta agresión territorial no sesgada por el sexo en paradigmas experimentales que aseguran que el valor del recurso en contienda es exclusivamente el territorio y su valor es simétrico para machos y hembras. En este contexto, la diferencia de peso es un buen predictor de la dominancia, el contendiente de mayor tamaño sería el vencedor de una diada cuando la diferencia de peso es mayor al 5% (Batista, 2011). En esta especie, los chirps y los offs se conocen como señales comunicativas que exhiben los individuos subordinados durante contiendas agresivas (Batista, 2011). Como resultado del combate, se establecen marcadas relaciones de dominancia y subordinación (Batista, 2011). Durante el período reproductivo, los machos con una experiencia ganadora en un combate territorial presentan niveles de 11-KT significativamente superiores respecto a los basales (Fig. 2a). Por el contrario, los machos que resultaron ganadores durante el período no reproductivo, no exhibieron una respuesta hormonal de aumento en los niveles de 11-KT (Fig. 2b). Es interesante hacer notar que los niveles de 11-KT en individuos control no mostraron diferencias significativas dentro y fuera del período reproductivo (Batista, 2011).

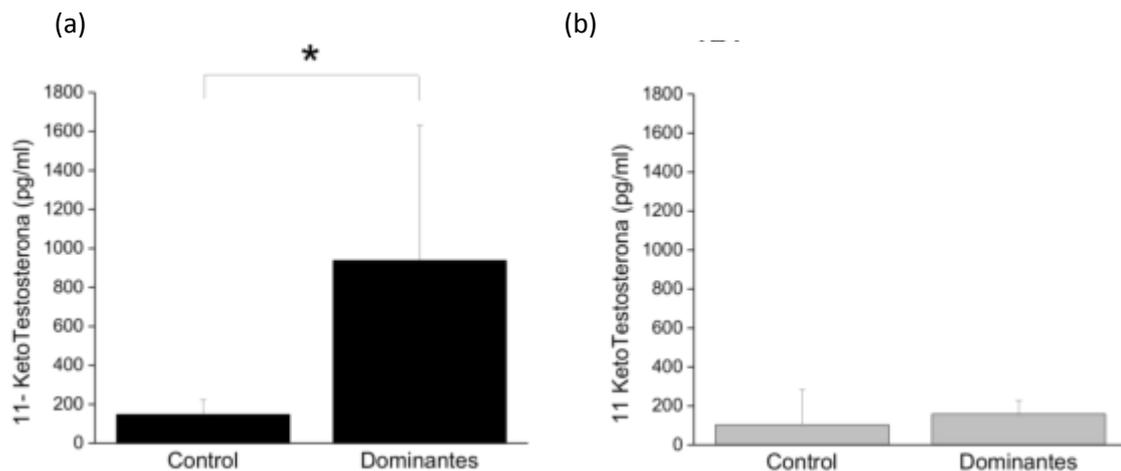


Figura 2. Comparación de la respuesta hormonal de machos dominantes de una interacción agonística territorial. (a) Niveles de 11-KT en machos sin interacción social y machos dominantes durante el periodo reproductivo. (b) Niveles de 11-KT en machos sin interacción social y machos dominantes durante el periodo no reproductivo. \*  $p < 0.05$ , Mann-Whitney U test,  $N_{\text{Control}}=5$ ,  $N_{\text{Dominantes}}=5$ . Tomado de Batista 2011.

Begin (1996) desarrolló un modelo para estimar la probabilidad de dominancia en encuentros entre individuos de tamaño similar donde uno de ellos tiene una experiencia ganadora o perdedora previa y demostró formalmente que los individuos no tienen la misma probabilidad de ganar un segundo encuentro cuando hay asimetrías en la experiencia previa. Si hay efecto ganador, los ganadores de un primer encuentro tendrán una probabilidad mayor al 67% de ganar en una segunda pelea contra los individuos sin experiencia de tamaño similar (para demostrar un efecto ganador). Sin embargo, si hay efecto perdedor, los perdedores de un primer encuentro tendrán una probabilidad menor al 33% de ganar en una segunda pelea contra los individuos sin experiencia de tamaño similar (para demostrar un efecto perdedor).

En un estudio reciente de nuestro grupo, se reportó que fuera del período reproductivo en *G. omarorum* la mayoría de los ganadores de una primera interacción ganaron la segunda

interacción contra individuos de tamaño similar sin experiencia demostrando la presencia de efecto ganador en la especie tanto en machos como en hembras (Fig. 3a). La latencia al primer ataque fue significativamente menor cuando los peces tuvieron una experiencia ganadora (Fig. 3c). Mientras que la tasa de ataques no mostró un aumento significativo en los individuos con experiencia (Fig. 3b)(Batista, 2011).

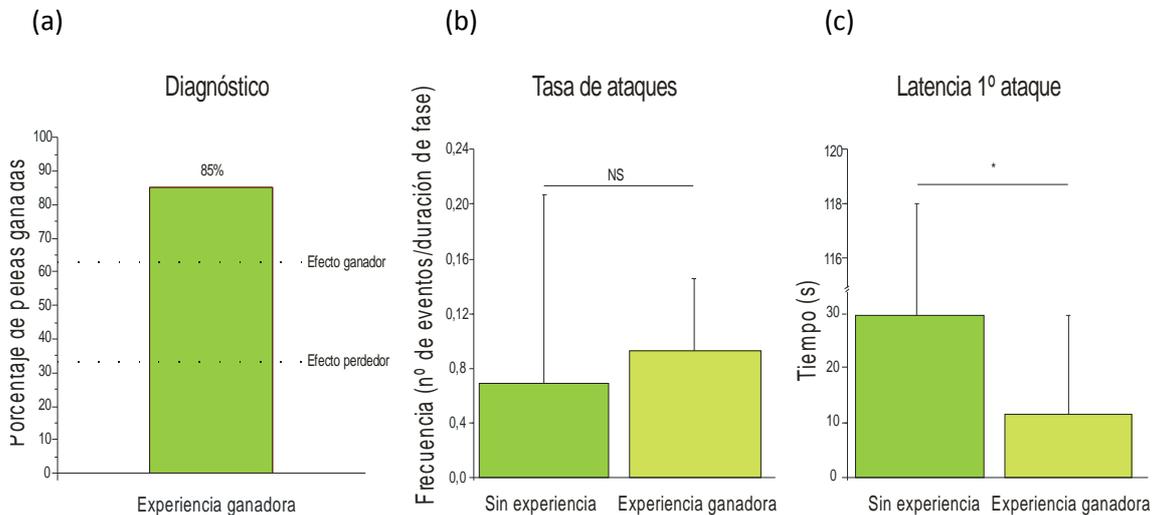


Figura 3. Efectos de una experiencia ganadora sobre la resolución del conflicto y la dinámica de las interacciones agonísticas de *G. omarorum*. (a) Representación gráfica del efecto ganador. Efecto de una experiencia ganadora sobre: (b) latencia al primer ataque, (c) tasa de ataques. \* $p < 0.05$ , prueba de Wilcoxon para variables dependientes. Tomado de Batista 2011.

En teleósteos, se ha demostrado que los mecanismos neuroendócrinos que subyacen al efecto ganador dependen de hormonas androgénicas, dado que el uso de bloqueantes de andrógenos impiden la aparición del efecto ganador (Oliveira, 2009).

## Hipótesis y objetivos

Me propuse estudiar el comportamiento agresivo en *G. omarorum*, una especie que presenta agresión intra e intersexual y efecto ganador fuera del período reproductivo. En particular, me planteé estudiar la dependencia de la conducta agonística y del efecto ganador de las hormonas esteroides gonadales. Las observaciones preliminares sugieren una llamativa independencia relativa de la conducta agonística de las hormonas esteroides gonadales en esta especie. Por otra parte, los reportes previos de los mecanismos neuroendócrinos que sostienen el efecto ganador coinciden en vincularlo a los niveles de andrógenos circulantes. En base a estos antecedentes me planteé las siguientes hipótesis:

### Hipótesis

1. *G. omarorum* presenta conducta agonística en ausencia de hormonas esteroides gonadales
2. *G. omarorum* no presenta efecto ganador en ausencia de hormonas esteroides gonadales.

## Objetivo general

Evaluar los mecanismos neuroendócrinos de la agresión territorial en *G. omarorum*

## Objetivos específicos

- 1- Evaluar si los esteroides gonadales son necesarios para la conducta agonística de *G. omarorum*
- 2- Explorar si los esteroides gonadales son necesarios para el efecto ganador

## Materiales y métodos

### Colecta y alojamiento de peces

Se colectaron ejemplares adultos de *G. omarorum* (longitud corporal mayor a 15 cm) en la Laguna del Sauce (34°51'S, 55°07'W, Departamento de Maldonado) y en la Laguna Lavalle (31°48'S, 55°13'W, Departamento de Tacuarembó), empleando un detector eléctrico compuesto por dos electrodos de registro conectados a un parlante (Silva et al 2003). Para esto, se cuenta con permiso de colecta emitido por la DINARA, MGAP, (resolución N° 065/2004). Los peces obtenidos fueron alojados en condiciones semi-naturales, en piscinas externas de 500 l con fotoperíodo natural, temperatura ambiente y agua de conductividad controlada en la Unidad Bases Neurales de la Conducta en el Dpto. de Neurofisiología, IIBCE. En cada piscina se colocaron 12 peces alojados individualmente para evitar los efectos de la experiencia previa. Para ello, las piscinas se encontraban subdivididas por tabiques, además, a modo de asegurar completa ausencia de interacción física, se colocaron dentro de una malla de plástico. Estos individuos fueron considerados neutrales. Los peces fueron alimentados ad libitum con *Tubifex tubifex*. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a las normativas vigentes de uso de animales de experimentación, con el protocolo experimental aprobado por la comisión de ética de Facultad de Ciencias (4/08/09).

### Gonadectomía quirúrgica

Los peces fueron alojados individualmente en peceras de 20x30x20 cm dentro del laboratorio al menos 24 horas antes de la cirugía para ajustarse al nuevo ambiente. La aclimatación previa disminuye mucho el nivel de estrés o la desorientación que vive el animal y asegura la validez de los resultados experimentales (Olfert et al., 1998). Se mantuvieron registros quirúrgicos (morfología y peso de la gónada para verificar extracción completa) y postquirúrgicos (control de peso y cicatrización de la herida) para todos los animales experimentales. Para la extracción gonadal los peces fueron anestesiados con 2-fenoxietanol (0.75 µg/ml). En primera instancia los peces fueron anestesiados por inmersión en una solución anestésica, efecto que se mantuvo a lo largo de toda la intervención mediante un sistema de ventilación que pasa la solución a través de las branquias. Se realizó una pequeña incisión en la línea media lateral a la altura del inicio de la aleta anal por donde se realizó la extracción gonadal. El pez se mantuvo humedecido a lo largo de toda la cirugía a fin de evitar la desecación y la pérdida de mucosa. Una vez finalizada la intervención, la ventilación se realizó sin anestesia hasta que el pez retomó su ritmo ventilatorio independiente. A partir de ese momento el animal fue colocado

en una pecera de recuperación a una temperatura de 21°C y una conductividad entre 50 y 60  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Cada individuo fue mantenido bajo tratamiento antibiótico, con ampicilina (0.0125%) administrada en el agua, y antiséptico, con nitrato de plata (solución al 1%) que fue aplicado por vía tópica. En estas condiciones permanecieron hasta su recuperación total de la cirugía. Se consideró a un individuo completamente recuperado cuando las heridas cicatrizaron y se estabilizó su peso. Luego de la recuperación los peces retornaron a las piscinas externas. Los individuos permanecieron en recuperación durante al menos un mes antes del día de experimentación.

## Registros conductuales

Los experimentos conductuales se realizaron en el Dpto. de Neurofisiología (Unidad Asociada a la Facultad de Ciencias Neurofisiología-IIBCE) en el marco de las actividades de la Unidad Bases Neurales de la Conducta coordinada por la Dra. Ana Silva. La estación experimental permite el registro simultáneo de los despliegues eléctricos y locomotores en peceras de 55 x 40 x 25 cm. Los experimentos se realizaron bajo condiciones controladas de conductividad, fotoperíodo y temperatura. El registro de la interacción se realizó durante la noche debido a los hábitos nocturnos de la especie, con iluminación infrarroja. Los despliegues locomotores fueron registrados con una cámara de video (SONY CCD-Iris). Los despliegues eléctricos se registraron mediante dos pares de electrodos dispuestos en forma ortogonal en las paredes de la pecera, acoplados a amplificadores de señales extracelulares (Cygnus FLA-01) y conectados a una PC donde se almacenaron los registros para su posterior análisis. Todos los experimentos fueron realizados fuera del período reproductivo.

## Protocolos conductuales

Para el análisis de la conducta agonística se utilizaron individuos gonadectomizados en encuentros diádicos entre individuos con una diferencia de peso entre 5 y 15% utilizando un protocolo de compuerta (Fig. 4). Los peces se aclimataron 2 hs antes del inicio del experimento en la misma pecera, separados por una compuerta que se levantó 5 minutos después del inicio de la fase oscura. Se detuvo la interacción 10 minutos después de la resolución del conflicto. Para poner a prueba la existencia de efecto ganador, se utilizaron grupos de 3 individuos para participar en dos rondas de interacciones. Una primera interacción pre-test entre individuos con una diferencia de peso y longitud mayor al 10%. Durante esta primera interacción el individuo dominante obtiene una experiencia ganadora. Una hora después, se prueba al individuo ganador frente a un rival con una diferencia de peso y longitud menor al 5%. Se determina la existencia de efecto ganador cuando los individuos con experiencia ganadora resultan vencedores en más de un 67% de los encuentros frente a individuos de igual tamaño (Hsu et al., 2006).

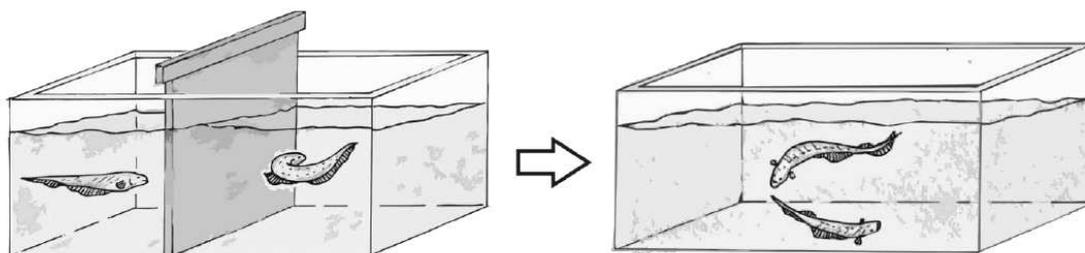


Figura 4. Protocolo de compuerta. Los individuos se encuentran en la misma pecera separados por una compuerta quedando imposibilitados de atacarse (izquierda). Luego de la remoción de la misma los peces quedan expuestos y comienza la pelea (derecha). Tomado de Batista 2011.

## **Análisis comportamental de los despliegues eléctricos y locomotores**

El análisis conductual se realizó mediante el método de observación de animal focal sobre cada integrante de la díada tomando como referencia las unidades conductuales definidas por Black-Cleworth (1970) y adaptadas por Batista (2008). Dada la asimetría de las relaciones de dominancia se estableció la resolución del conflicto al registrarse tres alejamientos de uno de los peces sin respuesta agresiva. Se emplearon parámetros locomotores y eléctricos claramente identificados con la agresión teniendo en cuenta tres momentos en la interacción: 1-previo a la primera interacción agresiva, 2-fase de agresión, 3-post-resolución del conflicto. En cada momento de la contienda se realizó la cuantificación de ocurrencia, frecuencia y duración de las unidades conductuales presentes en las interacciones agonísticas de *G. omarorum*. La caracterización de la dinámica del conflicto se realizó registrando los parámetros conductuales exhibidos durante las contiendas, despliegues agresivos y de sumisión. Como despliegues agresivos se consideraron los ataques (mordidas + golpes); y como despliegues de sumisión las SES, emitidas característicamente por el subordinado (frecuencia de offs y de chirps). Se prestó especial atención a la duración del conflicto y a las latencias al primer ataque, off y chirp. La latencia mide el tiempo que transcurre desde que se retira la compuerta, cuando los individuos pueden comenzar a interactuar, hasta la primera aparición de los comportamientos mencionados.

## **Resultados**

### **Objetivo específico 1: Evaluar si los esteroides gonadales son necesarios para la conducta agonística de *G. omarorum***

Se evaluó la presencia y las características de la conducta agonística en un total de 7 díadas de individuos gonadectomizados. Como grupo control se utilizaron 11 díadas de individuos intactos con igual asimetría de peso al grupo problema (tomados de experimentos previos Batista 2011).

### **Resultado de las contiendas**

Todas las díadas de individuos gonadectomizados exhibieron comportamientos agonísticos. Se establecieron relaciones de dominancia entre los individuos en 6 de las 7 contiendas (Tabla 1). Cinco de estos 7 enfrentamientos se consumaron con la dominancia esperada según las predicciones del modelo (Tabla 1). En todos los casos, las relaciones de dominancia se establecieron de manera inequívoca y no se revirtieron en el período post-resolución observado.

#### **Resultado de las contiendas**

	Díadas	Diferencia de peso	Resolución	Dominancia esperada
Control	11	5-20%	11/11	10/11
Gonadectomizados	7	5-20%	6/7	5/6

Tabla 1. Resultado de las contiendas. Resolución indica el número de enfrentamientos en los que se establecieron relaciones de dominancia entre los individuos respecto al total de las díadas. Dominancia esperada es el número de contiendas que se resolvieron de acuerdo a las predicciones según la asimetría de peso respecto al total de las díadas resueltas.

## Dinámica de las contiendas

Se evaluó la variación en la dinámica del conflicto, o sea, la expresión temporal de los despliegues locomotores y eléctricos en las contiendas. Los individuos gonadectomizados exhibieron una dinámica de conflicto igual a la de los individuos intactos. Como se muestra en la Fig. 5, en individuos gonadectomizados, se observaron las 3 fases características de una contienda; pre-conflicto, conflicto y post-conflicto. Las dos primeras fases están separadas por el primer ataque, cuando uno de los individuos decide atacar. Mientras que las dos últimas se separan por la resolución, cuando uno de los individuos decide retirarse. Una vez que el conflicto se resuelve (cuando el subordinado realiza 3 huidas consecutivas) las relaciones de dominancia quedan establecidas, donde el dominante continúa atacando y el subordinado solamente huye. Los despliegues eléctricos muestran un patrón temporal indistinguible al de los individuos intactos, el primer off ocurre durante la fase de conflicto, y el primer chirp en el Post-conflicto.

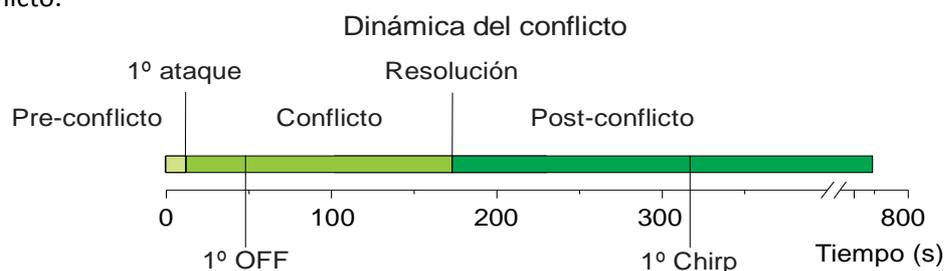


Figura 5. Dinámica del conflicto.

Los valores de tiempo que se muestran en la figura representan medianas. N= 7

Para establecer la duración del conflicto se consideró el tiempo entre el primer ataque y la resolución. La duración del conflicto no mostró diferencias significativas entre individuos gonadectomizados e individuos intactos según se muestra en la Fig. 6. Por otro lado, se midió la latencia al primer ataque, no hay diferencias significativas entre grupos experimentales (Fig. 6).

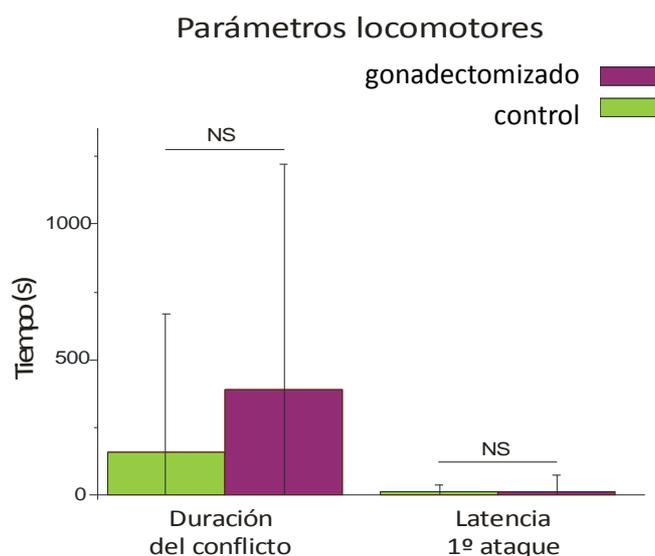


Figura 6. Dinámica de los parámetros Locomotores. Las barras verdes corresponden al grupo control y las violetas al gonadectomizado. Valores expresados en medianas e IQR. Tanto la duración del conflicto como la latencia al primer ataque no fueron significativamente distintas entre los grupos experimentales. Duración del conflicto  $p=0.65$ ; Latencia 1º ataque  $p=0.89$ , Mann-Whitney U test,  $N_{Control}= 11$ ,  $N_{Gonadectomizados}= 7$ .

Además se consideró la latencia de los parámetros eléctricos, primer off y primer chirp. Como se muestra en la Fig. 7, las latencias al primer off y chirp no son significativamente distintas entre individuos gonadectomizados e individuos intactos.

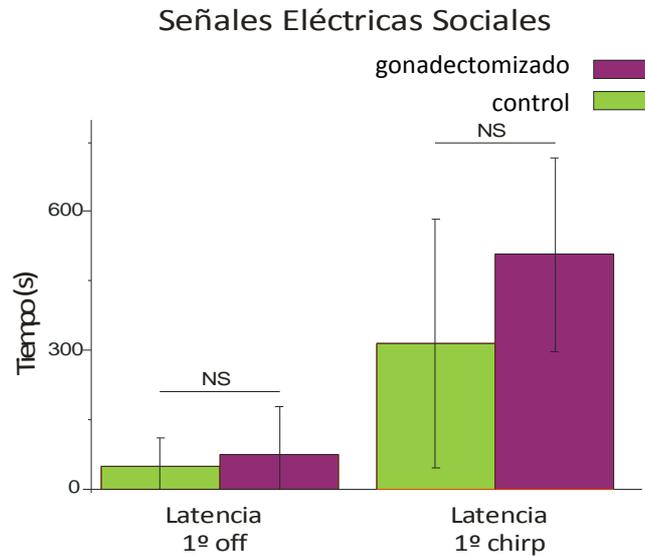


Figura 7. Dinámica de las señales eléctricas sociales. Las barras verdes corresponden al grupo control y las violetas al gonadectomizado. Valores expresados en medianas e IQR. La latencia al primer off y chirp no fueron significativamente distintas entre los grupos experimentales. Latencia 1º off  $p=0.94$ ; Latencia 1º chirp  $p=0.53$ , Mann-Whitney U test,  $N_{Control}= 11$ ,  $N_{Gonadectomizados}= 7$ .

### Niveles de agresión y sumisión

Se consideró como despliegue de agresión la frecuencia de ataques (mordidas + golpes) en el conflicto. Se evaluaron las diferencias entre individuos gonadectomizados y controles (Fig. 8).

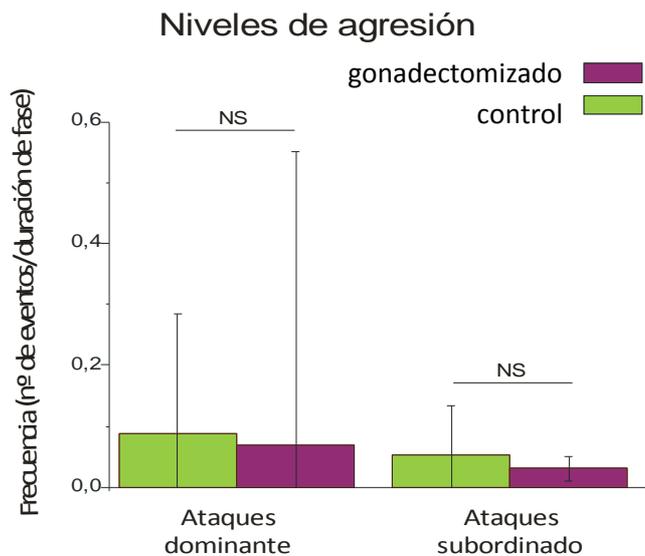


Figura 8. Niveles de agresión. Las barras verdes corresponden al grupo control y las violetas al gonadectomizado. Valores expresados en medianas e IQR. Tanto la tasa de ataques del dominante como la del subordinado no fueron significativamente distintas entre gonadectomizados y controles. Ataques dominante  $p=0.59$ ; Ataques subordinado  $p=0.11$ , Mann-Whitney U test,  $N_{Control}= 11$ ,  $N_{Gonadectomizados}= 7$ .

Se consideraron como despliegues de sumisión las SES emitidas característicamente por el subordinado. La frecuencia de off se midió tanto en el conflicto como en el post-conflicto, la frecuencia de chirps se midió en el conflicto ya que se emite únicamente en esta fase. Se evaluaron las diferencias entre individuos gonadectomizados y controles (Fig. 9).

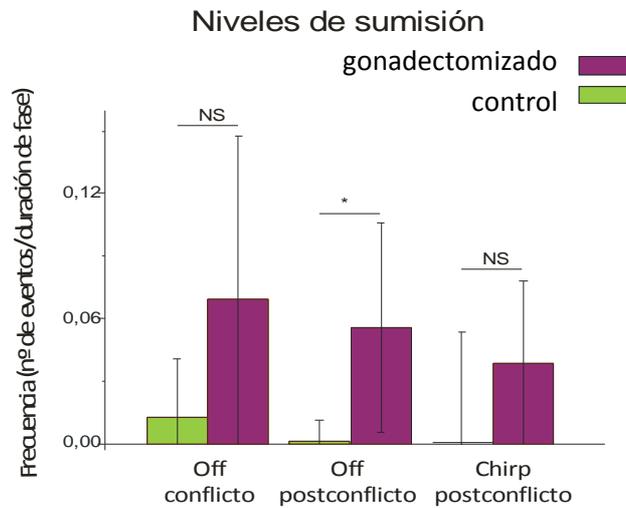


Figura 9. Niveles de sumisión. Las barras verdes corresponden al grupo control y las violetas al gonadectomizado. Los valores representan medianas e IQR de las tasas. La tasa de Off post-conflicto fue significativamente distinta entre los grupos,  $p=0.032$ . No hubo diferencias significativas entre los grupos para los restantes parámetros, off conflicto  $p=0.19$ ; chirp post-conflicto  $p=0.54$ . \*  $< 0.05$ , Mann Whitney U Test.  $N_{Control}= 11$ ,  $N_{Gonadectomizados}= 7$ .

### Objetivo específico 2: Explorar si los esteroides gonadales son necesarios para el efecto ganador

Se evaluó la presencia de efecto ganador en un total de 7 individuos gonadectomizados con experiencia ganadora. Como grupo control se utilizaron 7 días de individuos gonadectomizados sin experiencia y 20 días de individuos intactos con experiencia.

Los individuos gonadectomizados con experiencia ganadora resultaron dominantes en 3 de 7 interacciones, 43%. Esto revela que *G. amarorum* no presenta efecto ganador en ausencia de hormonas esteroides gonadales (Fig. 10).

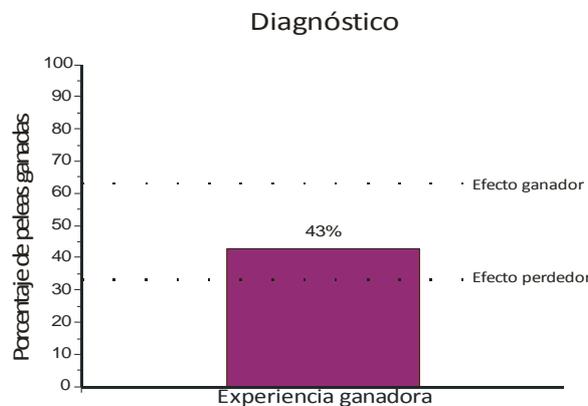


Figura 10. Diagnóstico del efecto ganador. El porcentaje de peleas ganadas se encuentra por debajo del umbral del efecto ganador.  $N_{Gonadectomizados}= 7$ .

A pesar de que confirmamos la no existencia de efecto ganador, evaluamos igualmente el posible impacto de la experiencia ganadora en los parámetros afectados en condiciones normales: a) Latencia al primer ataque (que disminuye con la experiencia, Fig. 3c) y b) niveles de agresión (que aumentan aunque no significativamente con la experiencia, Fig. 3b). Dado que ambos parámetros no se ven influidos por la asimetría de pesos (Batista, 2011) evaluamos el efecto de la experiencia entre individuos naive y segunda interacción, ambos gonadectomizados. También quisimos confirmar que estos parámetros se modifican entre individuos con experiencia, gonadectomizados e intactos. Como se muestra en la Fig. 11, la latencia al primer ataque fue significativamente diferente entre individuos gonadectomizados e intactos, pero no entre individuos gonadectomizados con y sin experiencia. No se observaron diferencias significativas en la tasa de ataques entre los tres grupos considerados (Fig.12).

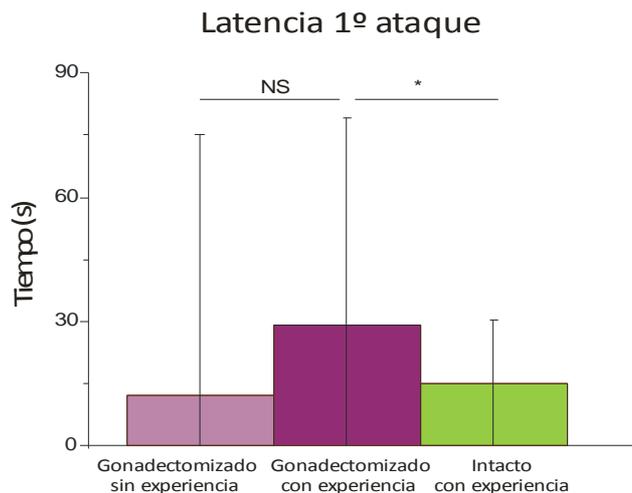


Figura 11. Evaluación del efecto de la experiencia y la gonadectomía sobre la latencia al primer ataque. Valores expresados en medianas e IQR. No hubo diferencias significativas entre gonadectomizados con y sin experiencia,  $p=0.28$ . Mientras que la latencia al 1º ataque es significativamente menor que en individuos con experiencia intactos que en con experiencia gonadectomizados  $p=0.04$ . Mann Whitney U Test.  $N_{\text{Gonadectomizados sin experiencia}} = 7$ ,  $N_{\text{Gonadectomizados con experiencia}} = 7$ .  $N_{\text{Intactos con experiencia}} = 20$

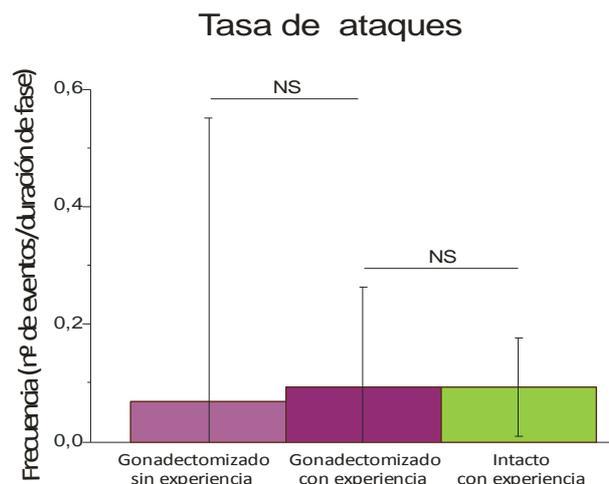


Figura 12. Evaluación del efecto de la experiencia y la gonadectomía sobre la tasa de ataques. Valores expresados en medianas e IQR. No hubo diferencias significativas entre los grupos. Entre gonadectomizados con y sin experiencia,  $p= 0,89$ , entre individuos con experiencia gonadectomizados e intactos  $p=0.93$ . Mann Whitney U Test.  $N_{\text{Gonadectomizados sin experiencia}} = 7$ ,  $N_{\text{Gonadectomizados con experiencia}} = 7$ .  $N_{\text{Intactos con experiencia}} = 20$

## Discusión

### Rol de los esteroides gonadales en la conducta agonística de *G. amarorum*

El dogma de la contribución de los andrógenos a la agresión, ha sido estudiado en biología y respaldado por una gran cantidad de evidencia. La capacidad de la T para facilitar la expresión de la conducta agresiva entre machos ha sido ampliamente documentada en una gran variedad de especies (Nelson, 2006). Esto se demostró claramente y de forma inequívoca a través de experimentos de castración y reemplazo hormonal y los estudios de los efectos estacionales en la función testicular y el comportamiento (Nelson, 2000). Una de las hipótesis más aceptadas es la contribución de los andrógenos en la regulación de la agresión a través de sus acciones como moduladores de la función neuroquímica. La hipótesis de neuromodulador se ilustra considerando los procesos androgénicos que regulan la agresión en la edad adulta y cómo estos procesos interactúan con los representantes de los sistemas neuroquímicos.

Los andrógenos contribuyen a la expresión de la conducta agresiva. Aunque ésta es una de las relaciones más ampliamente reconocida y citada frecuentemente en endocrinología del comportamiento, la caracterización de cómo influyen los andrógenos con precisión en la agresión sigue siendo un trabajo en progreso (Nelson, 2006).

En el presente trabajo se evaluó la relación entre los esteroides gonadales y la conducta agonística. Se confirmó nuestra primera hipótesis respecto a que, *G. amarorum* presenta conducta agonística aún en ausencia de hormonas esteroides gonadales. Los individuos gonadectomizados establecieron contiendas agresivas que se resolvieron con las relaciones de dominancia esperada (Tabla 1). Los parámetros locomotores y eléctricos de los encuentros entre individuos gonadectomizados fueron indistinguibles de los controles, la duración del conflicto, latencia 1º ataque, latencia 1º off, latencia 1º chirp, tasa de ataques dominante, tasa de ataques subordinado, tasa de offs conflicto y tasa de chirp post-conflicto, los cuales no mostraron diferencias significativas entre los grupos. De los nueve comportamientos agonísticos evaluados en las contiendas, sólo la tasa de offs post-conflicto fue significativamente mayor en individuos gonadectomizados (Fig. 9). Estos resultados indican que la agresión y el establecimiento de dominancia en *G. amarorum* no dependen de hormonas de origen gonadal fuera del período reproductivo, y habilitan interesantes reflexiones sobre la relación agresión-hormonas esteroides en vertebrados. Es más, el hecho de que los individuos gonadectomizados desplieguen agresión territorial indistinguible de los individuos intactos, nos permite especular que las hormonas esteroides gonadales no son necesarias para la conducta agonística aún en individuos intactos.

Debido a la escasez de estudios en especies que mantienen conductas territoriales fuera del período reproductivo en teleósteos, hasta ahora no existían registros de agresión territorial independiente de los niveles de hormonas esteroides gonadales circulantes. Este es el primer trabajo que demuestra agresión territorial independiente de hormonas esteroides gonadales en teleósteos.

La agresión territorial y su relación con hormonas esteroides, principalmente T, fue estudiada en aves que expresan agresión territorial durante el período no reproductivo. La territorialidad durante el invierno debería ser independiente de la T ya que los niveles de esteroides circulantes son bajos (Soma & Wingfield, 1999). Además, en el período no reproductivo, la disponibilidad de alimentos y la temperatura son bajas y la T puede acarrear altos costos energéticos durante este período. En gorriones cantores (*Melospiza melodia*), el tratamiento con T aumenta la tasa metabólica basal, disminuye los depósitos de grasa, inhibe el sistema inmunológico y puede estimular el comportamiento reproductivo, inapropiado durante el

invierno (Wingfield et al., 2006). Así, los mecanismos neuroendócrinos pueden haber evolucionado quizá favoreciendo el mantenimiento de la agresión en contextos no reproductivos, eludiendo los costos de la alta T circulante (Soma, 2006). Los machos de gorriones cantores presentan grandes similitudes con la especie de este trabajo en cuanto a los niveles de agresividad y las respuestas hormonales. Durante el período no reproductivo, los machos de gorriones cantores, presentan las gónadas regresadas y los niveles de esteroides sexuales en plasma son basales o indetectables, pero defienden agresivamente sus territorios (Soma & Wingfield, 1999). Las interacciones agresivas entre machos de gorriones cantores, estimulan la secreción de T durante el período reproductivo (Soma & Wingfield, 1999), mientras que no producen cambios en el período no reproductivo (Wingfield & Hahn, 1994). Además la administración de bloqueantes de receptores de andrógenos (Soma & Wingfield, 1999) y la castración (Wingfield, 1994), no producen efectos sobre la conducta agresiva de esta especie fuera del período reproductivo. El hormiguero moteado (*Hylophylax naevioides*), también aumenta los niveles de T luego de interacciones sociales en el período reproductivo (Wingfield et al., 1990). Esta especie muestra diferencias estacionales en el tratamiento antiandrogénico, reduciendo significativamente la agresión territorial durante el período reproductivo (Hau et al., 2000), mientras que durante el período no reproductivo este tratamiento no afecta la agresión territorial (Hau et al., 2011).

Los resultados obtenidos en este estudio dejan una puerta abierta a vías alternativas de regulación de la agresión territorial en *G. omarorum*. Se han propuesto distintos mecanismos hormonales para regular la agresividad no reproductiva de vertebrados. Uno importante a destacar, por la similitud anteriormente mencionada de *G. omarorum* con los gorriones cantores, es la postulación de los estrógenos como el soporte de la agresión territorial en el período no reproductivo. En los gorriones cantores intactos, el tratamiento con un potente inhibidor de la aromatasa (enzima que cataliza la conversión de T a estradiol) reduce sustancialmente el comportamiento agresivo entre machos durante el período no reproductivo. La administración de estrógeno a los tratados restablece el comportamiento agresivo (Soma et al., 2000). Los gorriones cantores presentan una elevada actividad aromatasa en el cerebro, tanto en el período reproductivo como en el no reproductivo (Soma, 2006). De esta manera, la neurosíntesis de esteroides sería el mecanismo principal por el cual se regulan los comportamientos agresivos fuera del período reproductivo (Pradhan et al., 2010). Si bien la fuente fundamental de hormonas esteroides son las gónadas, se ha demostrado que se pueden sintetizar estrógenos y T en el cerebro en base a la DHEA (prohormona de origen suprarrenal) o de novo a partir de colesterol (Wingfield et al., 2006; Pradhan et al., 2010). Por otro lado, un estudio realizado en *Lythrypnus dalli*, demostró que una disminución en la actividad aromatasa desencadena un aumento en la agresividad (Black et al., 2005a). Algunos datos sugieren que los mecanismos reguladores de la agresión territorial en *G. omarorum* estarían vinculados con la actividad de la aromatasa, ya que algunos estudios en teleósteos reportan una elevadísima actividad aromatasa en el SNC (evidenciando que el rol de los neuroesteroides en la regulación de los comportamientos de este grupo puede ser de gran importancia) (Forlano et al., 2006). En este sentido sería interesante evaluar el rol de la actividad aromatasa en la regulación de comportamientos *G. omarorum* mediante el uso de agonistas y antagonistas de esta enzima. También se puede evaluar la capacidad de neurosíntesis de esteroides, por medio de estudios de hibridación *in situ* que revelen la expresión de enzimas necesarias para la catálisis en la síntesis de neuroesteroides.

### **Rol de los esteroides gonadales en el efecto ganador**

En gorriones cantores, el tratamiento con T en el período reproductivo aumenta los niveles de agresión frente a los no tratados (Wingfield, 1994). Los machos de hormiguero moteado,

muestran un aumento en los niveles de T circulante durante interacciones sociales de alta intensidad independientemente de la temporada, por ejemplo, cuando varios machos invaden un territorio seguido de estímulos agresivos de larga duración (Wikelski et al., 1999). Estos datos sugieren que una función del aumento de T sería promover la intensidad y la persistencia de la conducta agresiva (Wingfield y Hahn, 1994). Se plantea que las consecuencias funcionales de los cambios en la testosterona estarían mediando el comportamiento, ya sea transitorio o de largo plazo. La explicación más plausible es que la T aumentó en estas especies (territoriales durante todo el año) para aumentar la probabilidad de ganar un combate futuro, es decir, para mediar en el efecto ganador (Oliveira, 2009; Oyegible, 2005).

Los resultados obtenidos demuestran que, *G. omarorum* no exhibe efecto ganador en ausencia de hormonas esteroides gonadales. Los individuos castrados con una victoria previa no modificaron la probabilidad de ganar un segundo combate una hora después (Fig. 10), indicando la desaparición de efecto ganador en ausencia de esteroides gonadales. En concordancia con esto, la latencia al primer ataque no disminuyó por el efecto de una victoria previa (Fig. 11) parámetro que se ve modificado en individuos intactos (Fig. 3) lo cual indica la motivación agresiva luego de un triunfo. Sin embargo, se observó la tendencia al aumento de la tasa de ataques en individuos gonadectomizados (Fig. 12). Estos resultados indican que el establecimiento del efecto ganador en *G. omarorum* depende de hormonas de origen gonadal fuera del período reproductivo. Estos datos sugieren un papel de los andrógenos gonadales como reforzadores del comportamiento agresivo en individuos ganadores de encuentros previos.

Los niveles de andrógenos circulantes y su relación con una victoria previa en la motivación agresiva han sido reportados anteriormente. Estudios de los efectos de la castración sobre la experiencia social previa fueron realizados en ratones *Peromyscus californicus*, y se vio que la castración inhibe los efectos de una victoria previa. Los machos castrados, a diferencia de los intactos, no disminuyeron la latencia al ataque (Trainor & Marler, 2001) y la agresión no aumenta como resultado de experiencias ganadoras (Trainor et al., 2004). Recientemente, en teleósteos se demostró la dependencia de los andrógenos para el efecto ganador, en donde la aplicación de bloqueantes para receptores de 11-KT impidió el establecimiento del efecto ganador (Oliveira et al., 2009).

Un posible mecanismo es que los andrógenos gonadales causen cambios en el comportamiento futuro a largo plazo, relacionado con la modificación de los sistemas neuroquímicos, como la arginina, vasotósina, serotonina o la dopamina. Se conoce que los mismos están asociados con la agresión, y por lo tanto, tal vez influenciados directamente por la T (Fuxjager et al., 2010).

Otro mecanismo alternativo se podría relacionar a un aumento en la sensibilidad a los andrógenos por un aumento de los receptores de andrógenos en regiones del cerebro asociadas con el control de la agresión, como ocurre en *P. californicus* (Fuxjager et al., 2010). Sin embargo, el efecto ganador en *G. omarorum* se observa una hora después de la primer pelea, tiempo insuficiente para que los cambios comportamentales se deban a la expresión de nuevos receptores.

Para el caso de *G. omarorum*, el hecho que las observaciones del efecto de la experiencia en este estudio se hayan restringido al período no reproductivo sugiere que los niveles basales de andrógenos, a pesar de ser bajos, son esenciales en la integración de una experiencia ganadora. Los datos aquí presentados sugieren que los andrógenos pueden jugar un papel como mediadores fisiológicos del efecto ganador. Así, aunque funcionalmente relacionadas, la agresión territorial y el efecto ganador pueden basarse en diferentes mecanismos causales.

La eficacia del tratamiento merece algunos comentarios. En el momento de la extracción de la gónada, se realizaron observaciones de la morfología bajo lupa controlando la extracción total de la misma. El hecho de una posible regeneración luego de la extracción no se descarta, para lo cual se requieren controles adicionales (mediciones hormonales, control histológico post mortem), que por razones operativas no fue posible realizarlos. Estos controles serán realizados en estudios posteriores para confirmar la eficacia de la cirugía. Sin embargo, la naturaleza de los resultados sugiere que esto no sucedió. La presencia de conducta agonística en individuos gonadectomizados podría indicar la regeneración de la gónada, no obstante la desaparición del efecto ganador estaría indicando la ausencia de regeneración.

## Conclusiones, contribuciones y perspectivas

Este es el primer trabajo que demuestra agresión territorial independiente de hormonas esteroides gonadales en teleósteos y constituye un primer paso en el estudio de los mecanismos neuroendócrinos que subyacen la agresión territorial.

A partir de este estudio se confirma que la agresión y el establecimiento de dominancia en *G. omarorum* no dependen de hormonas de origen gonadal fuera del período reproductivo, hecho que requerirá de análisis más exhaustivos en el futuro. Como posible perspectiva, sería interesante evaluar el rol de la actividad de la aromatasa en la regulación de comportamientos de esta especie, mediante el uso de agonistas y antagonistas de esta enzima. También se puede evaluar la capacidad de neurosíntesis de esteroides, por medio de estudios de hibridación *in situ* que podrían revelar expresión de enzimas necesarias para la catálisis en la síntesis de neuroesteroides.

El presente estudio concluye que el establecimiento del efecto ganador en *G. omarorum* depende de hormonas de origen gonadal fuera del período reproductivo. Sería interesante demostrar que el tratamiento con 11-KT restituye el efecto ganador en individuos gonadectomizados de esta especie.

Estas perspectivas serán abordadas en mi proyecto de maestría, que ya está siendo preparado para iniciarse en 2012.

Este trabajo fue presentado mediante poster en las III Jornadas Uruguayas de Comportamiento animal (Agosto 2011), Facultad de Ciencias, UdelAR. Montevideo, Uruguay.

Efectos de las hormonas esteroides gonadales sobre la conducta agonística de *Gymnotus omarorum*.

Cecilia Jalabert, Gervasio Batista y Ana Silva.

Asimismo este trabajo se integra a un manuscrito en preparación que será enviado para su publicación en 2012.

Gonadectomized individuals exhibit territorial aggression but not winner effect in the weakly electric fish *Gymnotus omarorum*.

Gervasio Batista, Cecilia Jalabert y Ana Silva.

## Referencias

Austad, S. N. (1983). A game theoretical interpretation of male combat in the bowl and doily spider (*Frontinella pyramitela*). *Animal Behaviour*, 31, 59-73.

- Batista, G. (2008). Informe de pasantía de grado: Estudio comparativo del comportamiento agonístico en dos especies autóctonas de peces eléctricos. UdelaR.
- Batista, G. (2011). Agresión territorial fuera del período reproductivo. Efecto de la experiencia social previa sobre la conducta agonística de *Gymnotus omarorum*. Pedeciba. Tesis de Maestría: UdelaR
- Begin, J. (1996). Selecting dominants and subordinates at conflict outcome can confound the effects of prior dominance or subordination experience. *Behavioural Processes*, 36, 219-226.
- Bennett, M. V. L. (1971). Electrolocation in fish. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 188(1), 242 - 269.
- Black, M. P., Balthazart, J., Baillien, M., Grober, M. S. (2005a). Socially induced and rapid increases in aggression are inversely related to brain aromatase activity in a sex-changing fish, *Lythrypnus dalli*. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 272, 2435-40.
- Black-Cleworth, P. (1970). The role of Electrical discharges in the non-reproductive social behaviour of *Gymnotus Carapo* (Gymnotidae, Pisces). *Animal Behaviour*, 3, 3-75.
- Earley, R. L., Hsu, Y. (2008). Reciprocity between endocrine state and contest behavior in the killifish, *Kryptolebias marmoratus*. *Hormones and behavior*, 53(3), 442-51.
- Forlano, P. M., Schlinger, B. A., Bass, A. H. (2006). Brain aromatase: new lessons from non-mammalian model systems. *Frontiers in neuroendocrinology*, 27, 247-74.
- Fuxjager, M. J., Forbes-Lorman, R. M., Coss, D. J., Auger, C. J., Auger, a P., Marler, C. A. (2010). Winning territorial disputes selectively enhances androgen sensitivity in neural pathways related to motivation and social aggression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 12393-12398.
- Hau, M., Wikelski, M., Soma, K.K., Wingfield JC. (2000). Testosterone and year-round territorial aggression in a tropical bird. *General and Comparative Endocrinology*; 117: 20–33.
- Hau, M., Beebe K. (2011). Plastic endocrine regulation of year-round territorial aggression in tropical male spotted antbirds. *General and Comparative Endocrinology*; 172: 305-313
- Hsu, Y., Earley, R. L., Wolf, L. L. (2006). Modulation of aggressive behaviour by fighting experience: mechanisms and contest outcomes. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 81(1), 33-74.
- Huntingford, F., Turner A. K., Downie, L. M. (1987). *Animal conflict*. Chapman and Hall animal behaviour series. (p. 448).
- Lorenzo, D., Silva, A., Caputi, A., Borde, M., & Macadar, O. (2001). Electrogenation in South American weakly electric fish. *Renaissance Quarterly*. Kapoor BG, Hara TJ (Eds) *Sensory biology of jawed fishes*. Oxford & IBH Publishing Co Put Ltd. New Delhi.
- Nelson, R. J. (2000). *An introduction to behavioral endocrinology* (2nd ed.). Sunderland, MA: Sinauer.

- Nelson, R. J. (2006). *Biology of Aggression*. Oxford University Press.
- Olfert, D. E., Cross, B. M., McWilliam, A. A. (1998). *Manual sobre el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación*. Consejo Canadiense de Protección de los Animales.
- 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, 2–12.
- Oliveira, R. F., Silva, A., Canário, A. V. M. (2009). Why do winners keep winning? Androgen mediation of winner but not loser effects in cichlid fish. *Proceedings. Biological sciences/ The Royal Society*, 276(1665), 2249-56.
- Oyegbile, T. O., Marler, C. A. (2005). Winning fights elevates testosterone levels in California mice and enhances future ability to win fights. *Hormones and behavior*, 48(3), 259-67.
- Pradhan, D. S., Newman, A. E. M., Wacker, D. W., Wingfield, J. C., Schlinger, B. A., Soma, K. K. (2010). Aggressive interactions rapidly increase androgen synthesis in the brain during the non-breeding season. *Hormones and behavior*, 57, 381-9.
- Richer-de-Forges, M. M., Crampton, W. G. R., Albert, J. S. (2009). A New Species of *Gymnotus* (Gymnotiformes, Gymnotidae) from Uruguay: Description of a Model Species in Neurophysiological Research. *Copeia*, 3, 538-544.
- Rutte, C., Taborsky, M., Brinkhof, M. W. G. (2006). What sets the odds of winning and losing? *Trends in ecology & evolution (Personal edition)*, 21(1), 16-21.
- Silva, A., Quintana, L., Galeano, M., Errandonea, P. (2003). Biogeography and Breeding in Gymnotiformes from Uruguay. *Environmental Biology of Fishes*. 66 (4), 329-338.
- Soma, K. K. (2006). Testosterone and aggression: Berthold, birds and beyond. *Journal of Neuroendocrinology*. 18, 543–551.
- Soma, K. K., Wingfield, J. C. (1999). Endocrinology of aggression in the non-breeding season. In: Adams N, Slotow R, eds. *Twenty-Second International Ornithological Congress*. Durban: University of Natal, 1606–1620.
- Soma, K. K., Tramontin, A. D., Wingfield, J. C. (2000). Oestrogen regulates male aggression in the non-breeding season. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biology Science*, 267: 1089–1096.
- Trainor, B. C., Marler, C. A. (2001). Testosterone, paternal behavior, and aggression in the monogamous California mouse (*Peromyscus californicus*). *Hormones and Behavior*. 40, 32–42.
- Trainor, B. C., Bird, I. M., Marler, C. A. (2004). Opposing hormonal mechanisms of aggression revealed through short-lived testosterone manipulations and multiple winning experiences. *Hormones and Behavior*; 45, 115-21.
- Triefenbach, F., Zakon, H. (2008a). Changes in signalling during agonistic interactions between male weakly electric knifefish, *Apteronotus leptorhynchus*. *Animal Behavior*; 75, 1263-1272.

- Wingfield, J. C., Hegner, R.E., Dufty, A.M., Ball, G.F. (1990). The challenge hypothesis: theoretical implications for patterns of testosterone secretion, mating systems, and breeding strategies. *The American Naturalist*; 136, 829–846.
- Wingfield, J. C. (1994). Regulation of territorial behavior in the sedentary song sparrow, *Melospiza melodia morphna*. *Hormones and Behavior*; 28, 1–15.
- Wingfield, J. C., Hahn, T. P. (1994). Testosterone and territorial behavior in sedentary and migratory sparrows. *Animal Behavior*; 47, 77–89.
- Wingfield, J. C., Moore, I. T., Goymann, W., Wacker, D. W., Sperry, T. (2006). Contexts and Ethology of Vertebrate Aggression: Implications for the Evolution of Hormone-Behavior Interactions. In: *Biology of aggression*, London: Oxford University Press.
- Wikelski, M., Hau, M., Wingfield, J.C. (1999). Social instability increases testosterone year-round in a tropical bird, *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biology Science*; 266,0 1–6.