

TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Una aproximación al estudio de las bases transcriptómicas cerebrales
de las jerarquías sociales en dos especies de teleósteos**

Guillermo Valiño Amodio

Orientadora: Ana Silva (Laboratorio de Neurociencias)

Co-orientadora: Bettina Tassino (Sección Etología)

Laboratorio en ejecución: Sección Etología, Facultad de Ciencias; Unidad Bases Neurales de la Conducta, IIBCE.

18/09/2017

RESUMEN

La competencia entre co-específicos por el acceso a un recurso limitante, genera un conflicto entre dos o más individuos. La resolución del conflicto determina la formación de una jerarquía de dominancia-subordinación, en la que el dominante es quien gana el acceso al recurso. Esta jerarquía puede mantenerse a lo largo del tiempo entre los mismos individuos, generándose una asimetría en el uso del recurso. El siguiente estudio, presenta la caracterización de la dominancia sostenida a lo largo del tiempo en dos especies: en el pez anual *Austrolebias reicherti* y en el pez eléctrico *Gymnotus omarorum*. En ambas especies ya ha sido estudiada de manera exhaustiva la formación de una jerarquía de dominancia-subordinación. Sin embargo, nunca se ha estudiado este comportamiento en un lapso de tiempo prolongado. En el presente estudio, por primera vez se mantuvieron díadas de machos de *G. omarorum* y de *A. reicherti* dentro de una pecera por 36 hs y por 96 hs respectivamente. Además se colocó dentro de la pecera un recurso relevante a la biología de cada especie; un refugio en la pecera de *G. omarorum* y dos hembras más un área de desove en la de *A. reicherti*. En *G. omarorum*, midiendo la permanencia dentro del refugio se cuantificó la dominancia a lo largo del tiempo. Se encontró que el individuo que se convirtió en dominante fue siempre el de mayor masa corporal y éste hizo un uso exclusivo del refugio. Mientras que en *A. reicherti*, no siempre fue el individuo de mayor masa corporal el que se convirtió en dominante. Sin embargo una vez establecida la dominancia, fue el individuo dominante el que hizo un mayor uso del área de desove, obtuvo un mayor índice de apariencia y realizó un mayor número de comportamientos de dominante (ataques y apareamientos). El hecho de que el individuo dominante realice un uso exclusivo de refugio en *G. omarorum* y un mayor uso en *A. reicherti* además de atacar al subordinado, evidencia un comportamiento territorial en ambas especies, algo que no había sido estudiado hasta el momento en ninguna de las dos especies en condiciones de laboratorio. Por otro lado, una vez transcurrido el tiempo mencionado anteriormente, se extrajo el área pre-óptica hipotalámica a 8 machos de *G. omarorum* (4 dominantes y 4 subordinados) y el cerebro entero a 4 machos de *A. reicherti* (2 dominantes y 2 subordinados). A partir de estos tejidos nerviosos se secuenciará el transcriptoma para poder comparar la expresión génica entre dominantes y subordinados en ambas especies.

MARCO TEORICO

Desde la mitad del siglo XIX, los trabajos de Galton inauguran las primeras investigaciones cuyo fin era estudiar el comportamiento desde un punto de vista evolutivo (Greenspan, 2008). Hoy en día existe un gran interés en comprender la relación entre genes y comportamiento, más específicamente la relación entre los genes, el sistema nervioso y el comportamiento (Heston y White, 2015, por ejemplo). Sin embargo los abordajes han cambiado mucho debido a los avances en herramientas moleculares como la secuenciación de exomas, uso de ARN de interferencia, técnicas opto-genéticas, entre muchas otras (Teles et al., 2016; Haesler et al., 2007; Afraz et al., 2015). Esto ha permitido que fuese posible realizar análisis rigurosos de varios comportamientos en diversas especies, no sólo en especies de laboratorio sino también en especies no tradicionales, como por ejemplo en hormigas (Lucas y Sokolowski, 2009). En los últimos años ha habido un creciente interés en el estudio de la transcriptómica comparada, con el fin de evaluar si existen mecanismos conservados en áreas del cerebro relacionados al comportamiento social (Rittschof et al., 2014; Kar, 2016). En esta técnica, se compara la transcripción que tiene lugar debido a un escenario determinado entre especies, entre individuos de la misma especie o entre tejidos de un mismo individuo. Por lo que la transcriptómica comparada es una herramienta la cual permite estudiar la relación genes-cerebro-comportamiento, al comparar diferencias de expresión en el cerebro debidas a la expresión de un comportamiento diferente. Rittschof et al. (2014), estudiaron los mecanismos moleculares relacionados a la invasión del territorio en *Mus musculus*, *Gasterosteus aculeatus* y *Apis mellifera*. Estos autores encontraron cambios en la expresión de varios factores de transcripción homólogos para las 3 especies, de lo que concluyen que existen mecanismos moleculares conservados en especies alejadas filogenéticamente con respecto a este comportamiento social. Por otra parte, Kar (2016) comparó la expresión génica en varias especies de vertebrados monógamas y no-monógamas, encontrando una transcripción de genes homólogos conservada en diversas especies para cada fenotipo.

El encuentro agonístico, donde individuos de una misma especie compiten por un recurso limitante (territorio, pareja, alimento, refugio) se resuelve cuando uno de los individuos obtiene el recurso, convirtiéndose en dominante, mientras el otro lo pierde convirtiéndose así en subordinado (King, 1973). El encuentro agonístico consta de tres fases: (1) evaluación (2) conflicto y (3) post-resolución. Si bien la disputa puede resolverse en la fase de evaluación, muchas veces escala a la fase de conflicto (Nelson, 2006). En esta fase, la capacidad de lucha y la agresividad son de gran importancia ya que definen quién se queda con el recurso (Moretz, 2005; Briffa et al., 2015). Esta competencia, genera cambios en la activación neural del cerebro de los dominantes y los subordinados en distintos grupos de vertebrados (Greenwood et al., 2008; Pan et al., 2010). Entender las diferencias en la expresión génica dentro del cerebro puede ser de gran importancia, ya que el dominante es quien se queda con el recurso lo cual le da una ventaja sobre su co-específico. Para que el establecimiento de la dominancia genere cambios en la expresión génica, es necesario evaluar los fenotipos dominante y subordinado consolidados, sin reversión y mantenidos por un período de tiempo suficientemente largo como para permitir la transcripción.

En este momento, está en marcha un proyecto internacional: "Conserved Transcriptome Activity Underlying Social Dominance"; cuyo fin es explorar la existencia de una base neurogenética conservada de la dominancia en vertebrados. Para esto, se pretende comparar dominantes y subordinados de varias especies pertenecientes a distintos grupos de vertebrados. En dicha comparación se tendrá en cuenta: el comportamiento agonístico que lleva al establecimiento de la dominancia, las hormonas relevantes al comportamiento y los genes que se expresan en el cerebro de cada uno, en particular los del área pre-óptica hipotalámica. Dicha área, está involucrada en la red de toma de decisiones sociales (Goodson y James, 2005; O'connell y Hofmann, 2011), donde se regularían diversos comportamientos sociales (ej: cuidado parental, agresión, comportamiento reproductivo) (Newman, 1999; Goodson y Kabelik, 2009). Además, se ha reportado que lesiones del área pre-óptica en ratas provocan una disminución de la agresión hacia co-específicos (Albert et al., 1986).

En este marco, el proyecto de investigación "La revolución estrogénica de la agresión" (ANII, Fondo Clemente Estable, Responsable Ana Silva, en ejecución), participa de este consorcio aportando dos modelos de teleósteos con un comportamiento agresivo distinto: (1) *Gymnotus omarorum*, un pez eléctrico que despliega una conducta agresiva territorial fuera del periodo reproductivo y en forma independiente de las hormonas sexuales circulantes (Batista et al., 2012; Jalabert et al., 2015) y (2) *Austrolebia reicherti*, un pez anual cuya historia de vida impone una corta etapa de vida adulta en constante reproducción, marcada por reiterados encuentros agonísticos por el acceso a sitios de desove (García et al., 2008). Si bien este proyecto apunta a un estudio transcriptómico para dilucidar las diferencias de expresión génica entre dominantes y subordinados en dos especies distintas, es importante realizar un análisis exhaustivo del comportamiento de establecimiento y mantenimiento de la dominancia, con el fin de poder extraer conclusiones más precisas sobre la relación de ciertos genes a cada estatus y poder así comparar entre ambas especies y con futuras investigaciones. Estas especies permiten comparar el estatus de dominancia en dos escenarios hormonales diferentes, y establecen un buen punto de partida para explorar las similitudes y diferencias entre el perfil transcriptómico de machos dominantes y subordinados en peces teleósteos.

ANTECEDENTES DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES

Gymnotus omarorum

En 1970, Black-Cleworth describió el comportamiento agonístico y eléctrico para *Gymnotus carapo*, lo que constituye un estudio pionero y referente del abordaje comportamental en peces eléctricos. Más recientemente, en la especie autóctona *Gymnotus omarorum* (descrita por Richer-de-Forges et al., 2009) se ha caracterizado detalladamente el comportamiento agonístico en diadas intra e intersexuales fuera de la temporada reproductiva (Batista et al., 2012; Quintana et al., 2016). En estas condiciones, el resultado del encuentro depende mayoritariamente de la diferencia en masa corporal entre ambos individuos y no del sexo (Batista et al., 2012) ni de las hormonas sexuales gonadales (Jalabert et al., 2015). Una vez resuelto el conflicto, el individuo subordinado promulga su estatus de diversas maneras, primero interrumpiendo su descarga eléctrica (apagados), luego dejando de atacar y huyendo y por último emitiendo una descarga eléctrica de alta frecuencia llamada chirp; además de aumentar el número y la duración de los apagados (Quintana et al., 2016). Otra característica de la

resolución del conflicto es la disminución en la frecuencia de descarga eléctrica del subordinado formándose así una jerarquía eléctrica entre el dominante y el subordinado (Silva et al., 2013). La latencia a la cual el subordinado emite las señales de sumisión se correlaciona con cuán agresivo es el encuentro (Quintana et al., 2016). De todas formas, todos estos experimentos fueron hechos en peceras de dimensiones pequeñas sin ningún recurso a disputarse (más allá del espacio físico) donde el subordinado no podía alejarse del dominante, por lo que resta estudiar las características del encuentro agonístico en una pecera de un tamaño mayor y con la presencia de un recurso limitante. Además, en dichas investigaciones no se estudió el comportamiento entre ambos individuos una vez pasados los 10 minutos de post-resolución dado que se retiraban a los peces con el fin de evitar que el dominante hiriese gravemente al subordinado. Por lo que el estudio en una pecera grande permite estudiar un comportamiento hasta ahora ignorado por la comunidad, además de permitir que los individuos se mantengan en estas condiciones un tiempo suficiente para permitir la expresión génica.

Austrolebias reicherti

La especie *Austrolebias reicherti*, fue descrita por primera vez por Loureiro y García (2004). Desde esa fecha ha sido utilizada en diversas investigaciones y para estudiar distintos comportamientos. Fabra (2011) describió el encuentro agonístico de esta especie, describiendo no solo las pautas comportamentales, sino también las características de la dominancia. Entre estas características se reportó que los machos dominantes permanecían más tiempo sobre una zona enriquecida con sustrato (área donde se produce el apareamiento, desove y fertilización de los óvulos en esta especie), infiriendo la existencia de comportamiento territorial. De todas formas, para poder concluir que *A. reicherti* es una especie territorial es necesario realizar experimentos donde los machos permanezcan por más tiempo dentro de la pecera para poder evaluar su relación con el territorio (en Fabra, 2011, los peces se retiraron pasados 10 minutos de post-resolución). Además se ha reportado que se genera una diferencia en la apariencia entre los machos subordinados y los dominantes, donde los primeros pierden coloración y retraen sus aletas (Fabra, 2011; Passos, 2013a) mientras que los dominantes intensifican su coloración y despliegan las aletas impares. También hay diferencias en los comportamientos, donde los dominantes realizan mayor cantidad de despliegues laterales y de acercamientos, mientras que los subordinados realizan más huidas (Fabra, 2011). Otra característica importante del encuentro agonístico en *A. reicherti*, es que el tamaño corporal es el mejor atributo para predecir el resultado de la contienda, donde el individuo más grande es generalmente el dominante (Fabra, 2011). Además, machos de mayor tamaño son preferidos por las hembras sin importar su desempeño durante el conflicto, aunque es difícil separar estas dos variables, ya que los machos más grandes son los que generalmente ganan las contiendas (Passos et al., 2013b).

OBJETIVOS

Objetivo General

- Contribuir al estudio de las bases genéticas del establecimiento de la dominancia en vertebrados.

Objetivos Específicos

- Ajustar un protocolo experimental que posibilite evaluar el establecimiento de una dominancia consolidada en *Gymnotus omarorum*.
- Ajustar un protocolo experimental que posibilite evaluar el establecimiento de una dominancia consolidada en *Austrolebias reicherti*.
- Caracterizar los encuentros agonísticos y la dominancia consolidada en ambas especies.
- Obtener muestras del área pre-óptica en dominantes y subordinados en *G. omarorum* para posterior secuenciación transcriptómica.
- Obtener el cerebro entero en dominantes y subordinados en *A. reicherti* para posterior secuenciación transcriptómica.¹

METODOS

Gymnotus omarorum

Colecta y alojamiento

Se colectaron peces en la Laguna del Sauce, Maldonado, empleando un detector eléctrico compuesto por dos electrodos de registro y un parlante. La pesca se realizó con un permiso de colecta emitido por la DINARA, MGAP, (resolución Nº 065/2004). Los peces obtenidos fueron alojados en condiciones semi-naturales, en piscinas externas de 500L con fotoperiodo natural, temperatura ambiente y agua de conductividad controlada en el Dpto. de Neurofisiología, IIBCE. En cada piscina se colocaron no más de 12 peces alojados individualmente. El alojamiento individual, anterior a la interacción evita efectos de experiencia previa (Hsu, 2005). Los peces fueron alimentados *ad libitum* con *Tubifex tubifex*.

Sexado

G. omarorum no presenta dimorfismo sexual externo ni eléctrico (Richer-de-Forges et al., 2009), por lo que la determinación del sexo se realizó mediante inspección gonadal. Primero, cada pez fue anestesiado por inmersión en una solución anestésica (2-fenoxietanol (0,00075 mg/ml)) por 3-5 minutos. Luego, se pasó a un dispositivo por el que se mantuvo la anestesia por perfusión branquial durante toda la duración de la cirugía. Después, se realizó una pequeña incisión en la línea media lateral a la altura del inicio de la aleta anal por donde se llevó a cabo la inspección gonadal. Por último, se suturó la herida. Una vez finalizada la intervención, por medio de ventilación sin anestesia se dejó recuperar al pez hasta que retomase su ritmo ventilatorio independiente. A partir de ese momento el pez fue colocado en una pecera de recuperación, donde se mantuvo bajo tratamiento antibiótico. Dicho tratamiento consistió en la administración de ampicilina (0.0125%) en el agua y de nitrato de plata

¹ A diferencia de *G. omarorum*, no se cuenta con un transcriptoma de referencia. Por lo que se va a extraer el cerebro entero para generar uno.

(solución al 1%) por vía tópica. De esta manera permanecieron hasta su recuperación total de la cirugía. Se consideró que un individuo está completamente recuperado cuando las heridas cicatrizaron. Luego de la recuperación, los peces retornaron a las piscinas externas. Los individuos permanecieron en recuperación durante un mes antes del día de experimentación.

Diseño experimental

Una vez recuperados se formaron díadas teniendo en cuenta la diferencia de masa corporal, (siguiendo el resultado de Batista et al., 2012, donde la diferencia en la masa de los individuos es el principal predictor del resultado de la contienda) generándose así un dominante esperado (D_e) y un subordinado esperado (S_e). Los peces fueron luego colocados en peceras (largo:110cm; ancho:80cm; altura:25cm) con condiciones de conductividad ($\leq 200 \mu\text{S}/\text{cm}$), fotoperiodo (L/O 10:14 hs) y temperatura (22-24 °C). Cada pez se ubicó en las esquinas opuestas de la pecera con un refugio colocado cercano al centro de la misma (figura 1). Los peces se aclimataron 6hs 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 y fueron mantenidos 36hs dentro de ésta. Durante estas 36hs se grabó en video la primera hora de interacción y en las restantes 35hs se grabaron 2 minutos cada media hora, lo mismo se hizo con el registro eléctrico. El registro de la interacción se realizó con iluminación infrarroja, donde los despliegues locomotores fueron adquiridos por medio de 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 computadora donde se almacenaron los registros para su posterior análisis. Todos los experimentos realizados con *G. omarorum*, fueron aprobados por el comité de ética en el uso de animales del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, expediente 001/07/2008.

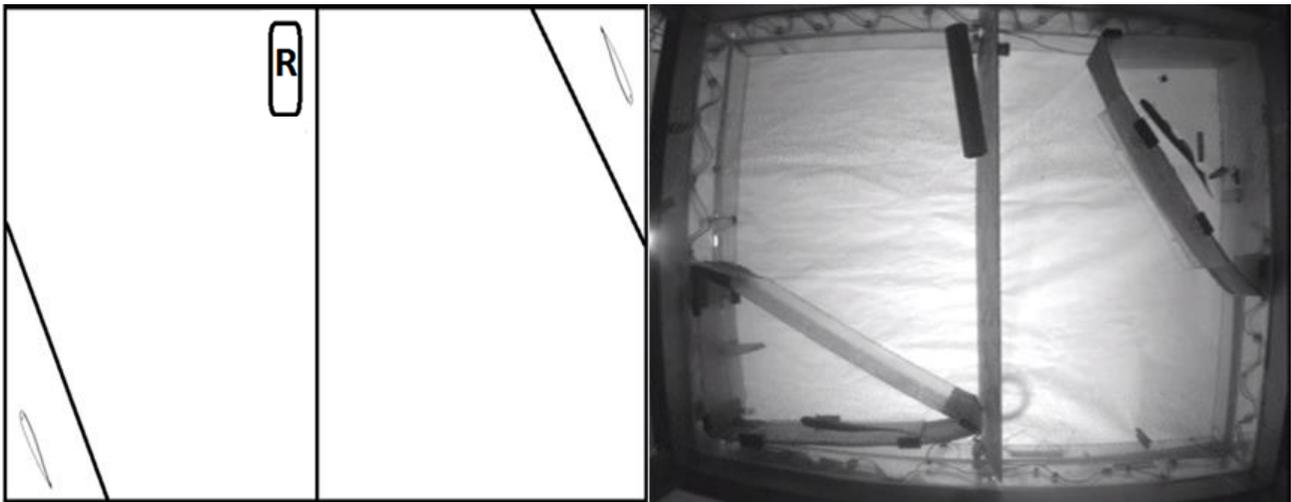


Figura 1. Diseño experimental en *Gymnotus omarorum*. Ambos peces son puestos en las esquinas opuestas de una pecera de (110 x 80 x 25) cm. R: refugio. Izquierda: esquema. Derecha: foto.

Al igual que en Batista et al., 2012 se definió como resuelto el conflicto cuando uno de los peces realizó 3 huidas seguidas sin ataques entre medio, a éste se le consideró como subordinado. La fase de post-resolución se definió como los siguientes 10 minutos después de resultado el conflicto y se definió la fase postpost-resolución al tiempo desde que termina la fase de post-resolución hasta el final del experimento. Con el fin de evitar secuenciar el cerebro de individuos cuyo comportamiento fuese atípico se tuvo en cuenta: el resultado esperado del conflicto (que el dominante fuese el individuo más grande) y el tiempo de resolución del conflicto (no mayor a 25 minutos). Por otro lado, para constatar que dicha jerarquía se mantuvo en el tiempo se analizaron los videos de 2 minutos y se calculó un índice de jerarquía. Para esto se tuvo en cuenta la posición de cada pez con respecto al refugio, donde se otorgó un valor de 5 puntos a estar dentro del refugio, 3 a estar en las cercanías y 1 a estar lejos del refugio (figura 2). Se tomó el valor máximo dentro de los dos minutos para cada pez, se sumaron todos los valores y posteriormente se los dividió por el total de observaciones. Sólo fueron extraídos los cerebros de las diadas que cumplieron satisfactoriamente con todos los criterios mencionados anteriormente. Además se midió la presencia de señales eléctricas de sumisión (apagados y chirps) en el subordinado. Los apagados son el resultado del silenciamiento en la descarga eléctrica de unos de los dos individuos (el subordinado), mientras que los chirps son señales breves de alta frecuencia (Batista et al., 2012).

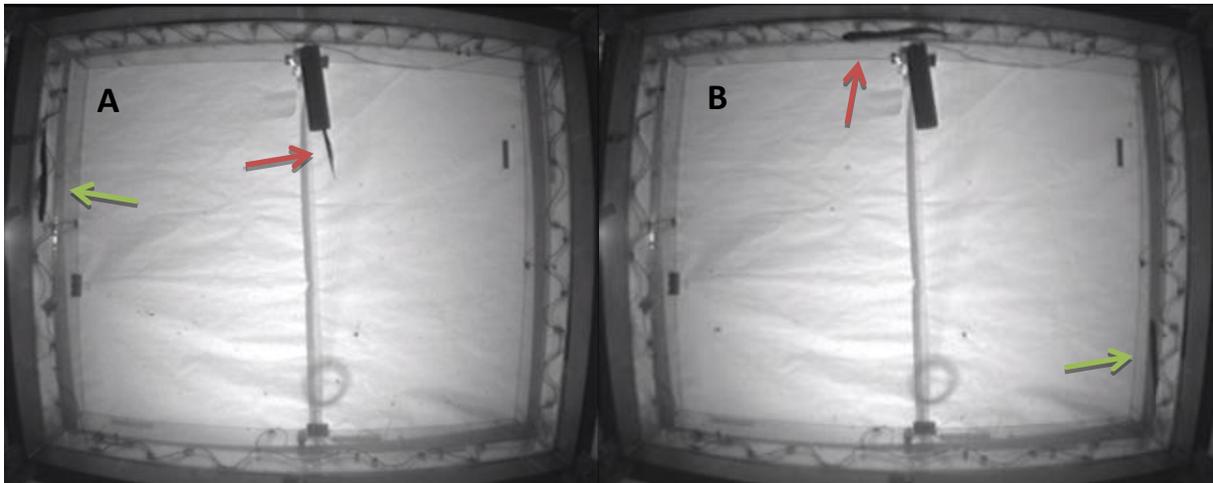


Figura 2. Posición de cada pez dentro de la pecera. Las flechas indican las 3 posibles posiciones que puede adoptar cada individuo. A: flecha roja: dentro del refugio. B: flecha roja: en las cercanías del refugio. La flecha verde en A y en B: lejos del refugio. Valores de cada posición: dentro del refugio 5 puntos, en las cercanías 3 puntos y lejos 1 punto.

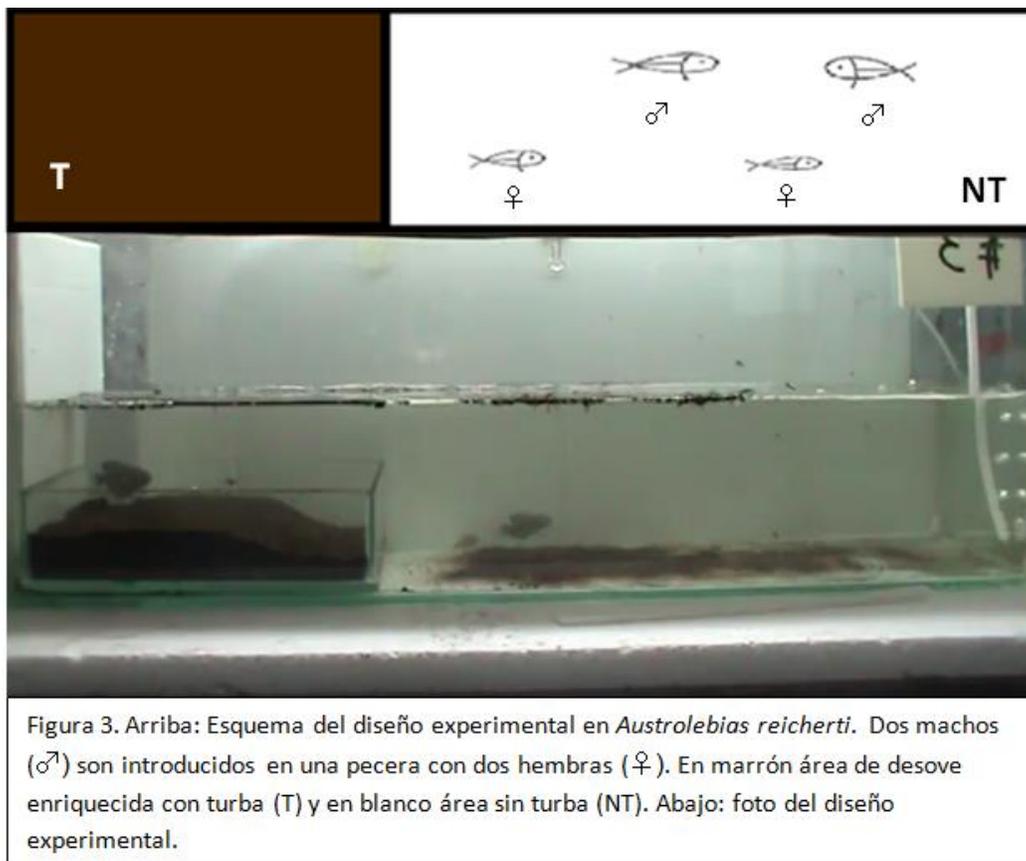
Austrolebias reicherti

Colecta y alojamiento

Se colectaron peces en charcos anuales en el departamento de Treinta y Tres. Los peces obtenidos fueron alojados en condiciones semi-naturales, con fotoperiodo natural, temperatura ambiente y agua baja en iones en la Facultad de Ciencias, UdelaR. Los machos fueron colocados en peceras individuales (largo:20cm; ancho:9; altura:15cm) y las hembras en peceras comunales. Se mantuvieron a los peces en estas condiciones durante 70 días previos a la experimentación. Al igual que en *G. omarorum*, el alojamiento individual de los machos evita efectos de experiencia previa (Hsu, 2005). Los peces fueron alimentados ad libitum con *Tubifex tubifex*.

Diseño experimental

Una vez transcurrido los 70 días de aislamiento se pusieron dos machos y dos hembras dentro de una pecera de dimensiones (largo:60cm; ancho:18,5cm; altura:20cm). En el interior de la pecera contra un extremo, se colocó un recipiente de dimensiones (largo:20cm; ancho:18cm; altura:5cm), al cual se le completaron 3/4 partes de su volumen total con turba; quedando la pecera dividida en dos estados: área con turba (T) y área sin turba (NT) (figura 3).



Se agregó un área enriquecida en turba a modo de recurso, ya que en *A. reicherti* los machos y las hembras se aparean sobre el sustrato (turba en este caso) donde se entierran y depositan los gametos (García et al., 2008). Primero se colocaron las hembras, las cuales se dejaron aclimatar durante 6hs. Luego fueron colocados los machos teniendo en cuenta la diferencia en tamaño entre ambos con el fin de evitar una contienda pareja donde la dominancia se revierta reiteradas veces. Se mantuvieron a los peces en estas condiciones durante 4 días. Todos los experimentos realizados con *A. reicherti*, fueron aprobados por el comité de ética en el uso de animales de la facultad de ciencias, expediente 240011-002308-14.

Una vez introducidos los machos, se registró con una cámara de video durante 20 minutos para así poder analizar posteriormente la contienda inicial. Se consideró que 20 minutos era un tiempo suficiente para que se resolviesen las contiendas (Passos et al., 2013b). Al igual que en Passos et al. (2013b) se consideró resuelto el conflicto (establecimiento de una jerarquía) cuando uno de los machos mostró sumisión (pérdida de color y retraimiento de las aletas) (figura 4) y no exhibió ningún comportamiento agresivo pasados 5 minutos de su subordinación.

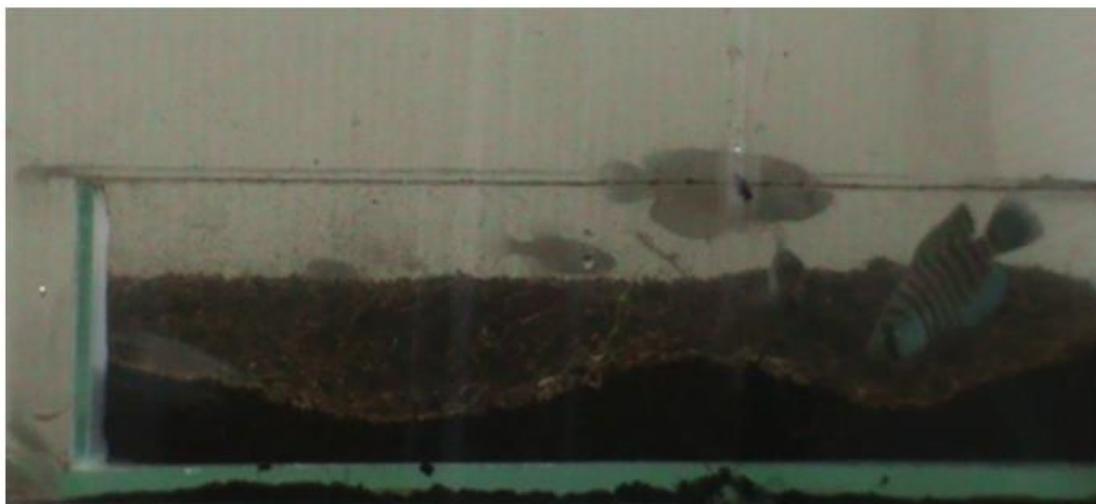


Figura 4. Comparación de la apariencia de dos machos con distinta jerarquía. A la izquierda por detrás el macho subordinado, coloración pálida y aletas retraídas. A la derecha macho dominante, con mayor color y aletas desplegadas.

Por otro lado, durante los 4 días de experimentación se realizó un muestreo instantáneo cada 1 hora (entre las 8:00 y las 20:00 hs) en el cual se registraron 3 parámetros de cada uno de los machos: (1) apariencia individual en base a la intensidad de la coloración y al grado de despliegue de las aletas, (2) posición dentro de la pecera y (3) comportamiento. Se definió al individuo dominante como aquel con: (1) mayor coloración y despliegues de las aletas, (2) mayor frecuencia dentro del área de desove y (3) presencia de una mayor frecuencia de las categorías ataque y apareamiento (Fabra, 2011). Para estimar la apariencia se consideró un índice que combina en base a una variable ordinal la intensidad del color (entre 1 y 3) y el grado de despliegue de las aletas (entre 1 y 3). Los valores de cada pez en cada punto de registro se sumaron generando un valor único de apariencia (Passos et al., 2013b) que luego se

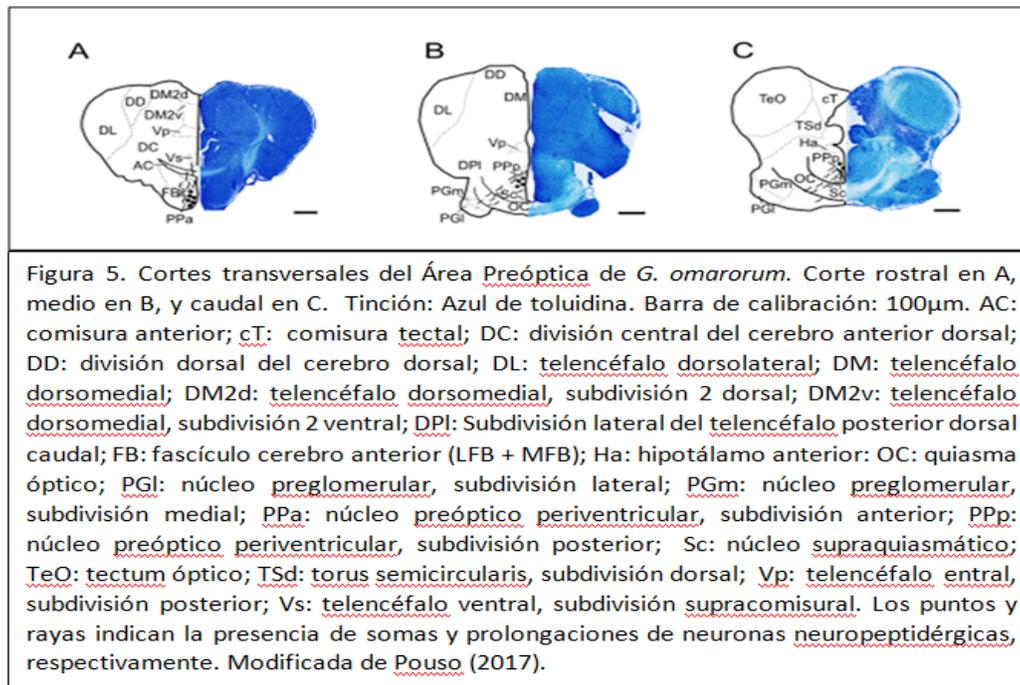
promedió teniendo en cuenta todos los valores durante los 4 días. De lo anterior se deduce que el valor máximo de apariencia que puede tener un individuo es 6 y el mínimo 2. Con respecto a la posición, se registró la frecuencia dentro y fuera del área de desove para cada pez a lo largo de los 4 días. Por último, se hizo una frecuencia para cada comportamiento. Sólo se le extrajo el cerebro a aquellas días donde fue posible definir un claro dominante y un claro subordinado.

Cerebros

Gymnotus omarorum

Se obtuvo el área pre-óptica de los 8 individuos seleccionados (4 dominantes y 4 subordinados). En primer lugar el pez subordinado fue retirado de la pecera de experimentación y eutanizado por sumersión en una solución de fenoxietanol concentrada al 0,00375 mg/ml. Luego se extrajo el cerebro en condiciones asépticas y sobre hielo. Inmediatamente después el cerebro extraído fue trasladado al crióstato a -30°C. Una vez que el cerebro del subordinado estaba dentro del crióstato, se realizó el mismo proceso para el dominante. Se realizó primero en el individuo subordinado con el fin de evitar un cambio en la jerarquía, debido a que si se retiraba primero al dominante el subordinado podía adueñarse del recurso antes disputado, por falta de un rival.

El tiempo entre la eutanización del animal hasta la llegada al crióstato siempre fue menor de 12 minutos ($9,0 \pm 0,5$) para evitar la degradación del ARN. Dentro del crióstato, el cerebro fue cortado en sentido rostro-caudal desde el telencéfalo en rodajas transversales de 50 μ m de espesor. Las secciones se observaron mediante microscopio óptico para identificar el área pre-óptica (figura 5). Se usó la comisura anterior para identificar el borde rostral del área preóptica y el quiasma óptico para identificar el borde caudal. Una vez identificada la comisura anterior se cortaron 4 secciones de 250 μ m que fueron colocadas en ARN-later para evitar la degradación de ARN. Una vez cortadas estas 4 secciones se verificó la presencia del quiasma óptico. Posteriormente, se cortó una sección extra de 250 μ m y fue pesada con el fin de calcular la cantidad de tejido extraído ($11,7 \pm 0,9$) μ g. Estas muestras fueron posteriormente enviadas a secuenciar al Servicio de Secuenciación (Genomic Sequencing and Analysis Facility, GSAF) de la Universidad de Texas en Austin, USA.



Austrolebias reicherti

En esta especie se extrajo el cerebro entero de dos parejas de individuos. Se decidió no extraer el área pre-óptica ya que en *A. reicherti* no se cuenta con un transcriptoma de referencia, por lo que estos cerebros se usarán para construir uno. El hecho de que se utilicen subordinados y dominantes para construir el transcriptoma de referencia permite además vislumbrar las diferencias de expresión a nivel cerebral entre dominantes y subordinados. Al igual que en *G. omarorum*, se retiró primero al individuo subordinado y fue eutanasiado por inmersión en una solución de fenoxietanol concentrada al 0,00375 mg/ml. Se extirpó luego el cerebro, que fue colocado dentro de un tubo eppendorf con ARN-later. Estos cerebros fueron posteriormente enviados a secuenciar al Servicio de Secuenciación (Genomic Sequencing and Analysis Facility, GSAF) de la Universidad de Texas en Austin, USA.

RESULTADOS

Gymnotus omarorum

Se formaron 4 díadas teniendo en cuenta la diferencia de masa corporal entre ambos individuos, dicha diferencia no fue mayor de 25% y no fue menor de 13% (tabla 1).

Tabla 1. Masa corporal, diferencia de masa corporal entre ambos individuos (Difm), tiempo de eutanización en fenoxietanol, tiempo de extracción del cerebro, el índice gonadosomático y la masa de tejido extraído en *G. omarorum*. El índice gonadosomático se calculó de la siguiente forma: (masa gónada(g) x 100) / masa total(g).

Individuo	Masa (g)	Difm	Tiempo en fenoxietanol (s)	Tiempo de extracción del cerebro (s)	Masa de tejido extraído (μg)	Índice gonadosomático
D1	42,2	24,2%	360	360	13,2	0,16%
S1	32,0		180	360	13,2	0,16%
D2	32,4	14,8%	180	410	11,2	0,14%
S2	21,8		120	330	13,2	0,21%
D3	20,5	13,2%	120	450	13,2	0,22%
S3	17,8		120	390	9,9	0,19%
D4	26,5	22,6%	120	360	13,2	0,35%
S4	20,5		40	420	6,6	0,22%

Establecimiento de la dominancia

En las 4 díadas hubo encuentros agonísticos, de los cuales se formó una jerarquía estable. En todos los casos, dicha jerarquía fue la predicha donde el individuo de mayor masa corporal (D_e) fue el que se convirtió en dominante (tabla 2). En las 4 díadas el encuentro agonístico siguió las tres fases características: (1) una fase de evaluación corta (latencia primer ataque = $39,3s \pm 14,0s$) donde el D_e fue el primero en atacar en todos los casos, (2) una fase de conflicto con una duración corta ($267s \pm 78s$), donde ambos individuos mostraron un comportamiento agresivo (tasa de ataques de los $D_e = 0,043 \pm 0,005$ y tasa ataques de los $S_e = 0,013 \pm 0,003$) y (3) una fase de post-resolución donde disminuyeron los ataques y fue sólo el dominante quien los realizó (díada 1 = 0, díada 2 = 1, díada 3 = 1, díada 4 = 0) (tabla 2).

Tabla 2. Análisis de la contienda en *G. omarorum*. D_e = Dominante esperado (individuo de mayor masa corporal) S_e = Subordinado esperado.

Individuo	Efactor del primer ataque	Latencia primer ataque (s)	Tasa de ataques	Duración (s)	Ganador	Nº de ataques post-resolución
D_{e1}	D_e	14	0,05	220	D_e	0
S_{e1}			0,02			0
D_{e2}	D_e	62	0,05	108	D_e	1
S_{e2}			0,01			0
D_{e3}	D_e	16	0,03	482	D_e	1
S_{e3}			0,01			0
D_{e4}	D_e	65	0,04	259	D_e	0
S_{e4}			0,01			0

Mantenimiento de la dominancia en el tiempo

Se dejó a cada día interactuar dentro de la pecera por 36hs, en los cuales se midió el uso del recurso (refugio). En ninguna de las 4 días, el subordinado hizo uso del refugio (tabla 3). Además al cuantificar el uso del refugio (ya sea por estar dentro o en las cercanías, ver métodos), los dominantes obtuvieron un índice de jerarquía ≥ 1.9 y los subordinados ≤ 1.2 (tabla 3). Por otro lado, se midieron los ataques durante este periodo de tiempo; donde sólo se registraron ataques pasados los 10 minutos de post-resolución (fase llamada postpost-resolución) en la día 4 y todos fueron realizados por el individuo dominante (tabla 3).

Individuo	Nº de ataques postpost-resolución	Nº de uso del refugio	Índice de jerarquía
D1	0	16	2,5
S1	0	0	1,2
D2	0	38	3,6
S2	0	0	1,2
D3	0	1	1,9
S3	0	0	1,1
D4	5	46	4,0
S4	0	0	1,1

Con el fin de ejemplificar el mantenimiento de la dominancia, se analizó a la día 2 en el tiempo (figura 6). El subordinado mantuvo sus huidas a lo largo de los 3 días a pesar de que los ataques del dominante cesaron luego de la fase de conflicto. El dominante usó el refugio un 71% del tiempo total, un 64% de las horas de oscuridad y un 90% de las horas de luz (figura 6B).

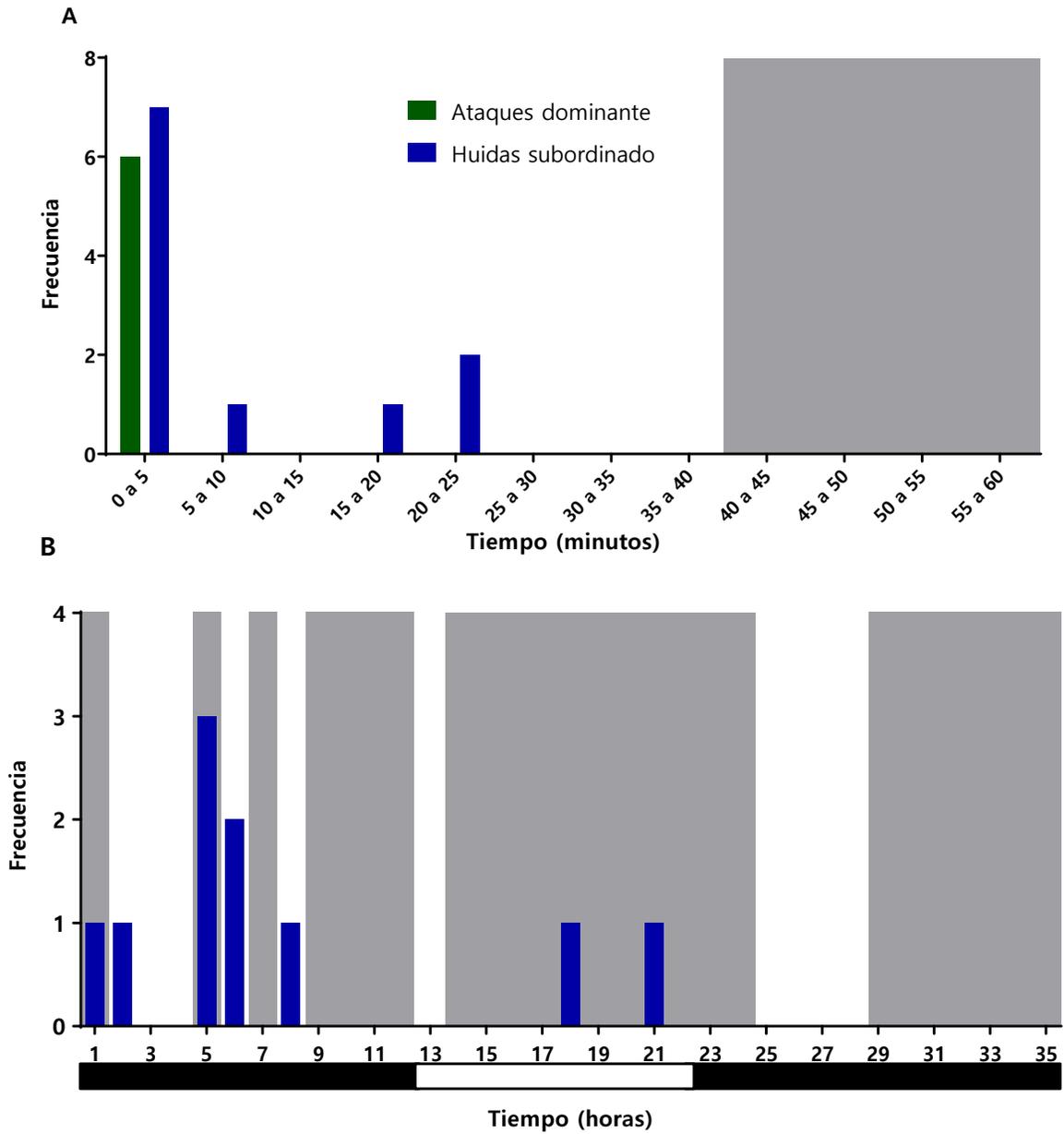


Figura 6. Análisis del encuentro agonístico de la diada 2 en el tiempo. En verde se muestra el número de ataques realizados por el dominante, mientras que en azul el número de huidas efectuadas por el subordinado. En gris, la presencia del dominante en el refugio de al menos una vez en el intervalo de tiempo analizado. A: primera hora del encuentro agonístico analizada en intervalos de 5 minutos. B: Sigüentes 35 horas del encuentro agonístico analizadas en intervalos de 1 hora. Las barras debajo de las abscisas indican el fotoperiodo, en negro: oscuridad y en blanco: luz.

Descarga eléctrica

Se midieron las señales eléctricas de sumisión (apagados y chirps). No se registró ninguna en la fase de conflicto para las cuatro díadas (tabla 4). En cambio, sí se registraron señales de sumisión eléctricas en la fase de post-resolución en la díada 4 (tabla 4).

Tabla 4. Análisis eléctrico en <i>G. omarorum</i> . La f post- resolución se midió en los siguientes 10 minutos una vez resuelto el conflicto.					
Individuo	f pre-conflicto (Hz)	f post-resolución (Hz)	Nº de apagados y chirps en conflicto	Nº de apagados en post-resolución	Nº de chirps en post-resolución
D1	16,02±0,61	19,34±0,05	0	0	0
S1	14,18±0,03	18,55±0,04	0	0	0
D2	16,74±0,12	18,94±0,06	0	0	0
S2	19,82±0,10	20,26±0,07	0	0	0
D3	17,80±0,18	22,45±0,21	0	0	0
S3	17,66±0,03	21,62±0,15	0	0	0
D4	19,46±0,05	23,96±0,24	0	0	0
S4	23,62±0,02	20,51±0,10	0	4	2

Extracción del área pre-óptica

Se logró extraer el cerebro en los 8 individuos exitosamente. Dicha extracción se realizó en menos de 8 minutos ($6,4 \pm 0,2$), luego de la eutanasia que tuvo un tiempo promedio de $2,6 \pm 0,6$ minutos (tabla 1). Posteriormente se logró identificar el área pre-óptica en todos los individuos y su extracción fue exitosa, extrayéndose en promedio $11,7 \pm 0,9$ μg de tejido (tabla 1). Por otro lado, el índice gonadosomático dio valores adecuados para el periodo no reproductivo que no se relacionaron con el estatus de cada pez; habiendo casos donde el índice es igual para ambos peces de la díada, otros donde es mayor para el dominante y otros donde es mayor para el subordinado (tabla 1).

Austrolebias reicherti

Se formaron 4 díadas teniendo en cuenta la diferencia de masa corporal entre ambos individuos, entre 17% y 40% (tabla 5).

Tabla 5. Análisis de los primeros 20 minutos del conflicto en <i>A. reicherti</i> . Difm = diferencia de masa corporal entre ambos individuos.						
Individuo	Masa corporal (g)	Difm	Latencia a la interacción (s)	N° de ataques	Duración del conflicto (s)	Ganador
D _e 1	1,64	18,0 %	70	No hubo ataques	-	-
S _e 1	1,34					
D _e 2	1,64	39,0%	480	No hubo ataques	449	S _e 2 en fase de evaluación
S _e 2	1,00					
D _e 3	1,66	30,7%	368	No hubo ataques	-	-
S _e 3	1,15					
D _e 4	1,47	17,0%	Sin interacción en primeros 20min	No hubo ataques	-	-
S _e 4	1,22					

Establecimiento y mantenimiento de la dominancia

Los encuentros agonísticos no se resolvieron en el lapso de tiempo esperado (20 minutos) en las díadas 1, 3, 4. Sin embargo el conflicto de la díada 2 si se resolvió en la fase de evaluación y fue el individuo de menor masa corporal (S_e2) quien se convirtió en dominante (tabla 5).

Durante los 4 días de experimentación, el índice de apariencia dentro de cada díada fue mayor para un D_e, dos S_e y en una díada no hubo claras diferencias (tabla 6). Con respecto a la posición dentro del área de desove, solo un D_e hizo un mayor uso de la misma y en las restantes díadas los S_e hicieron mayor uso de ésta (tabla 6). La frecuencia de ataques fue pareja tanto para los D_e como para los S_e en todas las díadas (tabla 7). La frecuencia de huidas, fue mayor para dos D_e, para un S_e y en la restante fue igual para ambos individuos (tabla 7). Con respecto a la frecuencia de apareamientos, 2 D_e y 2 S_e obtuvieron mayor frecuencia (tabla 7).

Extracción del cerebro

Se extrajo exitosamente el cerebro de 4 individuos, pertenecientes a las díadas 2 y 3. Dicha extracción se realizó en menos de 8 minutos (6,3 ± 0,4). El tiempo de eutanasia en fenoxietanol no fue tenido en cuenta ya que la muerte fue casi instantánea (tabla 8). Por otro lado, el índice gonadosomático no se relacionó con el estatus de cada pez, aunque si se relacionó con el tamaño del pez siendo los de mayor masa corporal los que presentaron una mayor índice gonadosomático (tabla 8).

Tabla 6. Índice de apariencia y frecuencia de posición. T = área enriquecida en turba (área de desove)
 NT = área sin turba. D_e = Dominante esperado. S_e = Subordinado esperado.

Individuo	Índice de apariencia	Frecuencia de posición	
		T	NT
D _e 1	4,9	0,12	0,88
S _e 1	4,6	0,85	0,15
D _e 2	3,6	0,10	0,90
S _e 2	5,8	0,83	0,17
D _e 3	5,3	0,83	0,17
S _e 3	3,7	0,07	0,93
D _e 4	3,7	0,10	0,90
S _e 4	5,3	0,95	0,05

Tabla 7. Comportamientos registrados en *A. reicherti*. Agresión: Dentro de agresión están los comportamientos de ataque, mordidas, topetazos y despliegues laterales.

Individuo	Agresión	Huidas	Cortejo o Enterramiento	Locomoción o reposo
D _e 1	13	1	3	19
S _e 1	18	1	2	20
D _e 2	9	8	0	20
S _e 2	12	0	9	16
D _e 3	13	0	5	12
S _e 3	9	7	0	20
D _e 4	15	2	0	20
S _e 4	14	0	6	18

Tabla 8. Tiempo de extracción del cerebro e índice gonadosomático en *A. reicherti*. El índice gonadosomático se calculó de la siguiente forma: (masa gónada(g) x 100) / masa total(g). Solo se muestran de las diadas a las que se les extrajo el cerebro.

Individuo	Tiempo de extracción del cerebro (s)	Índice gonadosomático
D _e 2	370	2,06%
S _e 2	400	1,25%
D _e 3	420	1,36%
S _e 3	320	0,50%

DISCUSIÓN

Austrolebias reicherti

Establecimiento y mantenimiento de la dominancia

Los encuentros agonísticos no se resolvieron en el lapso de tiempo esperado (20 minutos) en las días 1, 3, 4. Sin embargo el conflicto de la día 2 si se resolvió en este tiempo, en la fase de evaluación aunque fue el individuo de menor masa corporal (S_e2) quien se convirtió en dominante (tabla 5). Esto difiere de lo reportado por Fabra (2011) y Passos (2013a²) y donde la mayoría de los conflictos se resolvieron en menos de 6 minutos. De todas formas, al analizar lo ocurrido durante los 4 días de experimentación se definió una jerarquía en las distintas días.

Passos (2013a), caracteriza al macho subordinado por su apariencia (desaparición de color y plegado de las aletas) y por su posición dentro de la pecera (alejado del dominante y en la periferia), mientras que el dominante mantiene las aletas desplegadas y una coloración marcada, y comportamientos agresivos hacia el individuo subordinado. Respecto al índice de apariencia, es clara la dominancia en las días 2,3,4; donde los dominantes fueron: S_e2 , D_e3 y S_e4 (tabla 6). Con respecto a la posición dentro del área de desove, en las 4 días podría definirse un dominante y un subordinado; donde los dominantes fueron: S_e1 , S_e2 , D_e3 , S_e4 (tabla 6). En cuanto a lo comportamental, se definió como comportamiento de dominante: atacar y aparearse, mientras que las huidas fueron consideradas de subordinado (Fabra, 2011). La frecuencia de ataques fue pareja tanto para los subordinados como para los dominantes en todas las días (tabla 7). Esto puede deberse a que cuando un individuo ataca el otro puede responder con ataques o huidas. Por lo que es más relevante la frecuencia de huidas que de ataques para definir la dominancia. Analizando la frecuencia de huidas, en 3 días se define un dominante; siendo: S_e2 , D_e3 y S_e4 . Lo mismo ocurre con la frecuencia de apareamientos, donde se convirtieron en dominante los mismos machos que al considerar las huidas (tabla 7). Al tener en cuenta estos parámetros, se puede definir como establecida la dominancia en 3 de las 4 días. En la día 1, no es posible definir de manera clara a un dominante y a un subordinado. En la día 2 y 4, los individuos de menor masa corporal (S_e2 y S_e4) fueron los dominantes (mayor índice de apariencia, mayor tiempo en área de desove y más comportamientos de dominante). Por otro lado, en la día 3 el dominante fue el individuo de mayor masa corporal (D_e3). En la días 2 y 4, no hay huidas por parte de los S_e ni apareamientos por parte de los D_e . Lo mismo ocurre en la día 3, salvo que es el D_e el individuo que no huye y el que no se aparea es el S_e por lo que se puede concluir que la dominancia se mantuvo sin reversión durante los 4 días.

² Los resultados obtenidos por Passos en su tesis de doctorado respecto a los encuentros agonísticos son en *Austrolebias charrua*. De todas formas pueden servir a modo de comparación ya que estas dos especies están muy emparentadas habiendo incluso hibridación entre ellas (Passos, 2013a).

Efecto del aislamiento en el comportamiento agresivo

El hecho de que las peleas hayan sido de poca intensidad, en ninguna se registraron ataques en los primeros 20 minutos y que además se necesito un largo periodo de tiempo para que ambos peces interaccionasen (tabla 5), puede deberse al largo tiempo de aislamiento en el que fueron alojados los machos (70 días). En Passos, 2013a, donde los machos fueron mantenidos entre 10 y 20 días en aislamiento, la latencia a la interacción no superó el minuto y además todos los conflictos se resolvieron (la mayoría de forma esperada, el más grande fue dominante). Otra investigación en una especie diferente de teleósteos (Brandão et al., 2015), encuentra que dejar a individuos aislados durante 10 días influye en el comportamiento de los peces, principalmente en la capacidad de aprendizaje. Por lo que los 70 días de aislamiento pueden haber afectado el desempeño de los machos en las contiendas. Dado que en la presente investigación los machos fueron mantenidos en aislamiento para borrar la experiencia previa, una alternativa para futuros experimentos en comportamiento agresivo, podría ser mantener a los machos aislados de otros machos en peceras con hembras y/o juveniles. De todas formas, sería interesante investigar como el aislamiento prolongado influye en el comportamiento agresivo y en las capacidades cognitivas en *A. reicherti*.

Preferencia de las hembras

En el género *Austrolebias*, la selección sexual ejercida por las hembras al elegir los machos ya ha sido estudiada usando un diseño experimental diferente (Passos et al., 2013b). En dicho experimento se evaluó la preferencia de las hembras frente a machos antes y después de enfrentarse. El resultado obtenido fue que las hembras eligieron al macho más grande más allá de su desempeño durante el conflicto. De todas formas, no se logró demostrar que las hembras ignoren el resultado del conflicto ya que los machos de mayor tamaño son los que generalmente se convierten en dominantes (Passos et al., 2013b). En el presente estudio, aunque hay variedad en cuanto al resultado de las contiendas (una díada sin resolver, una díada donde el más grande fue el dominante y dos díadas donde los individuos más chicos fueron los dominantes), se observa es que las hembras se aparearon más veces con el individuo dominante independientemente de su masa corporal (tabla 7). Esto podría deberse a que el macho dominante es quien adquiere el territorio de mayor valor, por lo que no es posible diferenciar si las hembras seleccionan en base a la posesión de territorio o en base al estatus de dominante. Sin embargo, al analizar la díada 1 (donde no hay diferencias en el índice de apariencia) el número de apareamientos es similar en ambos machos, por más que un individuo permanezca en el área enriquecida en turba un mayor tiempo, lo cual apuntaría a que las hembras elijen en base al estatus y no a la posesión del territorio. De todas formas, para poder discernir qué carácter elijen las hembras es necesario realizar un mayor número de experimentos, además de controlar la elección inicial de las hembras frente a ambos individuos previo al encuentro agonístico. Passos et al. (2013c), encuentra que las hembras prefieren agua donde previamente un macho cortejó, frente a agua control. Por otro lado, Barata et al. (2007), reportan que en la especie *Oreochromis mossambicus* los machos dominantes aumentan la frecuencia a la cual orinan, mientras que los subordinados la disminuyen. Con estos antecedentes, sería interesante realizar un ensayo de preferencia en hembras con agua de macho dominante y agua de macho subordinado, para evaluar si además de las señales visuales, los machos manifiestan su estatus con señales químicas y si las hembras son capaces de detectarlas.

Gymnotus omarorum

Establecimiento de la dominancia

Al igual que en experimentos previos donde se realizaron los encuentros agonísticos en una pecera de dimensiones menores a la utilizada en este estudio (Batista et al., 2012; Zubizarreta et al., 2015; Jalabert et al., 2015; Quintana et al., 2016), los individuos que se convierten en dominantes fueron los de mayor masa corporal y los que presentaron un mayor nivel de agresividad (tabla 2). Como era de esperar por estar fuera de la temporada reproductiva, el índice gonadosomático no se relacionó con el orden de jerarquía (tabla 1). También la latencia al primer ataque fue similar con respecto a investigaciones previas, lo que indica una motivación equivalente a pelear más allá del tamaño de la pecera. Sin embargo, las peleas fueron menos intensas, la tasa de ataques fue menor tanto para el dominante como para el subordinado y la duración de la contienda fue más larga en la pecera utilizada en este estudio si se compara con los reportes previos. De igual modo, al definirse como resuelta la contienda una vez que un individuo se retira 3 veces consecutivas, la duración puede que sea mayor con respecto a investigaciones previas, por el simple hecho de que le lleva más tiempo al dominante volver a encontrar al subordinado luego de cada huida. Esto también influye en el valor de la tasa de ataques, ya que el número de ataques va a ser dividido por un tiempo mayor. Para poder realizar una mejor comparación entre la tasa de ataques obtenidas en investigaciones previas, se calculó una nueva tasa de ataques para dominantes y subordinados usando el tiempo de resolución promedio (113 segundos) reportado por Jalabert et al. (2015). Las nuevas tasas de ataques son más altas que las anteriores ($D = 0,09 \pm 0,02$ vs $S = 0,03 \pm 0,01$) y su valor se acerca al encontrado en Jalabert et al. (2015) ($DJ = 0,12 \pm 0,08$ vs $SJ = 0,06 \pm 0,04$). La tasa de ataques para dominantes es casi igual en ambas peceras una vez que se tiene en cuenta la diferencia en el tiempo de resolución. Por otra parte, la tasa de ataques para los subordinados es más baja en los encuentros realizados en pecera grande. Esto puede deberse a que en una pecera chica el individuo subordinado está más confinado por lo que se vería obligado a devolver el ataque ya que no puede huir de las cercanías del dominante.

Señales eléctricas de sumisión

En Quintana et al. (2016), concluyen que como el dominante en la pecera chica sigue atacando a un subordinado que no puede huir, el subordinado hace uso de señales inequívocas de sumisión (apagados y chirps). Se considera que las distintas señales de sumisión se realizan en un orden gradual, primero (durante la fase de conflicto) se emite el primer apagado, segundo el subordinado huye y tercero emite una mayor frecuencia de apagados de mayor duración, emite chirps y disminuye la frecuencia de la descarga eléctrica (Quintana et al., 2016). Las señales de apagado se interpretan como un mecanismo del subordinado para esconderse del dominante (Zubizarreta et al., 2015), mientras que los chirps se interpretan como señales inequívocas de sumisión (Silva et al., 2013). En Zubizarreta et al., 2015, se encontró que las señales de chirps desaparecen una vez que el dominante es tratado con un agonista de la serotonina (inhibidor de la agresión), de lo que se concluye que los subordinados ajustan su emisión de señales de sumisión dependiendo de los niveles de agresión del dominante. En este estudio, por más que los niveles de agresión en la fase de conflicto por parte del dominante sean parecidos a los de investigaciones previas (Jalabert et al., 2015), ésta cesa una vez resuelto el conflicto.

En este sentido, estos resultados apoyan la interpretación del ajuste de las señales de subordinación al comportamiento del dominante, ya que las señales de sumisión se reducen considerablemente e incluso en algunas díadas desaparecen (tabla 4).

Otra forma de señalar sumisión es por medio de la formación de una jerarquía eléctrica, donde una vez resuelto el conflicto el dominante mantiene su frecuencia de descarga eléctrica basal y el subordinado la disminuye (Silva et al., 2013). En este estudio, sólo se encontró la formación de una jerarquía eléctrica en la díada 4, mientras en las demás todos los individuos (tanto dominantes como subordinados) aumentaron su frecuencia de descarga eléctrica (tabla 4). Silva et al. (2013), argumentan que la disminución en la descarga eléctrica le sería ventajosa al subordinado para promulgar su estatus y así evitar sufrir lesiones e invertir energía en un conflicto ya resuelto. Sin embargo, dicho experimento fue realizado en una pecera chica, donde el subordinado al no poder alejarse del dominante, debe recurrir a señales eléctricas para señalar su estatus. Puede que lo encontrado en una pecera grande se acerque más al comportamiento natural de *G. omarorum*, ya que al ser una especie solitaria (Silva et al., 2013) con que el subordinado huya del territorio disputado es suficiente para dar por terminada la fase agresiva del encuentro agonístico. Además la descarga eléctrica no es sólo usada como medio de comunicación, los peces eléctricos también usan la descarga eléctrica con fines sensoriales (Caputi et al., 2005), por lo que huir es menos costoso que realizar cambios en la descarga eléctrica, sobre todo apagados.

Mantenimiento de la dominancia en el tiempo

Una vez establecida la dominancia se mantuvo cada díada dentro de una pecera durante 36hs, a diferencia de investigaciones previas donde se retiraban los peces una vez pasados los 10 minutos de post-resolución (Batista et al., 2012; Zubizarreta et al., 2015; Jalabert et al., 2015). En ninguna díada, el subordinado hizo uso del refugio aún en la ausencia de ataques por parte del dominante, mientras que el dominante sí hizo uso del mismo (tabla 3); de lo que se concluye que la formación de una dominancia real que se mantuvo sin reversión durante este periodo de tiempo. La baja cantidad de señales eléctricas de sumisión podría ser un indicio de que existe algún mecanismo por el cual los individuos reconocen su estatus sin la necesidad de reincidir en despliegues agresivos. El haber mantenido a los individuos interactuando por un tiempo prolongado permitió establecer que *G. omarorum*, es capaz de formar jerarquías estables (por al menos 36hs) con un uso exclusivo del recurso (refugio). De todas formas al no ser una especie social (Silva et al., 2013), la relevancia de dicha capacidad en la naturaleza resta por ser evaluada.

DISCUSIÓN GENERAL

Territorialidad

Brown (1975), define a un territorio como un área fija en la cual un animal excluye intrusos rivales, mientras que la agresión empleada por un animal en defender su territorio es llamada agresión territorial (Wilson, 1975). Esta agresión puede adoptar varias formas, desde advertencias acústicas (Amorim y Neves, 2008; Krebs et al., 1978), señales químicas (Rosell et al., 1998) e incluso ataques hacia intrusos (Hau et al., 2000). La defensa de un territorio se debe a que la posesión de éste otorga diversas ventajas, entre ellas: reducir el riesgo de predación, aumentar el número de apareamientos, un lugar idóneo para el desarrollo de la progenie y acceso a una fuente de alimento estable (Hinde, 1956). En el presente estudio se encontró en ambas especies un comportamiento territorial.

En *Austrolebias reicherti*, el comportamiento reproductivo incluye el enterramiento de la pareja dentro del sustrato con el fin de depositar y fecundar los óvulos (García et al. 2008), por lo que un área con sustrato tiene un gran valor ya que permite la reproducción. Fabra (2011), encuentra que los machos dominantes permanecieron más tiempo sobre una zona con sustrato, por lo que se concluye que esta especie exhibe un comportamiento territorial. De todas formas en dichos experimentos, la permanencia de los machos en la pecera no fue suficiente como para demostrar que esta especie posee un comportamiento territorial sostenido. Al mantener a los individuos en la pecera por 4 días se encontró un resultado similar, donde los machos dominantes fueron los que permanecieron mayor tiempo en la zona enriquecida en sustrato (tabla 6). El mecanismo por el cual el dominante excluye al subordinado del territorio no es del todo claro; aunque la presencia de ataques a lo largo del experimento, con huidas del subordinado, parece indicar que este es un mecanismo por el cual el dominante evita que el subordinado haga uso del territorio. De todas formas, no es posible descartar además, el uso de señales acústicas o químicas para delimitar el territorio. Aún resta por investigar en base a que parámetros los machos elijen un territorio, si por un mayor acceso a hembras, un menor riesgo de predación o un lugar más propicio para el desarrollo de su progenie.

De la misma forma, la especie *Gymnotus omarorum* ha sido considerada una especie territorial ya que despliega encuentros agonísticos en una pecera sin ningún valor agregado más que el espacio físico (Batista et al., 2012), a lo que se suma su distribución espaciada en las lagunas (Zubizarreta et al., 2016). Sin embargo, los experimentos previos fueron llevados a cabo en una pecera de dimensiones reducidas y en una ventana temporal pequeña, por lo que no se podía afirmar que dicho comportamiento se mantuviese en el tiempo y que no fuese fruto de un hacinamiento que llevase a un comportamiento atípico. Por otro lado, en el presente estudio, los individuos se mantuvieron 36hs en una pecera de dimensiones mayores además de introducir un refugio como valor agregado al territorio. Se observó que una vez resuelto el conflicto los subordinados no hicieron uso del refugio mientras que los dominantes sí, de lo que se concluye que el resultado de la contienda determinó el uso del territorio (tabla 3; figura 6). Incluso en la día 2, el subordinado huye a lo largo de las 36hs a pesar de no haber ataques postpost-resolución (figura 6). Esto podría indicar que además de ataques esta especie usa otros mecanismos para delimitar su territorio. Por otro lado, en un análisis filogenético en peces realizado por Ah-King et al. (2005), se encuentra que el cuidado parental por parte de los machos suele

estar precedido por el comportamiento territorial. Este reporte coincide con lo encontrado por Richerde-Forges et al. (2009), donde se retiró un macho con alrededor de 40 individuos post-larvales. Si bien este estudio no es suficiente para concluir cuidado parental por parte del macho en *G. omarorum*, abre la puerta a nuevos estudios sobre este tema.

Secuenciación

La relación entre genes, cerebro y comportamiento social se da de dos maneras: (1) la variación genética incide en el funcionamiento del cerebro y éste en el comportamiento; y (2) la información social altera la expresión génica generando cambios a nivel del sistema nervioso moldeando el comportamiento (Robinson et al., 2008). Por tanto, hay un creciente interés no sólo en determinar cómo los genes inciden en el comportamiento, sino también en cómo la información social (ej: la formación de una jerarquía de dominancia-subordinación) incide en la expresión génica, principalmente en el desarrollo y funcionamiento del cerebro (Robinson et al., 2008). El presente estudio permitirá, una vez obtenidas las secuencias estudiar la expresión génica en ambas especies en el sistema nervioso central (cerebro entero en *A. reicherti* y área pre-óptica en *G. omarorum*) relacionadas a la formación y mantenimiento de una jerarquía social estable. Una forma de hacer esto es comparar la expresión génica intra-específica de dominantes y subordinados y buscar los genes que tengan una expresión diferencial (sobre-expresión o sub-expresión) relacionada a cada fenotipo. Otra forma de abordar este estudio es a partir del uso de genes candidatos. Se conocen como genes candidatos, a aquellos genes que en otro organismo influyen en un comportamiento similar (Fitzpatrick et al., 2005). Esto puede ser una herramienta muy útil al estudiar especies con pocos antecedentes genéticos, a través del uso de información obtenida en especies con un mayor estudio en esta área (Fitzpatrick et al., 2005). Por ejemplo, genes que inciden en el comportamiento agresivo en *Drosophila melanogaster* (Edwards et al., 2009) pueden ser evaluados en el estudio del comportamiento agresivo en *G. omarorum* y *A. reicherti*.

CONTRIBUCIONES

Este trabajo fue presentado mediante poster en la “Primera Reunión de biología del Comportamiento del Cono Sur” Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. LA EXCLUSIÓN TERRITORIAL ASEGURA LA PERSISTENCIA DE LA DOMINANCIA A LARGO PLAZO EN EL PEZ ELÉCTRICO GYMNOTUS OMARORUM. Valiño G., Tassino B., Silva A.

Asimismo este trabajo se integra a dos manuscritos en preparación que serán enviados para su publicación en 2017-2018:

- Territory size matters: context-dependent aggression and territoriality in the agonistic behavior of the weakly electric fish *Gymnotus omarorum*. Perrone, Pedraja, Valiño, Tassino, Silva.
- Distinctive transcriptomic patterns of dominance and subordination in the brain of the weakly electric fish, *Gymnotus omarorum*. Eastman, Valiño, Zakon, Sotelo, Silva

BIBLIOGRAFIA

- Afraz, A., Boyden, E. S., & DiCarlo, J. J. (2015). Optogenetic and pharmacological suppression of spatial clusters of face neurons reveal their causal role in face gender discrimination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(21), 6730-6735.
- Ah-King, M., Kvarnemo, C., & Tullberg, B. S. (2005). The influence of territoriality and mating system on the evolution of male care: a phylogenetic study on fish. *Journal of Evolutionary Biology*, *18*(2), 371-382.
- Albert, D. J., Walsh, M. L., Gorzalka, B. B., Mendelson, S., & Zalys, C. (1986). Intermale social aggression: suppression by medial preoptic area lesions. *Physiology & behavior*, *38*(2), 169-173.
- Amorim, M. C. P., & Neves, A. S. M. (2008). Male painted gobies (*Pomatoschistus pictus*) vocalise to defend territories. *Behaviour*, *145*(8), 1065-1083.
- Barata, E. N., Hubbard, P. C., Almeida, O. G., Miranda, A., & Canário, A. V. (2007). Male urine signals social rank in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *BMC biology*, *5*(1), 54.
- Batista, G., Zubizarreta, L., Perrone, R., & Silva, A. (2012). Non-sex-biased Dominance in a Sexually Monomorphic Electric Fish: Fight Structure and Submissive Electric Signalling. *Ethology*, *118*(4), 398-410.
- Black-Cleworth, P. (1970). The role of electrical discharges in the non-reproductive social behaviour of *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Pisces). *Animal Behaviour Monographs*, *3*, 11N1-77.
- Brandão, M. L., Braithwaite, V. A., & Gonçalves-de-Freitas, E. (2015). Isolation impairs cognition in a social fish. *Applied Animal Behaviour Science*, *171*, 204-210.
- Briffa, M., Sneddon, L. U., & Wilson, A. J. (2015). Animal personality as a cause and consequence of contest behaviour. *Biology letters*, *11*(3), 20141007.
- Brown, J. L. (1975). *The evolution of behavior* (p. 761). New York: Norton.
- Caputi, A. A., Carlson, B. A., & Macadar, O. (2005). Electric organs and their control. In *Electroreception* (pp. 410-451). Springer New York.
- Edwards, A. C., Zwarts, L., Yamamoto, A., Callaerts, P., & Mackay, T. F. (2009). Mutations in many genes affect aggressive behavior in *Drosophila melanogaster*. *BMC biology*, *7*(1), 29.
- Fabra, A.L. (2011). Comportamiento Agonístico En Machos De *Austrolebias Reicherti*. Tesis de grado. Facultad De Ciencias, UDELAR, Uruguay.
- Fitzpatrick, M. J., Ben-Shahar, Y., Smid, H. M., Vet, L. E., Robinson, G. E., & Sokolowski, M. B. (2005). Candidate genes for behavioural ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, *20*(2), 96-104.
- García, D., Loureiro, M., & Tassino, B. (2008). Reproductive behavior in the annual fish *Austrolebias reicherti* Loureiro & García 2004 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Neotropical Ichthyology*, *6*(2), 243-248.
- Goodson, J. L. (2005). The vertebrate social behavior network: evolutionary themes and variations. *Hormones and Behavior*, *48*(1), 11-22.
- Goodson, J. L., & Kabelik, D. (2009). Dynamic limbic networks and social diversity in vertebrates: from neural context to neuromodulatory patterning. *Frontiers in neuroendocrinology*, *30*(4), 429-441.

- Greenspan, R. J. (2008). The origins of behavioral genetics. *Current Biology*, 18(5), R192-R198.
- Greenwood, A. K., Wark, A. R., Fernald, R. D., & Hofmann, H. A. (2008). Expression of arginine vasotocin in distinct preoptic regions is associated with dominant and subordinate behaviour in an African cichlid fish. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 275(1649), 2393-2402.
- Haesler, S., Rochefort, C., Georgi, B., Licznarski, P., Osten, P., & Scharff, C. (2007). Incomplete and inaccurate vocal imitation after knockdown of FoxP2 in songbird basal ganglia nucleus Area X. *PLoS Biol*, 5(12), e321.
- Hau, M., Wikelski, M., Soma, K. K., & Wingfield, J. C. (2000). Testosterone and year-round territorial aggression in a tropical bird. *General and comparative endocrinology*, 117(1), 20-33.
- Heston, J. B., & White, S. A. (2015). Behavior-linked FoxP2 regulation enables zebra finch vocal learning. *Journal of Neuroscience*, 35(7), 2885-2894.
- Hinde, R. A. (1956). The biological significance of the territories of birds. *Ibis*, 98(3), 340-369.
- Hsu, Y., Earley, R. L., & Wolf, L. L. (2006). Modulation of aggressive behaviour by fighting experience: mechanisms and contest outcomes. *Biological Reviews*, 81(1), 33-74.
- Jalabert, C., Quintana, L., Pessina, P., & Silva, A. (2015). Extra-gonadal steroids modulate non-breeding territorial aggression in weakly electric fish. *Hormones and behavior*, 72, 60-67.
- Kar, R. (2016). Using Comparative Transcriptomics to Explore the Evolution of Monogamous Behavior. PhD Thesis. The University of Texas at Austin.
- King, J. A. (1973). The ecology of aggressive behavior. *Annual review of ecology and systematics*, 4(1), 117-138.
- Krebs, J., Ashcroft, R., & Webber, M. (1978). Song repertoires and territory defence in the great tit. *Nature*, 271(5645), 539-542.
- Loureiro, M., & García, G. (2004). *Cynolebias reicherti*, a New Annual Fish Species-Rivulidae: Cynolebiatinae-From Southern Laguna Merín Basin. *Acta Zoológica Lilloana*.
- Lucas, C., & Sokolowski, M. B. (2009). Molecular basis for changes in behavioral state in ant social behaviors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(15), 6351-6356.
- Moretz, J. A. (2005). Aggression and fighting ability are correlated in the swordtail fish *Xiphophorus cortezi*: the advantage of being barless. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 59(1), 51-57.
- Nelson, R. J. (2006). *Biology of Aggression*. OXFORD UNIVERSITY PRESS
- Newman, S. W. (1999). The medial extended amygdala in male reproductive behavior a node in the mammalian social behavior network. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 877(1), 242-257.
- O'connell, L. A., & Hofmann, H. A. (2011). The vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: a comparative synthesis. *Journal of Comparative Neurology*, 519(18), 3599-3639.
- Pan, Y., Xu, L., Young, K. A., Wang, Z., & Zhang, Z. (2010). Agonistic encounters and brain activation in dominant and subordinate male greater long-tailed hamsters. *Hormones and behavior*, 58(3), 478-484.

- Passos, C. (2013a). *Austrolebias: Un Modelo Para Explorar La Selección Sexual*. Tesis de doctorado. Facultad De Ciencias, UDELAR, Uruguay.
- Passos, C., Tassino, B., Loureiro, M., & Rosenthal, G. G. (2013b). Intra-and intersexual selection on male body size in the annual killifish *Austrolebias charrua*. *Behavioural processes*, 96, 20-26.
- Passos, C., Reyes, F., Tassino, B., Rosenthal, G. G., & González, A. (2013c). Female annual killifish *Austrolebias reicherti* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) attend to male chemical cues. *Ethology*, 119(10), 891-897.
- Pouso, P., Radmilovich, M., & Silva, A. (2017). An immunohistochemical study on the distribution of vasotocin neurons in the brain of two weakly electric fish, *Gymnotus omarorum* and *Brachyhypopomus gauderio*. *Tissue and Cell*, 49(2), 257-269.
- Quintana, L., Zubizarreta, L., Jalabert, C., Batista, G., Perrone, R., & Silva, A. (2016). Building the case for a novel teleost model of non-breeding aggression and its neuroendocrine control. *Journal of Physiology-Paris*.
- Richer-de-Forges, M. M., Crampton, W. G., & Albert, J. S. (2009). A new species of *Gymnotus* (Gymnotiformes, Gymnotidae) from Uruguay: description of a model species in neurophysiological research. *Copeia*, 2009(3), 538-544.
- Rittschof, C. C., Bukhari, S. A., Sloofman, L. G., Troy, J. M., Caetano-Anollés, D., Cash-Ahmed, A., ... & Zhang, H. (2014). Neuromolecular responses to social challenge: Common mechanisms across mouse, stickleback fish, and honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(50), 17929-17934.
- Robinson, G. E., Fernald, R. D., & Clayton, D. F. (2008). Genes and social behavior. *science*, 322(5903), 896-900.
- Rosell, F., Bergan, F., & Parker, H. (1998). Scent-marking in the Eurasian beaver (*Castor fiber*) as a means of territory defense. *Journal of Chemical Ecology*, 24(2), 207-219.
- Silva, A. C., Perrone, R., Zubizarreta, L., Batista, G., & Stoddard, P. K. (2013). Neuromodulation of the agonistic behavior in two species of weakly electric fish that display different types of aggression. *Journal of Experimental Biology*, 216(13), 2412-2420.
- Teles, M. C., Cardoso, S. D., & Oliveira, R. F. (2016). Social plasticity relies on different neuroplasticity mechanisms across the brain social decision-making network in zebrafish. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 10.
- Wilson Edward, O. (1975). *Sociobiology: the new synthesis*. Cambridge: *The Balknap Pr. of Harvard Univ. Pr*, 8.
- Zubizarreta, L., Stoddard, P. K., & Silva, A. (2015). Aggression Levels Affect Social Interaction in the Non-Breeding Territorial Aggression of the Weakly Electric Fish, *Gymnotus omarorum*. *Ethology*, 121(1), 8-16.
- Zubizarreta, L., Quintana, L., Guimaraes Moreira, R., Honji, R.M., Silva, A. (2016). The Role of estradiol underlying non-breeding territorial aggression in a teleost fish: a complementary approach from the field and the lab XII International Society for Neuroethology Congress Montevideo, Uruguay.