

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

PEDECIBA

Subárea Zoología

2019

**REGULACIÓN HORMONAL DE LA CONDUCTA AGONÍSTICA
EN EL PEZ ANUAL *Austrolebias reicherti* (Cyprinodontiformes,
Rivulidae)**

Lic. Federico Reyes Blengini

Laboratorios de ejecución:

Sección Etología, Facultad de Ciencias, UdelaR

Unidad Bases Neurales de la Conducta, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente
Estable

Orientadora: Dra. Bettina Tassino (Sección Etología, Facultad de Ciencias, UdelaR)

Co-orientadora: Dra. Laura Quintana (Unidad Bases Neurales de la Conducta, IIBCE)

Tribunal evaluador:

Dra. Denise Vizziano

Dra. Daniella Agrati

Dr. Matías Pandolfi

*Cuando los jugadores se hayan ido,
cuando el tiempo los haya consumido,
ciertamente no habrá cesado el rito.*

J. L. Borges

(de "Ajedrez", El Hacedor, 1960)

RESUMEN

La conducta agonística es un comportamiento social ubicuo entre los animales involucrada en la competencia intraespecífica por recursos limitantes como ser alimento, territorio o pareja. En un enfrentamiento agonístico, los animales son capaces de valorar los costos y beneficios de involucrarse o retirarse de una contienda, evaluando aspectos como el tamaño o la capacidad de pelea (RHP, resource holding potential) propia y/o de sus oponentes. Las hormonas esteroideas sexuales, andrógenos y estrógenos, son importantes moduladores del comportamiento social y responden a su vez, ante las experiencias sociales. En peces, el andrógeno 11-ketotestosterona (11KT), ha sido el andrógeno más fuertemente ligado tanto a los niveles de agresión como a la dominancia dentro de un grupo. Por otro lado, y más recientemente, la conversión de testosterona a estradiol (E2) en el cerebro por la enzima aromatasa, ha probado jugar un rol relevante en la modulación de los comportamientos agresivos de machos en vertebrados incluidos los peces. *Austrolebias reicherti* integra un grupo de especies de peces anuales endémicas de los Humedales del Este de Uruguay que presentan una intensa selección inter e intrasexual. Los machos establecen enfrentamientos agonísticos de los cuales emergen relaciones claras de dominancia y subordinación. El objetivo de esta tesis fue caracterizar la conducta agonística de *A. reicherti* y evaluar el rol de los andrógenos y estrógenos en la regulación de dicha conducta. Se realizaron 24 encuentros agonísticos diádicos de 60 min de duración, entre individuos adultos sin experiencia social, a partir de los cuales se caracterizó la dinámica de la contienda, se identificaron y cuantificaron las unidades comportamentales, y se obtuvieron muestras de plasma para la cuantificación de los niveles circulantes de 11KT y E2. Paralelamente, se obtuvieron muestras de plasma de individuos que no atravesaron dicha experiencia social (control). Finalmente, se evaluó el rol de la vía estrogénica mediante la administración del fármaco Fadrozole, inhibidor de la síntesis de estradiol. Los machos de *A. reicherti* establecen enfrentamientos agonísticos en los que el tamaño afecta el resultado de la contienda. Los individuos dominantes presentan mayores niveles circulantes de 11KT que los individuos subordinados, mientras que no se diferencian de los niveles de los individuos control. No se encontró diferencia en los niveles plasmáticos de E2 entre dominantes, subordinados o individuos control. No se encontró relación entre la agresión y los niveles plasmáticos de 11KT o E2. Sin embargo, la inhibición de la enzima aromatasa redujo significativamente el nivel de agresión de las contiendas. En su conjunto, los resultados de esta tesis describen la conducta agonística entre machos de *A. reicherti* y determinan los niveles circulantes de hormonas sexuales, por primera vez para peces anuales del género *Austrolebias*. Además, sugieren que los andrógenos son modulados por el desafío social disminuyendo en los individuos que pierden una contienda, a la vez que la vía estrogénica participa en la regulación de la conducta agonística de *A. reicherti*.

AGRADECIMIENTOS

Esta Maestría atravesó casi 4 años intensos de mi vida (en el sentido que usaría Pessoa). Pero también atravesó la vida de otros, a su placer o pesar (un poco de ambas creo), y al mismo tiempo, esta fue atravesada por lo que ella misma reflejaba en el pequeño charco que es, o era, el Montevideo (y mis círculos de amigos y amigas) de la segunda década del SXXI. Sin duda que conseguir un título de Magíster es todo un logro académico. Pero en términos más banales, la Maestría me dio un lugar en el mostrador que no tenía. En el bar tenía *Mi tema*: las peleas de peces ¡¿Cómo que los peces se pelean?! Ya tenía mi discursito armado: “sí, y no solo eso, por tus venas y las de estos peces corren las mismas hormonas que regulan... y blá blá”. El súmmum de mi “*stand up*” era cuando contaba ese paper que le miden la Testosterona a los hinchas brasileiros e italianos en la final de la Copa del Mundo del '94. Fútbol y Peleas, no podía fallar. Al tercer año ya me sentía un poco usado: “Bo Fede contate ese paper de la Copa del Mundo...”. Por suerte, todo ciclo llega a su fin, para así poder abrir ciclos nuevos. Pero antes: ¡a agradecer y mucho!

Esta tesis es un gran ejemplo de que la Ciencia es una aventura colectiva. Desde el mismo día del puntapié inicial, hasta la víspera de la Defensa, este humilde magíster recibió manos-aletas de todo tipo y color que hicieron posible que este barco se mantuviera a flote, sorteara un par de tormentas (internas y externas), y llegara a buen puerto.

Para mí fue un verdadero placer recorrer de la mano de Betta y Laura, este recoveco del mundo natural que se aloja en la sangre y los cerebros de unos peces desquiciados de los Humedales del Este de Uruguay llamados *Austrolebias*. Mis tutoras fueron el sustrato de donde agarrarse, el piano llevando el ritmo por Cuareim, fueron la invitación a buscarle la octava aleta al pez cuando necesario y a dejar de hacerlo cuando había que enfocarse. Fueron el cambio de agua en el momento justo, el pensar afuera del charco, la lluvia que aviva al alevín adormecido allá por abril, pero sobretodo fueron la pasión por la ciencia y la biología “con patas”. Ya se los dije, pero nunca está de más. ¡GRACIAS! de corazón.

En segundo lugar, quiero agradecerle a mi compa de todas las horas de la incasable lucha contra el GCMS, La Vasca Lucía Zubizarreta. Ella fue mi primer contacto hormonal. Con Lu di mis primeros pasos en esto de medir hormonas en sangre, y “hacer mesada” en el laboratorio. Aprendí muchísimo con ella, sobre todo a no bajar los brazos, y a reconocer que unos miligramos de misticismo son necesarios para combatir la adversidad tecnológica. Una fantástica científica con la que tuve el placer de compartir mesada, oficina y mostrador. En el rubro hormonal, también entra sin lugar a dudas Ceci Jalabert, gran valora con quien nos dimos juntos la cabeza contra mis primeras planillas Excell de cuantificaciones hormonales.

Otras dos piezas fundamentales en hacer andar este ciclo, fueron el Caco Passos y Ana Silva. En más de una reunión de discusión, el Caco supo hacer los aportes justos con su mirada subacuática de la vida de los peces, al mejor estilo de George Harrison aportando un par de notas sutiles pero fundamentales. Ana, por su mirada esclarecedora sobre las cosas biológicas que, siempre con elegancia, “poda” la complejidad. Y por hacer andar la rueda. Por tender el puente entre el piso 6 y la Unidad.

Muchas gracias al grupo del Laboratorio de Neuroquímica del IIBCE: Manuel Minteguiaga, Marcela Martínez y Andrés Abín por su disposición a dilucidar qué tipo de espíritu había invadido al GCMS para que diera esos resultados. Gracias también a Ana Ferreira del Instituto de Higiene y Steven Wilcoxon de Cayman Chemicals por su colaboración en el desarrollo de los ELISA.

En el rubro cría de peces: gracias totales a mis compas Andrés Olivera, Inés Berrosteguieta y Guillermo Valiño y muchísimas gracias a la barra de estudiantes del Club de la Pelea, por sus aportes en la cría, experimentos y procesamiento de datos: Ileana Sosa, Manuelita Méndez, Agustina Brum y Joaquín Williman.

Gracias a las barras del piso 6 de Facultad de Ciencias y de la UBNC por hacer del día a día científico un laburo como cualquier otro, pero divertido.

Finalmente, quiero agradecer a los miembros del tribunal por la mirada minuciosa de la tesis, sus aportes valiosos y las discusiones interesantes que enriquecieron esta versión final y aportaron sin duda a lo que sigue.

Y un gracias muy especial a mi vieja, y a mi psicóloga.

Contenido

INTRODUCCIÓN	7
Modulación hormonal del comportamiento agonístico.....	8
Vías de acción de los esteroides sexuales en el SNC.....	10
Los peces teleósteos como modelos para el estudio de la regulación hormonal de la agresión.	11
Los peces anuales del género <i>Austrolebias</i> como modelo ventajoso para el estudio de la regulación hormonal de la agresión reproductiva	12
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	16
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL	17
CAPÍTULO I.....	18
<i>Caracterización de la conducta agonística</i>	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
<i>Animales de experimentación</i>	18
<i>Procesamiento de datos conductuales</i>	20
<i>Análisis estadístico</i>	21
RESULTADOS.....	22
Relación entre la asimetría en RHP y dinámica y resultado de la contienda	25
Relación entre RHP y Duración del conflicto	27
CAPÍTULO II.....	30
<i>Regulación hormonal de la conducta agonística</i>	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
<i>Animales de experimentación</i>	30
2.1 Relación entre el comportamiento agonístico y los niveles plasmáticos de 11-ketotestosterona y 17 β -estradiol.....	31
<i>Ensayos conductuales y obtención de muestras</i>	31
<i>Cuantificación de niveles hormonales en plasma por ELISA</i>	34
<i>Procesamiento de datos conductuales</i>	35
<i>Análisis estadístico</i>	35
<i>Puesta a punto de la técnica de cuantificación hormonal por Cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas (GCMS)</i>	36
2.2 Bloqueo de la vía estrogénica por administración de fadrozole.....	39
<i>Ensayos conductuales</i>	39
<i>Procesamiento de datos conductuales</i>	39
<i>Análisis estadístico</i>	40
RESULTADOS.....	41

2.1 Relación entre el comportamiento agonístico y los niveles plasmáticos de 11-ketotestosterona y 17 β -estradiol	41
Relación entre el comportamiento agonístico y los niveles plasmáticos de 11-ketotestosterona...	41
Relación entre el comportamiento agonístico y el nivel plasmático de 17 β -estradiol	46
2.2 Bloqueo de la vía estrogénica por administración de fadrozole.....	50
DISCUSIÓN	52
Comportamiento agonístico de machos de <i>A. reicherti</i>	52
Relación entre comportamiento agonístico y 11-ketotestosterona.....	55
Relación entre comportamiento agonístico y 17 β -estradiol.....	58
CONCLUSIONES.....	61
CONTRIBUCIONES	63
Comunicaciones a congresos	63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

INTRODUCCIÓN

La conducta agonística es una conducta social ampliamente extendida entre los animales, que presenta un alto valor adaptativo. Se encuentra involucrada en la resolución de conflictos producto de la competencia intraespecífica por recursos limitantes (territorio, alimento, pareja, sitios de reproducción, etc.) y determina la distribución espacial de los individuos en las poblaciones naturales, así como el acceso a eventos reproductivos (King, 1973; Lorenz, 1963). Involucra tanto los comportamientos ofensivos y de ataque como los defensivos, y está en la base de la evolución de “armas” (púas, espolones, cornamentas etc.) y de complejos sistemas de señalización (Darwin, 1872, Lorenz, 1963). La agresión es un comportamiento complejo influido por factores genéticos, fisiológicos, sociales y ambientales cuyas respuestas están modeladas por procesos evolutivos. En términos generales se reconoce por un conjunto de características: la intención deliberada de infligir daño en otro individuo acompañada de una fuerte respuesta fisiológica y consecuente distribución espacial de los animales o determinación de estatus (Huntingford y Turner, 1987). En grupos taxonómicos lejanamente emparentados y aun cuando los recursos en disputa son disímiles, los conflictos agonísticos suelen presentar tres fases claramente distinguibles: a) *evaluación*: en la que los animales realizan despliegues de amenaza sin involucrar contacto físico; b) *contienda*: durante la cual se produce un intercambio de despliegues de amenaza que llega involucrar contacto y a menudo daño físico; y c) *pos-resolución* que se inicia cuando uno de los individuos se retira de la contienda, se subordina y cede el recurso a partir de lo que se genera una relación de jerarquía (Silva et al., 2013). Aunque los enfrentamientos pueden resolverse durante la etapa de evaluación sin escalar a una fase de contienda, comúnmente involucran el despliegue de conductas agresivas cuyo objetivo es desplazar, dominar o herir al competidor (Nelson, 2006, Arnott y Elwood, 2009).

La Teoría de Juegos proveyó el marco conceptual para el desarrollo de modelos teóricos que habilitaron la expansión de la investigación sobre la agresión (Maynard Smith y Price, 1973, Maynard Smith, 1974). En este contexto se entiende que los animales realizan una valoración de los costos y los beneficios de involucrarse o retirarse de la contienda en el sentido de maximizar su éxito reproductivo. Mientras los costos implican la pérdida de oportunidades, lesiones físicas o la muerte, los beneficios pueden variar en función del valor que la adquisición del recurso tenga para cada contrincante. La toma de decisión de un individuo estará entonces determinada por la evaluación de las capacidades de pelea propias y del oponente, y del valor del recurso en disputa. A la vez, el éxito de un individuo estará mediado tanto por su decisión como por la que tome su contendiente (Parker, 1974; Maynard Smith y Parker, 1976; Hsu et al., 2006). La capacidad de pelea o el potencial para retener un recurso (Resource Holding

Potencial, RHP en inglés) definido como la habilidad de un animal para obtener o mantener un recurso durante una contienda, es un carácter multidimensional que se asocia a atributos del individuo como condición corporal, estado nutricional o tamaño de sus ornamentos (Briffa et al., 2013; Parker, 1974).

La decisión que pone fin a la contienda es la que toma un individuo al subordinarse y puede estar basada en la estimación propia de su RHP (auto-evaluación), o en la estimación relativa del RHP de su rival (evaluación mutua) (Briffa & Sneddon 2010). La auto-evaluación del RHP supone la existencia de un umbral de inversión propio de cada individuo, que cuando se alcanza determina la subordinación. Por otro lado, uno de los modelos más conocidos de evaluación mutua, el modelo de evaluación en secuencia (*Sequential Assessment Model*, SAM, (Enquist y Leimar, 1983) establece que los individuos recaban información sobre las asimetrías en RHP durante las interacciones agonísticas, empleando comportamientos en una secuencia en que los costos se van incrementando. Una predicción fundamental de este modelo establece que, para detectar diferencias en el RHP, los contendientes precisan mayores tiempos de interacción cuanto menores son las asimetrías. Debido a que el tamaño corporal es el mejor indicador del RHP en la mayoría de las especies, una relación inversa entre la diferencia de tamaño de los contrincantes y la duración de la pelea ha sido considerada como suficiente para diagnosticar la existencia de un proceso de evaluación mutua. Sin embargo, esta generalización puede llevar a un diagnóstico falso en muchos casos (Taylor y Elwood 2003). Para establecer con certeza la presencia de un proceso de auto-evaluación, es necesario analizar además la relación entre el tamaño de ganadores y perdedores con la duración del conflicto (Arnott y Elwood, 2009). Asimismo, el modelo de evaluación acumulativa (*Cumulative Assessment Model* CAM, Taylor y Elwood, 2003) propone que cada individuo posee un máximo de inversión para la contienda, que se alcanza por la tolerancia intrínseca de cada individuo y por los costos que le infrinja su rival. Si bien este es un modelo de auto-evaluación puede confundirse con la evaluación mutua. La metodología para discriminar entre un CAM y el SAM es explorar la relación entre individuos del mismo tamaño (< 5%, de diferencia) y la duración del conflicto. El SAM aplica si en este rango de diferencia corporal no existe correlación entre el tamaño promedio de los contendientes y la duración del conflicto (Arnott y Elwood, 2009).

Modulación hormonal del comportamiento agonístico

Las hormonas esteroideas sexuales (andrógenos y estrógenos) intervienen en la regulación de los comportamientos agresivos actuando en diversos núcleos del Sistema Nervioso Central (SNC) involucrados en el control de la conducta social y reproductiva. Este conjunto de núcleos altamente interconectados denominado Red del Comportamiento Social (RCS o *Social Behavior Network* en inglés), se considera muy conservado entre los vertebrados (Goodson, 2005; O'Connell y Hofmann, 2011a, 2011b). Además de los efectos organizacionales de las hormonas esteroideas durante etapas

del desarrollo de los organismos, en la etapa adulta, las hormonas esteroides presentan un rol activador o modulador, actuando sobre los circuitos neurales involucrados en la expresión de ciertos comportamientos, y otorgando a los individuos la flexibilidad conductual necesaria para adaptarse a determinados contextos socioambientales (Adkins-Regan, 2005; Nelson, 2006).

En 1849, luego de experimentos de castración y reimplantación de la gónada realizados sobre gallos domésticos, Arnold Berthold concluyó que un producto de secreción liberado por los testículos y transportado por la sangre (más tarde denominado "*hormona*"), era necesario para la expresión de caracteres sexuales secundarios y de conductas sexuales y agresivas en los machos (Quiring, 1944; Nelson, 2011). Siguiendo una estrategia similar a la del trabajo fundacional de Berthold, numerosos estudios de castración-reemplazo hormonal o de administración exógena de andrógenos, han evidenciado un fuerte vínculo entre andrógenos, principalmente testosterona (T), y la expresión de conductas agresivas en diversas especies de vertebrados (ver citas en Demas et al., 2007; Nelson, 2006; Oliveira, 2004; Wingfield et al., 1990). Los andrógenos gonadales son hormonas clave en el control de la reproducción en vertebrados, donde intervienen en la espermatogénesis, el desarrollo de caracteres sexuales secundarios y la expresión de comportamientos reproductivos (revisión en Ball y Balthazart, 2002). En especies de reproducción estacional, los niveles de andrógenos aumentan durante la temporada reproductiva, cuando la frecuencia de enfrentamientos agresivos entre machos es mayor (Lincoln et al., 1972; Wingfield y Hahn, 1994). Más aún, este incremento es mayor en sitios de cría de alta densidad de individuos donde las contiendas son más frecuentes (Beletsky et al., 2016; Pankhurst y Barnett, 1993). En muchas especies que establecen jerarquías sociales entre los individuos de un grupo, los machos dominantes, que exhiben mayores niveles de agresividad y acceden a un mayor número de eventos reproductivos, suelen presentar niveles más elevados de andrógenos circulantes que aquellos de menor rango social (Rowher y Wingfield, 1981; Morandini et al., 2014). Sin embargo, en algunas especies no se han encontrado diferencias entre dominantes y subordinados (Cardwell et al., 1996; Neat y Mayer, 2002).

Así como la acción de los esteroides sexuales sobre la modulación del comportamiento ha sido bien documentada, numerosos estudios han mostrado que, en especies altamente sociales, los machos responden con un aumento en sus niveles androgénicos tanto ante una oportunidad de reproducción como a un desafío social frente a un coespecífico (revisado en Oliveira, 2004). El aumento en los niveles de andrógenos como respuesta a interacciones agonísticas ha sido documentado en diversas especies de vertebrados incluidos peces (Dijkstra et al., 2012; Earley y Hsu, 2008; Oliveira et al., 1996), aves (Wingfield et al., 1990; Goymann, 2009) y mamíferos, seres humanos incluidos (Creel et al., 1993;

Geniole et al., 2017; Oyegbile y Marler, 2005). Estos cambios fisiológicos pueden ocurrir de manera rápida entre 10 y 30 minutos posteriores a la experiencia social en aves (Wingfield et al., 1990; Wingfield et al., 2006) y peces (Maruska y Fernald, 2010), o luego de 45 min en roedores (Oyegbile y Marler, 2005). Estas respuestas endócrinas permitirían un ajuste de la conducta al contexto social percibido y otorgarían a los individuos la plasticidad comportamental necesaria para adaptarse a las consecuencias y demandas de perder, ganar o simplemente participar de un conflicto agonístico (Oliveira, 2004). Sin embargo, las respuestas hormonales suelen variar sustancialmente entre especies y dicha variación ha sido asociada a diferencias en los sistemas de apareamiento y el tipo de cuidado parental (Wingfield et al., 1990; Goymann et al., 2007; Hirschenhauser y Oliveira, 2006).

Vías de acción de los esteroides sexuales en el SNC

La importancia de la acción directa de los andrógenos actuando a través de receptores androgénicos, en la expresión de conductas agresivas, ha sido ampliamente documentada en la bibliografía (Simon y Lu, 2006). Sin embargo, fundamentalmente a partir de la década de los 90, la metabolización cerebral de T a otros metabolitos ha probado ser relevante en la expresión tanto de comportamientos reproductivos como agresivos (Schlinger y Callard, 1990, 1989a, 1989b; Tian et al., 2015). La T puede ser metabolizada a estradiol (E2) por la enzima aromatasa (Nelson, 2011). Además de ser expresada por la gónada, la aromatasa presenta una isoforma cerebral expresada en diversos núcleos de la RCS (Shaw, 2018), y presenta, asimismo, una mayor actividad en machos que hembras (Naftolin et al., 1975). Tanto la disrupción o bloqueo de los receptores de estrógeno (O'Connell y Hofmann, 2012; Ogawa et al., 1997; Sano et al., 2013) como de la aromatasa (Huffman et al., 2013; Schlinger y Callard, 1989a) provoca una reducción en los niveles de agresión entre machos en diversos taxa, lo que indica la importancia de esta vía en el control de la agresión reproductiva intrasexual (revisado en Trainor et al., 2006).

Se plantea que los andrógenos y estrógenos (y las hormonas esteroides en general) modulan la actividad de sus áreas blanco en el SNC, actuando como ligandos de factores de transcripción ejerciendo así efectos genómicos. Estos efectos, requieren de varias horas a días para desarrollarse y producen cambios persistentes en la fisiología y el comportamiento (McCarthy et al., 2009). Sin embargo, investigaciones recientes sugieren que los esteroides sexuales también pueden inducir cambios comportamentales de acción rápida (menos de 30 min, Cornil et al., 2006), a través de receptores de membrana o intracelulares no nucleares (acción no genómica) (Heimovics et al., 2015, 2012; Trainor et al., 2008, 2007).

Los peces teleósteos como modelos para el estudio de la regulación hormonal de la agresión.

Los peces teleósteos han sido modelos centrales en el estudio de los conflictos agonísticos y más recientemente de las bases neuroendócrinas del comportamiento. Representan el grupo troncal de los vertebrados, siendo el grupo de vertebrados más diverso (Nelson et al., 2016). Se ha propuesto que la presencia de tres rondas de duplicación genómica en los grupos más basales, es un factor clave que explica la importante radiación adaptativa de los teleósteos, así como su vasta diversidad de estrategias reproductivas (Volff, 2005). Esta diversidad de estrategias reproductivas y sistemas de apareamiento, sumado a la alta conservación de los moduladores que afectan la agresión entre vertebrados, convierte a los peces en modelos ideales a la vez que desafiantes para estudios comparativos de las bases neuroendócrinas de la agresión desde una perspectiva ecológica y evolutiva (Silva et al., 2013).

En peces, tanto la T como su metabolito 11-ketotestosterona (11KT) sintetizado en la gónada, son los andrógenos presentes en mayores concentraciones en plasma. En muchas especies, la 11KT aparece como el principal andrógeno bioactivo y el que suele presentar dimorfismo sexual en su concentración (Borg, 1994; Kime, 1993). Varios estudios han documentado la asociación positiva “clásica” de vertebrados entre agresión en machos y niveles plasmáticos (naturales o exógenos) tanto de T como de 11KT (e.g. Cardwell y Liley, 1991; Fernald, 1976; Higby et al., 1991; Remage-Healey y Bass, 2006; Villars, 1983). A su vez, los individuos de mayor rango social suelen presentar niveles más elevados de ambos andrógenos, que individuos subordinados o no territoriales (Brantley et al., 1993; revisado en Oliveira et al., 2002), si bien no aparece como una regla general y algunos estudios no observan dicha asociación entre estatus social y andrógenos en plasma (Liley y Kroon, 1995; Neat y Mayer, 2002). Algunos autores documentan respuestas de ambos andrógenos en individuos de ciertas especies ante una oportunidad de ascenso social (Elofsson et al., 2000; Maruska y Fernald, 2010; Oliveira et al., 1996) mientras que otros estudios solo observan aumento de 11KT y no de T (Desjardins et al., 2006; Hirschenhauser et al., 2004; Stiver et al., 2015), o a la inversa (aumento en T pero no de 11KT) (Dijkstra et al., 2012). En machos primarios del rivúlido (no anual) hermafrodita *Kryptolebias marmoratus*, atravesar un desafío social aumenta los niveles de 11KT tanto en ganadores como en perdedores de una contienda (Li et al., 2018). En el cíclido *Amatitlana nigrofasciata*, los niveles de 11KT se elevan en machos tanto ante experiencias reproductivas como agonísticas (Sessa et al., 2013), o incluso ante la sola presencia de un oponente (Dziewieczynski et al., 2006). Por otra parte, en cuanto el rol de los estrógenos en el comportamiento agonístico, niveles elevados tanto de T como de E2 en plasma han sido documentados en machos dominantes o que ascienden a dicho estatus en cíclidos (Huffman et al., 2012; O’Connell et al., 2013). En este grupo de peces además, tanto el bloqueo farmacológico de receptores androgénicos (Sessa et al., 2013) o estrogénicos (O’Connell and Hofmann, 2012), así como

de la enzima aromatasa (Huffman et al., 2012, 2013) ha mostrado reducir la agresividad en machos en diferentes contextos sociales.

Los peces anuales del género *Austrolebias* como modelo ventajoso para el estudio de la regulación hormonal de la agresión reproductiva

Los peces anuales autóctonos *Austrolebias reicherti* son un modelo ventajoso para profundizar en los mecanismos neuroendócrinas que subyacen a la agresión reproductiva, debido a las particularidades de su ciclo de vida que imponen que toda la vida adulta se centre en la reproducción, generando una fuerte presión de selección sexual tanto por la vía de la competencia entre machos como de la elección de las hembras.

Los peces anuales son un grupo polifilético de peces teleósteos comprendidos entre las familias Notobranchiidae en África y Rivulidae en el Neotrópico, dentro del orden de los Cyprinodontiformes (Furness, 2015). Los peces anuales experimentan un ciclo de vida anual que involucra la deposición de huevos con resistencia a la desecación en el fondo de los charcos temporales que habitan (Berois et al., 2016). Los embriones experimentan hasta tres diapausas en su desarrollo durante el período de desecación (Berois et al., 2012; Podrabsky et al., 2001; Wourms, 1972). Cuando el charco vuelve a llenarse, los individuos eclosionan, y los alevines crecen y alcanzan la madurez sexual en pocas semanas, reproduciéndose de manera continua hasta el final del ciclo cuando el charco comienza a secarse (Simpson, 1979; Arezo et al., 2005; Berois et al., 2012) (Fig 1). El género *Austrolebias* comprende 48 especies válidas distribuidas entre la cuenca del Paraná-Plata y el sistema de lagunas costeras Patos-Merín en la región sudeste de Sudamérica (Loureiro y De Sá, 2016; Serra y Loureiro, 2018).

Austrolebias reicherti, es una especie endémica de los Humedales del Este de Uruguay, que se distribuye desde el Río Yaguarón hasta el Río Cebollatí en el Departamento de Treinta y Tres (Loureiro y García, 2008). Integra el grupo de especies *adloffii* y presenta una distribución en parapatría con *Austrolebias charrua*, especie hermana de divergencia reciente (García, 2006; García et al., 2004; Loureiro y García, 2006). Estas dos especies difieren en la coloración de los machos mientras las hembras son indistinguibles, a la vez que son capaces de generar híbridos fértiles (Passos, 2013) (Fig. 1).

Al igual que la mayoría de las especies del género, *A. reicherti* presenta un marcado dimorfismo sexual tanto en morfología como comportamiento. Los machos alcanzan mayores tamaños que las hembras y presentan coloración azul iridiscente, aletas fuertemente pigmentadas y un patrón de bandas verticales oscuras a lo largo del flanco, mientras las hembras son de coloración críptica amarronada (Loureiro y

García, 2008). Los machos de *A. reicherti* defienden territorios de desove del que excluyen a machos rivales, pero sin monopolización de las hembras (Tassino et al., 2017), y realizan elaborados despliegues de cortejo que culminan con el enterramiento de la pareja en el sustrato, donde ocurre la liberación de gametos (García et al., 2008). Las hembras eligen a los machos de mayor tamaño para aparearse, pero estas preferencias cambian a lo largo de la estación reproductiva concomitantemente con la disponibilidad de parejas en el charco: a medida que avanza la estación la proporción de machos disminuye y las preferencias de las hembras por machos de mayor tamaño se debilitan (Passos et al., 2014).

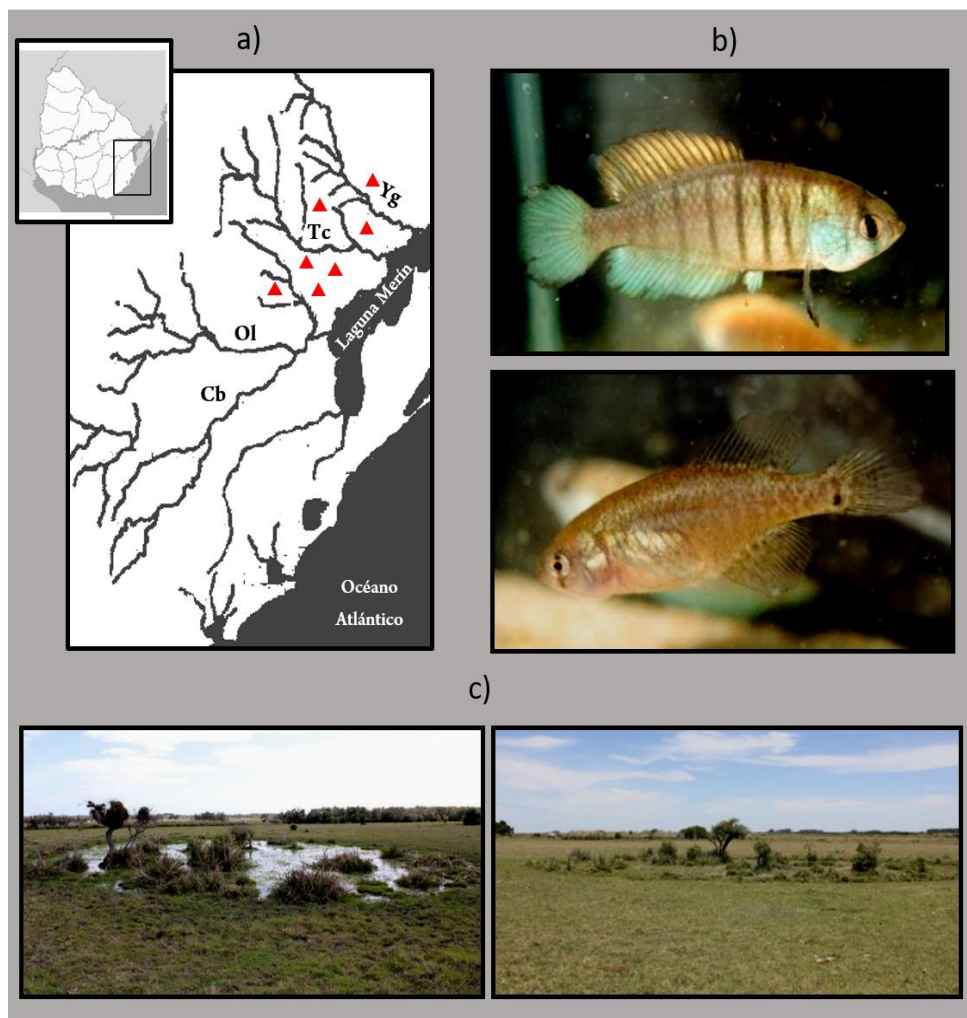


Fig. 1. a) Distribución geográfica de *A. reicherti* en los Humedales del Este en el Departamento de Treinta y Tres, Uruguay. Cb: Río Cebollatí, Ol: Río Olimar, Tc: Río Tacuarí, Yg: Río Yaguarón. b) Ejemplares adultos de *A. reicherti* macho (arriba) y hembra (abajo). c) Ambiente temporal típico de los peces anuales del género *Austrolebias* durante las estaciones de otoño-invierno (izquierda) y durante el período de desecación en primavera-verano (derecha).

Por su lado, los machos además de competir entre sí y defender territorios, también ejercen elección de parejas y prefieren a las hembras de mayor tamaño lo que en este caso es una clara señal de mayor fecundidad (Passos et al. en revisión). Por otro lado, si bien las señales visuales generadas por la coloración y despliegues de los machos juegan un rol importante en la comunicación (Passos et al., 2016), se ha documentado que las hembras responden a las señales químicas de potenciales parejas (Passos et al., 2013a). Además, mediante estas señales las hembras de *A. reicherti* son capaces de discriminar entre machos coespecíficos y machos de la especie hermana *A. charrua* (Reyes et al., 2018).

Si bien los peces anuales del género *Austrolebias* constituyen un modelo ampliamente explorado en diversas áreas, como biogeografía, genética de poblaciones, biología del desarrollo, neurociencias, ecología de comunidades y ecología del comportamiento (Berois et al., 2016), los estudios de las bases neuroendócrinas de la conducta son aún incipientes. Recientemente se ha abordado la relación entre estrés y reproducción con resultados que sugieren que el desempeño reproductivo en estos peces es tolerante o incluso promovido por elevados niveles plasmáticos de cortisol lo que constituye una inversión en el rol tradicional de esta hormona (Passos et al., 2017, Tassino et al., 2016). Sin embargo, aún no se ha explorado qué papel juegan las hormonas sexuales en el comportamiento de estos peces, en parte porque este abordaje implica importantes desafíos metodológicos.

El comportamiento agonístico en el género *Austrolebias* ha sido descrito por Passos et al. (2013b) para la especie *A. charrua*, cuyo comportamiento reproductivo es cualitativamente similar al de *A. reicherti* (Belote y Costa 2004, Passos, 2013). Los machos de *A. charrua* establecen interacciones agonísticas intensas que atraviesan fases de evaluación y contienda, de las cuales emergen relaciones de dominancia y subordinación, siendo el mayor tamaño un predictor consistente de la dominancia (Passos et al., 2013b). Una vez, resuelto el conflicto, los machos subordinados repliegan inmediatamente sus aletas y reducen drásticamente y en pocos segundos la intensidad de su coloración. Los machos dominantes por otra parte, mantienen una intensa coloración y las aletas extendidas (Passos et al., 2013b). Al igual que en *A. reicherti*, los machos dominantes defienden territorios que son limitantes para el apareamiento y desove de las hembras (Passos et al., 2013b, Passos et al., 2016). Experiencias de laboratorio con *A. reicherti* durante 5 días en acuarios con un área de puesta restringida y contexto social, demostraron que si bien se establece una jerarquía a partir de la cual uno de los machos excluye a los otros del área reproductiva, la permanencia sobre el territorio, y por lo tanto la dominancia, decrece con el transcurso de los días. Estos resultados indican que la dominancia no es estable a lo largo del tiempo posiblemente porque la exclusión territorial implica elevados costos energéticos que dificultan que se mantenga a largo plazo (Tassino et al., 2017). Por otro lado, los cambios demográficos en los charcos con el aumento de la proporción sexual a favor de

las hembras hacia el final de la temporada podrían modificar el contexto social de la competencia entre machos a lo largo de la estación reproductiva. El conjunto de estas condiciones favorece un escenario donde las interacciones agonísticas entre los machos son constantes y la jerarquía que se establece es muy dinámica.

En resumen, la anualidad genera presiones evolutivas extremas sobre las poblaciones que responden con adaptaciones del desarrollo, fisiológicas y comportamentales (Berois et al., 2016). La capacidad de reproducción continua durante toda su vida adulta y la selección sexual potente, que imponen un régimen de interacciones agonísticas intensas entre machos de las que emergen consistentemente individuos dominantes y subordinados con diferencias morfológicas y conductuales claras y medibles, sumado a los antecedentes específicos de estudios en elección de pareja y una relación no tradicional entre estrés y reproducción, convierten a *Austrolebias reicherti* en un modelo interesante y novedoso para estudiar las bases neuroendócrinas de la conducta agonística en su contexto ecológico.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La agresión es un comportamiento social ubicuo entre los animales que emerge como solución adaptativa a la competencia intraespecífica por recursos limitantes, principalmente el acceso a eventos reproductivos. Factores como el tamaño, la condición corporal, la experiencia previa o la residencia previa sobre el territorio influyen tanto en la estructura como el resultado del conflicto. Por otra parte, los esteroides sexuales, andrógenos y estrógenos, son importantes moduladores de esta conducta y que a su vez son modulados por las experiencias sociales. La historia de vida de los peces anuales impone un escenario de selección sexual intensa donde la competencia entre machos y los enfrentamientos agonísticos juegan un rol central en el éxito reproductivo de los individuos. Esta tesis se centra en la descripción de la conducta agonística entre machos en el pez anual *Austrolebias reicherti* y en el análisis de la regulación de dicha conducta por parte de los esteroides sexuales, andrógenos y estrógenos.

Hipótesis general

Los machos de *A. reicherti* establecen enfrentamientos agonísticos que culminan con el establecimiento de relaciones de dominancia y subordinación en las que el tamaño corporal y la residencia previa en el territorio afectan la estructura y el resultado de las contiendas. A su vez, la dominancia se encuentra asociada a altos niveles androgénicos mientras que la agresión es modulada por los estrógenos

En particular, se plantean las siguientes hipótesis de trabajo:

- H1. El tamaño corporal afecta la probabilidad de dominancia
- H2. La asimetría en la residencia previa sobre el territorio afecta la estructura de las contiendas así como la probabilidad de dominancia.
- H3. La hormona 11-ketotestosterona (11KT) está asociada a un mayor nivel de agresión y sus niveles son mayores en los individuos ganadores respecto a los que pierden una contienda.
- H4. Los niveles circulantes de 11KT aumentan en ambos contendientes al atravesar un encuentro agonístico.
- H5. La vía estrogénica interviene en la modulación de la conducta agonística en *A. reicherti*.

Objetivo general: Caracterizar la conducta agonística entre machos de *A. reicherti* y evaluar el rol de los andrógenos y estrógenos en la conducta agonística y en la relación de dominancia y subordinación.

Objetivos específicos

1. Caracterización de la conducta agonística entre machos de *A. reicherti*.
 - a. Describir cualitativa y cuantitativamente la estructura de una interacción agonística diádica.
 - b. Evaluar el efecto del tamaño de los contendientes sobre el resultado de una interacción agonística diádica.
 - c. Evaluar el efecto de la residencia previa sobre el territorio sobre la estructura y resultado de una interacción agonística diádica.
2. Evaluar la asociación entre las hormonas esteroideas 11KT y 17 β -estradiol (E2) y el comportamiento agonístico de machos de *A. reicherti*
 - a. Evaluar la asociación entre el estatus social adquirido durante un enfrentamiento agonístico diádico y el nivel circulante de 11KT y E2.
 - b. Evaluar la relación entre el nivel de agresión y los niveles de 11KT y E2.
 - c. Evaluar el efecto de la inhibición de la síntesis de estradiol sobre la modulación del comportamiento agonístico.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL

Para describir la conducta agonística de *A. reicherti* y analizar los factores que afectan su dinámica temporal, así como explorar el rol de andrógenos y estrógenos en su regulación se siguió una estrategia experimental consistente en dos etapas. La primer etapa consistió en el desarrollo de encuentros agonísticos diádicos entre machos adultos sin experiencia social con una asimetría en su tamaño, bajo dos protocolos conductuales diferentes: arena neutra y residente-intruso. A partir de dichos ensayos se cuantificó el comportamiento y se obtuvieron muestras de plasma de los individuos ganadores, perdedores, así como de individuos que no participaron del encuentro agonístico, con el fin de cuantificar los niveles circulantes del andrógeno 11KT y el estrógeno E2. La segunda etapa consistió en el desarrollo de encuentros agonísticos diádicos entre machos, bajo uno de dos tratamientos: i) administración del fármaco Fadrozole, inhibidor de la enzima aromatasa, ii) administración de la solución vehículo (control).

CAPÍTULO I

Caracterización de la conducta agonística

Para realizar la caracterización de la conducta agonística se siguieron los siguientes objetivos

- > Describir cualitativa y cuantitativamente la dinámica temporal de las interacciones agonísticas de *A. reicherti*
- > Evaluar la influencia de las asimetrías entre los machos en peso, largo y condición corporal sobre en la dinámica y el resultado de un encuentro agresivo.
- > Evaluar el efecto de la residencia previa en el territorio sobre la dinámica de la contienda
- > Evaluar la relación entre el comportamiento exhibido y el estatus social adquirido

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Se utilizaron un total de 64 ejemplares macho adultos de *Austrolebias reicherti* criados en el acuario de Facultad de Ciencias bajo condiciones de temperatura constante (19°C) y fotoperiodo natural. Los individuos se mantuvieron durante su etapa larval en tanques grupales (densidad: 2 ind./L) y una vez alcanzada la madurez sexual, fueron alojados en peceras individuales visualmente aisladas conteniendo 2 L de agua de clorada. Los animales fueron alimentados a en su etapa larval con *Artemia salina* y en su etapa juvenil y adulta con *Tubifex tubifex* ad libitum. El agua de los acuarios fue renovada parcialmente cada 48 horas. El protocolo experimental fue aprobado por la CEAU de Facultad de Ciencias (número de expediente 240011-002308-14). Se trabajó con animales de 5 y 6 meses de edad. Algunos de ellos recibieron una experiencia social previa, luego de la cual se esperó 2 meses para ser utilizados en experimentos conductuales.

Ensayos conductuales

Se realizaron encuentros agonísticos diádicos ($n = 32$) entre machos con una asimetría de largo y peso de $6,9 \pm 4,0 \%$ y de $21,4 \pm 4,9 \%$ respectivamente (media $\pm$ ds) enfrentando animales de igual edad. Se utilizaron ejemplares de peso y largo estándar de $1,88 \pm 0,4$ g y $4,28 \pm 0,27$ cm respectivamente (media $\pm$ ds). Para evaluar el efecto de la residencia previa sobre la dinámica de la contienda se realizaron ensayos bajo dos protocolos comportamentales: i) arena neutra (AN, $n=17$): ambos individuos fueron colocados en simultáneo en el acuario experimental; ii) residente-intruso (RI, $n=15$): el macho de mayor

tamaño (i.e. mayor peso y largo) fue colocado en el acuario experimental la noche anterior al test y el macho de menor tamaño fue colocado al momento del test. La asignación de los machos al protocolo AN o RI fue realizada al azar. No hubo diferencias significativas en la asimetría de tamaños de las díadas asignadas a cada protocolo (largo: Test de t , $t=0,60$, $p = 0,56$; peso: Test de Wilcoxon: $W = 126$, $p = 0,97$). Las contiendas se llevaron a cabo en acuarios de dimensiones 40 x 13 x 15 cm (largo x ancho x altura), divididos a lo largo en dos compartimientos iguales por una compuerta opaca removible, y con un piso homogéneo de turba (Fig. 2). En ambos protocolos, los animales tuvieron 10 min de aclimatación previo al levantamiento de la compuerta. En el protocolo RI, la compuerta fue colocada al momento de introducir al macho intruso y los machos residentes fueron agitados brevemente con la red de mano para igualar el estrés provocado al macho intruso durante el traspaso a la pecera experimental. Una vez removida la compuerta, se registró el comportamiento de la díada durante 60 min de interacción. La resolución del conflicto se estableció como el momento en que uno de los machos mostró comportamiento de sumisión (i.e. huida y pérdida de la coloración corporal) sin reversión posterior de la dominancia (Passos et al 2013b). Finalizados los ensayos conductuales, los animales fueron procesados para la obtención de muestras de plasma para la cuantificación hormonal (Capítulo II). Todas las experiencias fueron realizadas en la estación experimental de la Sección Etología de Facultad de Ciencias, entre las 10:00 y las 16:00 hs bajo condiciones de luz artificial cálida (SMD LED Flexible Strips) y temperatura constante (19°C). El traslado de los animales del lugar de mantenimiento a la estación experimental se realizó el día previo al momento del test.

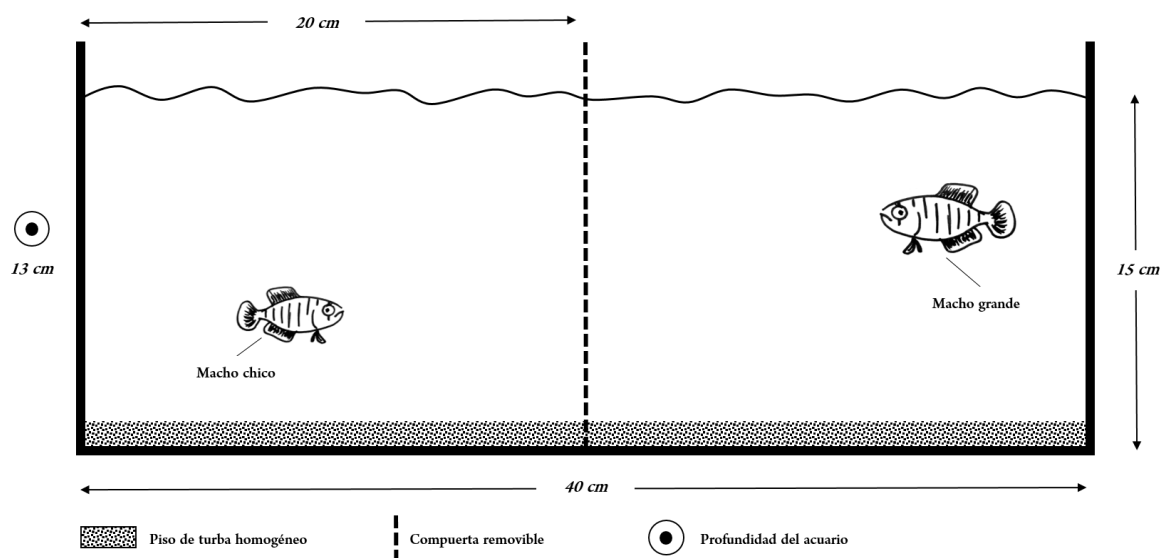


Fig. 2. Sistema de experimentos conductuales de interacción diádica macho-macho. Acuario de 40 x 13 x 15 cm (largo x ancho x altura) dividido a lo largo por una compuerta removible (opaca y no estanca), con un piso de turba homogéneo. Protocolo arena neutra: los individuos fueron colocados en simultáneo y dejados aclimatar por 10 min previo al levantamiento de la compuerta. Protocolo residente-intruso: el macho residente (grande),

fue colocado la noche anterior y el macho intruso (chico) colocado 10 min previo al levantamiento de compuerta (el macho residente fue agitado levemente con la red de mano para igualar picos de estrés entre residentes e intrusos).

Procesamiento de datos conductuales

A partir de los videos registrados, se cuantificó el comportamiento mediante el software J-Watcher versión 1.0. Las unidades conductuales fueron identificadas a través ensayos preliminares a partir de las descritas para *A. charrua*: ataques, despliegue lateral, despliegue sigmoide, despliegue lateral con contacto, y sumisión (Passos et al 2013b). Se cuantificó la ocurrencia de estas unidades comportamentales para: A) los primeros 5 min luego del primer despliegue agonístico (ataque o despliegue de amenaza) de la díada, B) los 5 min previos a la resolución de la contienda, C) los primeros 5 min pos-resolución y D) los 5 min previos a la extracción de la sangre (Fig. 3), y se calculó la tasa de despliegues totales, ataques y despliegues laterales para el período pre-resolución (A + B) y pos-resolución (C + D). Además, se registró la latencia al primer despliegue, ataque y al momento de la resolución del conflicto (M_{resol}). Se definieron las etapas de la contienda de acuerdo a Batista et al., (2012) y Passos et al., (2013b) en: 1) evaluación: desde el levantamiento de la compuerta hasta la ocurrencia del primer ataque de la díada; 2) contienda: desde la ocurrencia del primer ataque de la díada hasta M_{resol} ; y 3) pos-resolución: a partir del momento de resolución del conflicto. En cada una de estas ventanas de análisis se la tasa cuantificó para cada individuo, i) el número de despliegues agresivos de cada unidad conductual, ii) la latencia al primer despliegue agonístico, iii) la latencia al primer ataque. Para cada díada se cuantificó asimismo: la duración de la evaluación (latencia al primer ataque de la díada) y vi) la duración de la contienda. Aquellas díadas cuyo tiempo a la resolución del conflicto (evaluación + contienda) excedió los 50 min, fueron excluidas del análisis. Se calculó el índice de condición corporal de Fulton (K) como $100 \times \text{Peso} / (\text{Largo estándar})^3$, siendo el peso expresado en gramos y el largo en centímetros.

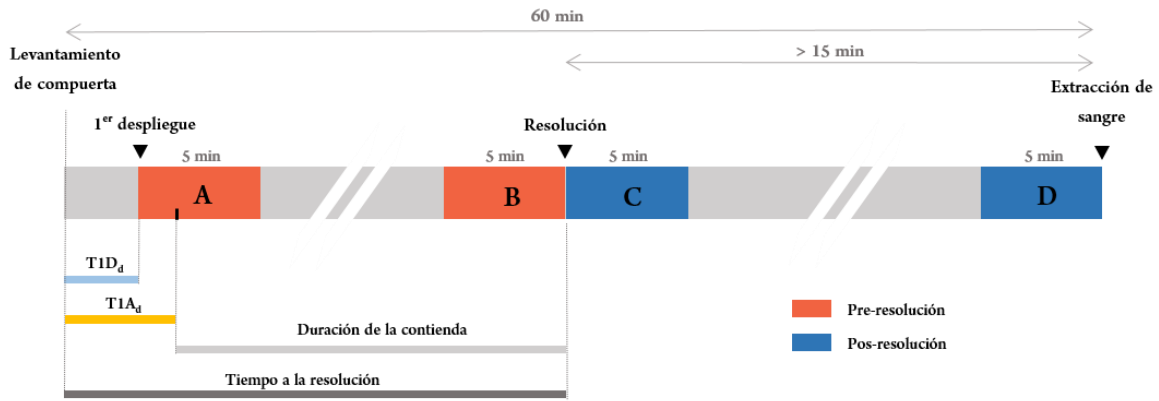


Fig. 3. Períodos para los cuales se cuantificó el comportamiento agonístico. Se analizaron 10 min pre-resolución (área anaranjada) considerando los primeros 5 min luego del primer despliegue (A) y los 5 min previos al momento de la resolución (M_{resol}) (B), y 10 min pos-resolución (área azul), considerando los primeros 5 min luego de M_{resol} (C) y los 5 min previos a la extracción de sangre (D). A su vez, se registró la latencia al primer despliegue, latencia al primer ataque (i.e. duración de la evaluación), duración de la contienda (desde primer ataque a M_{resol}) y el tiempo a la resolución (desde el levantamiento de compuerta a M_{resol}).

Análisis estadístico

Para evaluar el efecto del tamaño (mayor largo y peso) sobre el resultado de la contienda, se realizó un test binomial para poner a prueba la hipótesis de que la proporción de ganadores grandes fue distinta de 0.5. De manera complementaria, se ajustó una regresión logística utilizando un modelo lineal generalizado (GLM), para modelar la probabilidad de ganar la contienda de acuerdo a la asimetría en peso, largo y condición corporal entre los contendientes. Para evaluar diferencias en el comportamiento entre los individuos grandes y chicos de cada diada se realizaron test de t de muestras pareadas, cuando los supuestos de normalidad fueron cumplidos, y se ajustaron GLM mixtos (GLMM) con la variable diada como efecto aleatorio, en caso inverso. Para evaluar la relación entre medidas morfométricas de los individuos y el tiempo a la resolución, así como para evaluar la correlación entre el comportamiento de dominantes y subordinados, se ajustaron regresiones lineales simples. Para todos los GLM, se realizó un análisis visual de los residuales para evaluar la normalidad y homogeneidad de varianza en el espacio de la función de conexión g , se evaluó la normalidad de los residuales por el test de Shapiro-Wilk, y se evaluó su calidad de ajuste mediante el AIC. A menos que se indique lo contrario, los datos son expresados como media $\pm$ ee (error estándar). Todos los análisis fueron hechos en el software R versión 3.5.2.

RESULTADOS

Se analizaron 24 interacciones diádicas macho-macho, 17 en protocolo arena neutra (AN) y 7 en protocolo residente-intruso (RI), en las que se identificaron las unidades conductuales ataque, despliegue lateral, despliegue lateral con contacto, despliegue sigmoide, giro y sumisión descritas en Passos et al., (2013b) para *Austrolebias charrua* (Tabla 1, Fig. 4). Se describió asimismo la unidad conductual *ronda*, si bien no fue considerada en el análisis de datos. En todos los experimentos analizados las parejas establecieron contiendas, las cuales fueron resueltas en su totalidad, estableciéndose un dominante (ganador del conflicto) y un subordinado (perdedor del conflicto).

Tabla 1. Unidades conductuales de la interacción agonística diádica macho-macho en *A. reicherti*, clasificadas en despliegues ofensivos (ataques y despliegues de amenaza) y despliegues de sumisión.

Despliegues ofensivos	Ataques	Ataque	Embates bruscos contra el oponente con la cabeza o el flanco
		Mordida	A menudo dirigidas a las aletas. Ocasionalmente puede sostenerse hasta que el oponente se libera.
	Despliegues de amenaza	Despliegue lateral	El individuo orienta su flanco hacia el receptor y hace vibrar su cuerpo rápidamente con las aletas completamente extendidas.
		Despliegue lateral con contacto	Ambos machos en contacto en posición paralela o anti-paralela realizando despliegue lateral (arriba). Ocasionalmente puede extenderse por varios segundos o minutos.
		Despliegue sigmoide	El individuo contornea su cuerpo hacia un lado y otro en forma brusca.
		Ronda	Ambos machos giran repetidamente en torno a un mismo eje.
Despliegues de sumisión		Huida	Nado rápido alejándose del oponente hacia los bordes del acuario que usualmente señala la resolución del conflicto.
		Apagado de la coloración	Perdida de la pigmentación en cuerpo y aletas quedando de color pálido. Suele ocurrir pocos segundos luego del momento de la resolución del conflicto (primer huida).
		Repliegue de aletas	Repliegue de la aleta dorsal y anal. Suele acompañar el momento de resolución del conflicto.



Fig. 4. Unidades comportamentales observadas durante los encuentros agonísticos diádicos macho-macho en *A. reicherti* durante el período pre-resolución (a y b) y pos-resolución (c) del conflicto: a) despliegue lateral con contacto: los machos se colocan en posición paralela o antiparalela, b) ataque, ocasionalmente culmina en una mordida con agarre, c) comportamiento de sumisión exhibido por el macho subordinado.

La media global para la latencia al primer despliegue fue de 97 ± 97 seg, en un rango entre 8 y 369 y una mediana de 51 seg; la duración del período de evaluación (latencia al primer ataque de la díada) fue de 208 ± 174 seg, en un rango entre 25 y 717 y una mediana de 175 seg. La duración de las contiendas fue de 1406 ± 736 seg, en un rango entre 69 y 2826, siendo la mediana de 1644 seg (Fig. 5). La residencia previa no afectó la dinámica de la contienda (Latencia al primer despliegue: GLM Gamma, $F = 0,63$, $p = 0,44$; Duración de la evaluación (latencia al primer ataque): GLM Gamma, $F = 1,12$, $p = 0,30$; Duración de la contienda: GLM Gauss, $F = 1,74$, $p = 0,20$). En la tabla 2 se resumen la latencia al primer despliegue, latencia al primer ataque, duración de la contienda y frecuencia de despliegues para los protocolos AN y RI junto a los test estadísticos respectivos.

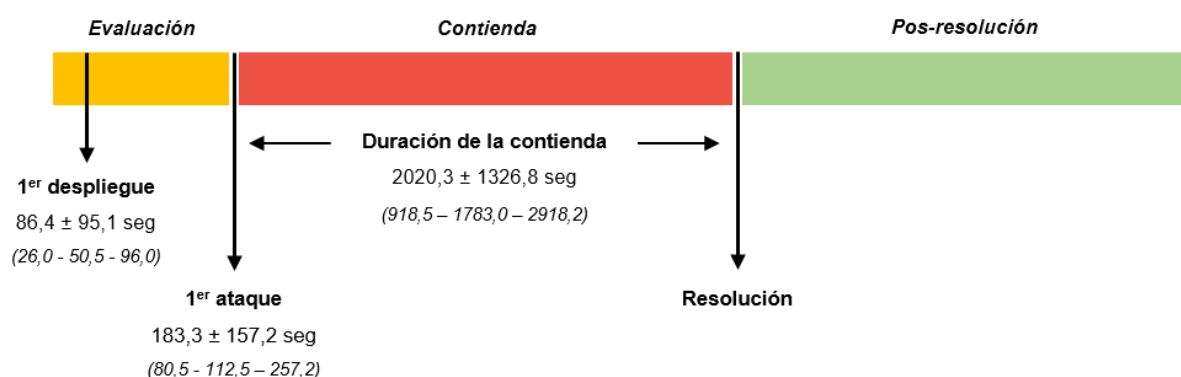


Fig. 5 Dinámica temporal de las interacciones agonísticas macho-macho en *Austrolebias reicherti*. Se indican el tiempo al primer despliegue desde la apertura de compuerta, la duración de la evaluación (latencia al primer ataque de la díada, amarillo) y duración de la contienda (rojo). La resolución del conflicto fue determinada por el momento en que uno de los machos muestra comportamiento de sumisión (huye, repliega sus aletas y apaga su coloración). Media $\pm$ ds, y debajo entre paréntesis (itálica), primer cuartil - mediana - tercer cuartil; $n = 32$.

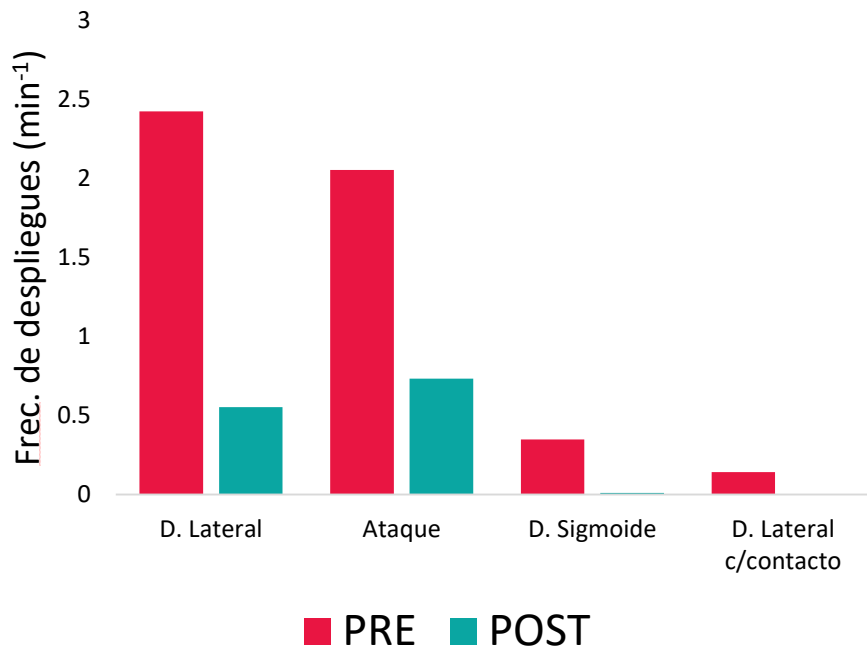


Fig. 6. Tasa media de las unidades comportamentales más frecuentes exhibidas durante los períodos pre (rojo) y pos-resolución (verde). En orden decreciente de frecuencia: despliegue lateral, ataque, despliegue sigmoide y despliegue lateral con contacto. Las tasas pre-resolución corresponden al promedio entre ambos machos de la diada. El total de los despliegues ofensivos post-resolución son realizados por los individuos dominantes.

Tabla 2. Parámetros de la interacción agonística diádica en Arena neutra y Residente-intruso

	Arena neutra n = 17	Residente – Intruso n = 7	<i>p</i> -valor	<i>F</i>	~ε *
Latencia al primer despliegue (seg)	107 ± 26	74 ± 29	0,44	0,63	Gamma
Duración de la evaluación (seg)	229 ± 47	155 ± 37	0,30	1,12	Gamma
Duración de la contienda (seg)	1281 ± 169	1710 ± 300	0,20	1,74	Gauss
Tasa de despliegues totales pre-resolución (min ⁻¹)	5,81 ± 0,54	3,72 ± 1,04	\$ 0,04	4,84	Gauss
Tasa de ataques pre-resolución (min ⁻¹)	2,45 ± 0,29	1,46 ± 0,21	0,06	3,81	Gauss
Tasa de ataques post-resolución (min ⁻¹)	0,92 ± 0,21	0,50 ± 0,18	0,20	1,75	Gamma

Media ± SE

* Distribución de errores del GLM

\$ Diferencia significativa

Las unidades comportamentales más frecuentes fueron el despliegue lateral y los ataques, representando entre ambas unidades, el 89% de los despliegues realizados durante el período pre-resolución y el 99% de los despliegues pos-resolución (Fig. 6). Durante el período pre-resolución, la tasa media de despliegues agresivos totales y de ataques fue de $5,3 \pm 2,1 \text{ min}^{-1}$ y $2,2 \pm 1,1 \text{ min}^{-1}$ (media ± ds)

respectivamente. Durante el período pos-resolutivo, únicamente los dominantes exhibieron conductas ofensivas siendo la tasa de despliegues totales de $1,4 \pm 1,2 \text{ min}^{-1}$, y la tasa de ataques de $0,8 \pm 0,8 \text{ min}^{-1}$ (media $\pm$ ds). La residencia previa redujo significativamente la tasa de despliegues totales y marginalmente la tasa de ataques pre-resolución (Tasa de despliegues totales pre-resolución: GLM Gauss, $F = 4,84$, $p = 0,04$; Tasa de ataques pre-resolución: GLM Gauss, $F = 3,81$, $p = 0,06$), mientras que no afectó la tasa de ataques pos-resolución (GLM Gamma, $F = 1,75$, $p = 0,20$) (Tabla 2).

Relación entre la asimetría en RHP y dinámica y resultado de la contienda

En el 83% de los encuentros, el macho de mayor peso y largo (i.e. mayor tamaño) resultó ganador de la contienda (20/24, Test binomial: $p < 0,001$). La residencia previa no afectó la probabilidad de los individuos grandes de resultar ganadores (Arena Neutra: 14/17, Residente-Intruso: 6/7, Test de Fisher: $p = 1$).

Tanto la asimetría relativa en el peso como en el largo entre los machos de cada día, afectaron la probabilidad del macho de mayor tamaño de ganar la contienda. A mayor asimetría respecto al peso y al largo, mayor la probabilidad de ganar la contienda (regresión logística: Δ peso: $z = 3.30$, $p < 0,001$, $R^2 = 0,39$; Δ LS: $z = 2,93$, Fig. 7a, $p < 0,01$, $R^2 = 0,42$, Fig. 7b). Sin embargo, la asimetría en la condición corporal no mostró relación significativa con la probabilidad de dominancia (regresión logística: Δ CC: $z = 0,19$, $p = 0,85$).

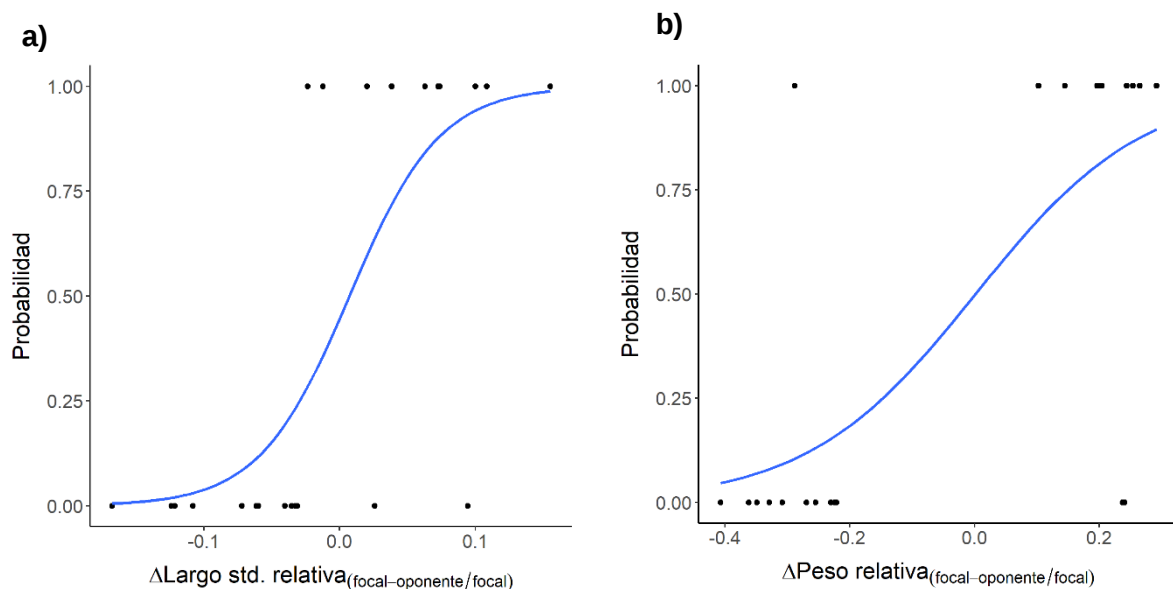


Fig. 7. Relación entre la asimetría relativa (focal-oponente/focal) en largo (a) y peso (b) y la probabilidad de resultar dominante. Análisis realizado sobre datos independientes asignando aleatoriamente uno de los machos de cada día como macho focal. (Regresión logística: Δ Peso: p -valor $< 0,001$, $n=24$; Δ LS: p -valor $< 0,01$, $n=24$).

Los machos grandes y chicos (tanto en largo como en peso) de cada día no difirieron en su latencia al primer despliegue (GLMM, $t = 0,56$, $p\text{-valor} = 0,57$, Fig 8a, Tabla 3), pero sí en la latencia al primer ataque (GLMM, $t = 3,06$, $p\text{-valor} < 0,001$, Fig 8b, Tabla 3). En 17 de 24 (71%) de las contiendas, ésta fue iniciada por el macho de menor tamaño (Test Fisher, $p < 0,001$).

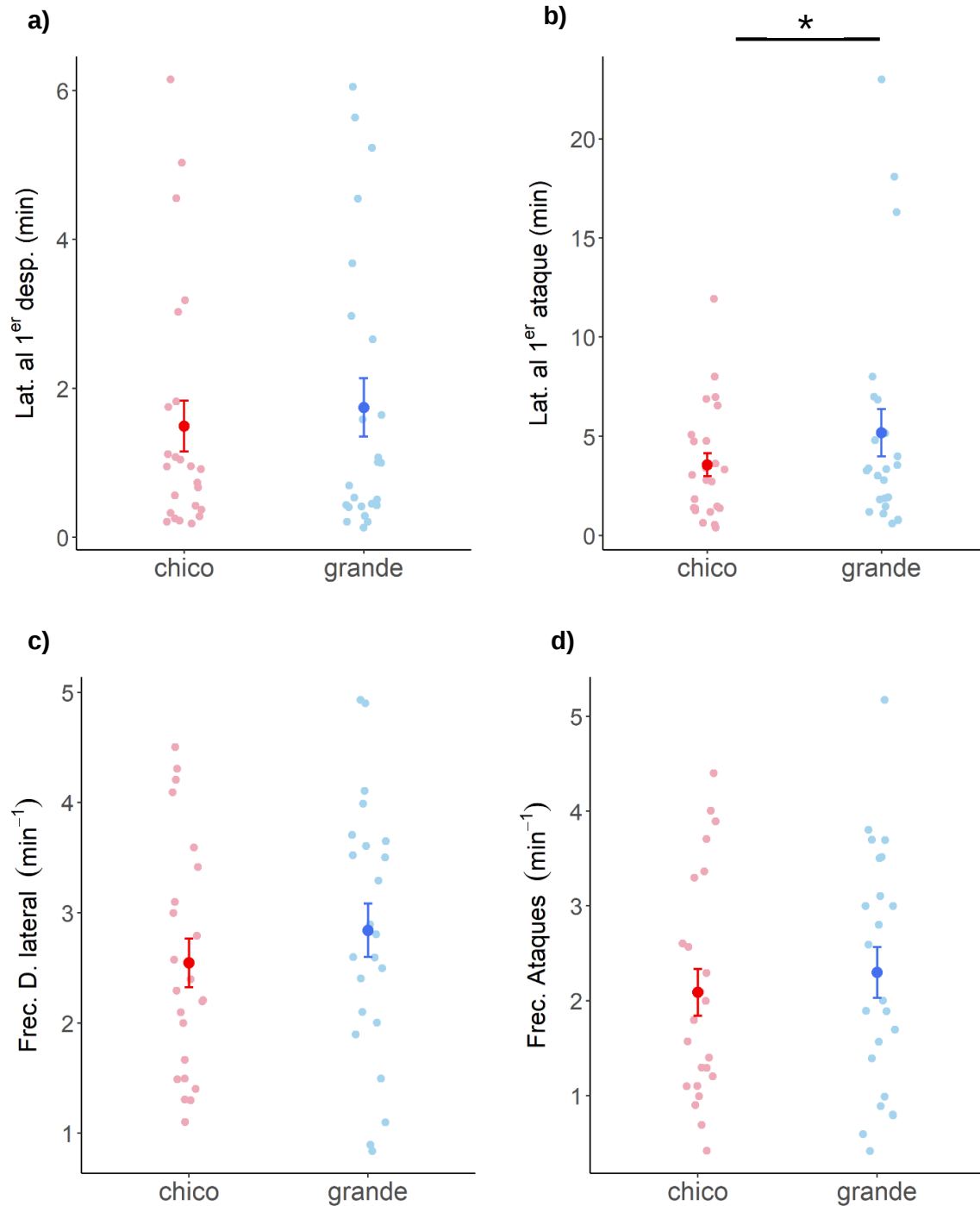


Fig. 8. a) Latencias al primer despliegue y b) primer ataque, c) frecuencia de despliegues laterales pre-resolución y d) frecuencia ataques pre-resolución de los machos chicos (rojo) y grandes (azul) de cada día. Se muestran la Media $\pm$ SE (Análisis pareado por GLMM, * $p\text{-valor} < 0,001$).

Por otro lado, el nivel de agresividad previo a la resolución del conflicto fue similar entre los machos chicos y grandes de cada día (Despliegues laterales, Test de *t* pareado: $t = -1,36$, $p = 0,19$; ataques: Test de *t* pareado: $t = -1,09$, $p = 0,29$, Fig. 8c, 8d, Tabla 3).

Tabla 3. Comportamiento agonístico de machos chicos y grandes de cada día previo a la resolución del conflicto.

	Chico	Grande	<i>p</i> -valor	<i>t</i>	~ε
Latencia al primer despliegue (seg)	90 ± 21	105 ± 23	0,56	0,56	Gamma
Latencia al primer ataque (seg)	214 ± 35	311 ± 72	* 0,002	3,06	Gamma
Tasa de Despliegues Laterales pre-resolución (min ⁻¹)	2,55 ± 0,22	2,84 ± 0,24	0,19	-1,36 [§]	-
Tasa de ataques pre-resolución (min ⁻¹)	2,09 ± 0,25	2,30 ± 0,27	0,29	-1,09 [§]	-

Los valores se muestran como Media ± SE

~ε Distribución de errores del GLMM colocando la identidad de la día como factor aleatorio, § Test de *t* pareado.

* Diferencia significativa

Relación entre RHP y Duración del conflicto

No se detectó relación entre la asimetría en peso, largo estándar o condición corporal y la duración del conflicto (Correlación de Pearson, $df = 22$: Peso: $t = -0,94$, p -valor = 0,36; Largo: $t = 0,06$, p -valor = 0,95; Condición corporal: $t = -1,60$, p -valor = 0,12). No se detectó relación entre peso, largo (datos no mostrados) o condición corporal (Fig. 9b y 9c) de dominantes o subordinados y el tiempo a la resolución del conflicto (Cond. corporal x Duración conflicto, Correlación de Pearson, $n = 24$, DOM: $t = -1,18$, $df = 22$, p -valor = 0,25, Fig. 9b; SUB: $t = 0,58$, $df = 22$, p -valor = 0,57, Fig. 9c).

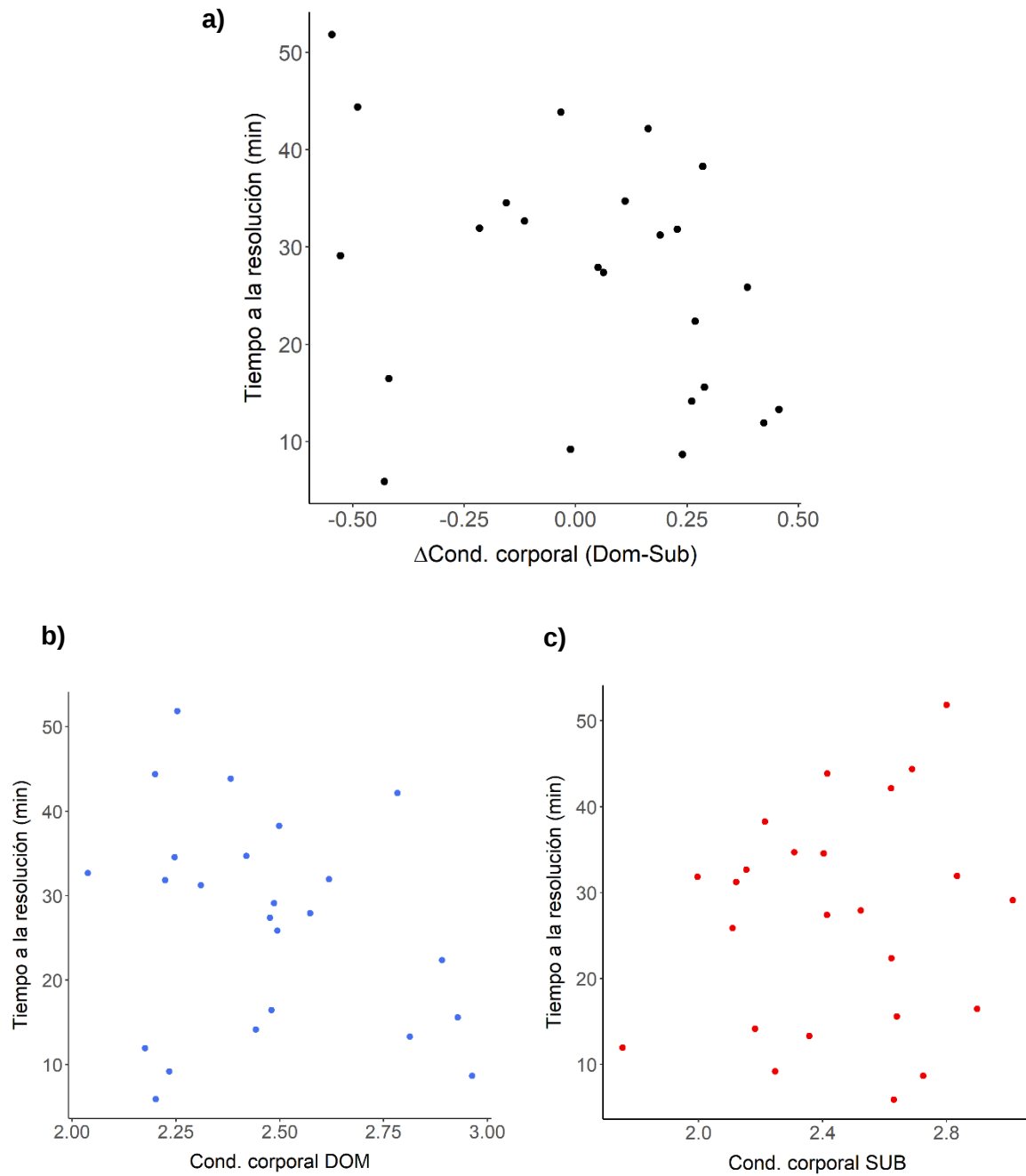


Fig. 9. a) Relación entre la asimetría en tamaño (condición corporal) y la duración del conflicto. b) Relación entre la condición corporal de los dominantes y la duración del conflicto. c) Relación entre la condición corporal de los subordinados y la duración del conflicto. Ninguna de las correlaciones fue significativa.

El comportamiento de dominantes y subordinados presentó una fuerte correlación positiva durante el período pre-resolución tanto en el número de despliegues laterales (Correlación de Pearson, $df = 21$, $t = 3,03$, $p < 0,01$, $R^2 = 0,55$, Fig. 10a), como de ataques (Correlación de Kendall, $df = 21$, $t = 6,00$, $p < 0,001$, $R^2 = 0,79$, Fig. 10b).

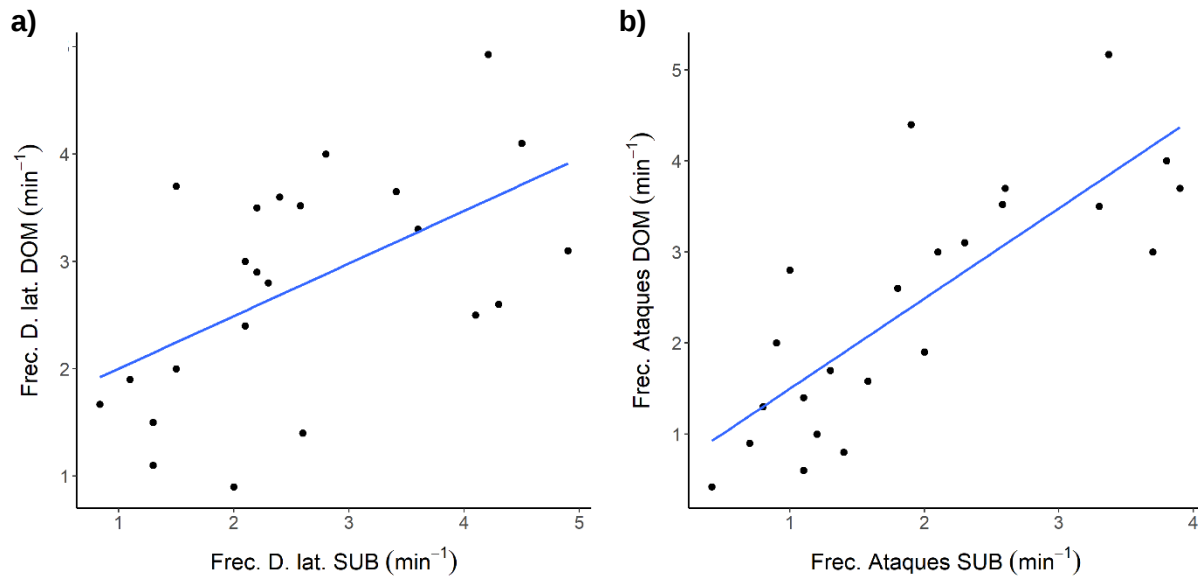


Fig. 10. Relación entre el comportamiento de dominantes y subordinados previo a la resolución del conflicto. a) Despliegues laterales, b) ataques. Regresión lineal significativa (línea azul): a) $R^2 = 0,55$, $p < 0,01$, b) $R^2 = 0,79$, $p < 0,001$.

CAPÍTULO II

Regulación hormonal de la conducta agonística

Para evaluar el rol de los esteroides sexuales en el comportamiento agonístico de *A. reicherti*, se plantearon los objetivos en base a dos abordajes experimentales:

- > Determinar los niveles hormonales plasmáticos de 11-ketotestosterona (11KT) y 17 β -estradiol (E2) en machos que resultaron dominantes y subordinados en un conflicto agonístico, así como en machos que no atravesaron dicha experiencia social.
- > Evaluar el efecto de la administración del fármaco Fadrozole, un inhibidor específico de la enzima aromatasa, sobre el comportamiento agonístico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Se utilizaron 87 machos adultos de *Austrolebias reicherti* criados en el acuario de Facultad de Ciencias bajo condiciones de temperatura constante (19°C) y fotoperiodo natural. Durante la etapa larval los individuos se mantuvieron en tanques grupales (densidad: 2 ind./L) y se alimentaron con *Artemia salina* y, una vez alcanzada la madurez sexual, se alojaron en peceras individuales visualmente aisladas, y se cambió el alimento por *Tubifex tubifex* ad libitum. El agua de los acuarios fue renovada parcialmente cada 48 horas. El protocolo experimental fue aprobado por la CEAU de Facultad de Ciencias (número de expediente 240011-002308-14). Los experimentos de la primer etapa (cuantificación hormonal) se realizaron con animales de entre 5 y 6 meses de edad, y si bien algunos de ellos tuvieron una experiencia social previa, se esperó al menos 2 meses para utilizarlos en los experimentos. Los experimentos de la segunda etapa (manipulación farmacológica), se realizaron con animales de 3 meses de edad.

2.1 Relación entre el comportamiento agonístico y los niveles plasmáticos de 11-ketotestosterona y 17 β -estradiol

Ensayos conductuales y obtención de muestras

Para obtener muestras de machos dominantes (ganadores de un enfrentamiento agonístico), subordinados (perdedores de un enfrentamiento agonístico), se realizaron encuentros agonísticos diádicos ($n = 17$) entre machos con una asimetría de largo y peso de $7,2 \pm 4,0$ % y de $21,9 \pm 5,2$ % respectivamente (media $\pm$ ds) enfrentando animales de igual edad. Para la cuantificación de 11KT y E2, se realizaron 8 y 9 ensayos de interacción diádica respectivamente todos bajo un protocolo de arena neutra (AN). Los ensayos conductuales fueron realizados de acuerdo al protocolo conductual detallado en el capítulo I y sobre el mismo sistema experimental (Fig. 2). En breve: Una vez ambos machos fueron colocados en el acuario experimental, los animales tuvieron 10 min de aclimatación previo al levantamiento de la compuerta, momento en que se inició el registro del comportamiento por 60 min. En este caso, los enfrentamientos cuyo tiempo de resolución del conflicto excedió los 45 min, no fueron considerados en el análisis. A su vez, se obtuvieron muestras de plasma de machos que no pasaron un enfrentamiento agonístico (tratamiento control). Los animales sometidos al tratamiento control, atravesaron el mismo protocolo conductual previamente detallado, pero sin enfrentarse a otro individuo. La asignación de los machos a la experiencia agonística o control fue realizada al azar, contemplando la homogeneidad en el rango de tamaños entre ambos grupos.

Cumplidos 60 min desde el levantamiento de compuerta, los individuos fueron retirados de la arena experimental, fotografiados y anestesiados (2-fenoxietanol, 0.5 ml/l) para colectar la sangre mediante amputación del pedúnculo caudal. La sangre fue colectada mediante capilares de hematocrito heparinizados y colocada a 4°C para su posterior centrifugación. El tiempo de manipulación entre el retiro del animal del agua y el fin de la colecta de sangre nunca superó los 3 min. Una vez finalizada la extracción de sangre, los animales fueron sacrificados mediante sobredosis de anestesia con 2-fenoxietanol (0.5 ml/l). Los machos perdedores del conflicto (i.e subordinados) fueron retirados siempre antes que los machos ganadores (i.e. dominantes) y la diferencia de tiempo entre las colectas de sangre de ambos machos fue nula no excedió en ningún caso los 5 min. Posteriormente la sangre de ambos machos fue centrifugada directamente en los capilares a 1500 G por 15 min, y el plasma colectado con jeringas de 0.5 ml y almacenado a -20°C para su posterior análisis. Las carcacas fueron procesadas para obtener el peso de la gónada y el peso total del ejemplar. Todas las experiencias fueron realizadas en la estación experimental de la Sección Etología de Facultad de Ciencias, entre las 10:00 y las 16:00 hs bajo condiciones de luz artificial cálida (SMD LED Flexible Strips) y temperatura constante

(19°C), intercalando experiencias control y agonísticas a lo largo del día. El traslado de los animales del lugar de mantenimiento a la estación experimental se realizó el día previo al momento del experimento.

La Tabla 4 resume el peso y largo de los individuos y asimetrías en tamaño de las díadas a partir las cuales se obtuvieron muestras de plasma para cuantificar ambas hormonas. A partir de 17 enfrentamientos diádicos y 17 individuos control se obtuvieron un total de 47 muestras de plasma. Se utilizaron 23 muestras para cuantificar 11KT y 24 para cuantificar E2 (Tabla 4).

Tabla 4. Número de experimentos realizados durante la Tesis a partir de los cuales se obtuvieron datos analizables. Se muestran el peso, largo y % de asimetría entre los machos utilizados en los experimentos de interacción diádica, así como el número de muestras de plasma obtenidas y efectivamente cuantificadas.

Ensayos conductuales diádicos										Muestras de plasma cuantificadas por ELISA				
Etapas experimental		Protocolo conductual	Tratamiento farmacológico	# ensayos	Peso (g)	Largo Estándar (mm)	Asimetría Peso (%)	Asimetría Largo (%)	Edad (meses)	Dom	Sub	Con	Tot	
CAPÍTULO I														
1	Descripción comportamiento agonístico	Arena Neutra		24	17	1,98 ± 0,46	42,5 ± 2,9	21,4 ± 5,7	7,3 ± 4,2	5-6	Se muestran en la secciones del CAPÍTULO II			
	Residente - Intruso				7	1,77 ± 0,28	43,2 ± 2,5	21,5 ± 4,1	6,4 ± 3,9	5-6				
CAPÍTULO II														
2.1.1	Cuantificación hormonal 11KT	Arena Neutra		17	8 *	2,27 ± 0,34	43,6 ± 2,0	19,8 ± 3,1	5,8 ± 3,2	6	8	7	8	23
2.1.2	Cuantificación hormonal E2	Arena Neutra			9	1,72 ± 0,38	41,4 ± 3,2	22,7 ± 7,3	8,6 ± 4,8	5	8	7 ⁽²⁾	9 ⁽⁸⁾	24
2.2	Manipulación farmacológica vía estrogénica	Arena Neutra	Fadrozole	18	10	1,58 ± 0,38	38,2 ± 3,2	20,9 ± 4,3	5,9 ± 4,0	3	-	-	-	
			Control		8	1,82 ± 0,37	40,4 ± 2,6	17,5 ± 4,3	5,8 ± 4,0	3	-	-	-	
Total de muestras de plasma cuantificadas en la Tesis: 47														

Media ± DS

* Subconjunto de los ensayos conductuales del Capítulo 1.

(^l) Superíndice entre paréntesis: número de muestras agrupadas (agrupando plasma de 2 individuos)

Cuantificación de niveles hormonales en plasma por ELISA

Para la cuantificación de los niveles de 11KT y E2 en muestras de plasma se utilizaron kits comerciales de Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron sometidas a un protocolo de extracción líquido-líquido con acetato de etilo. Este protocolo fue previamente utilizado para la cuantificación de cortisol en *A. reicherti* y *Gymnotus omarorum* (Jalabert et al., 2015; Passos et al., 2017). Previo a la extracción, las muestras fueron diluidas en el Buffer proporcionado por el fabricante, al doble de la dilución final de trabajo y las hormonas esteroideas fueron doblemente extraídas del plasma utilizando acetato de etilo en una proporción solvente:muestra (8:1). Las muestras fueron posteriormente evaporadas durante la noche en un baño de agua a 50 °C y reconstituidas en Buffer de ELISA a las diluciones de trabajo. Las diluciones de trabajo fueron de 1:100 para 11KT y 1:8 y 1:16 para E2. Todas las muestras fueron testeadas en duplicado y todos los grupos experimentales (dominantes, subordinados y controles) fueron incluidos en cada kit. Las placas de ELISA fueron leídas en un espectrofotómetro a 412 nm (Varioskan Flash, Thermo Scientific). Solo se consideraron las lecturas dentro del rango lineal del ensayo (80%B/B₀ - 20%B/B₀). El límite de detección para estos ensayos es de 1,3 pg/ml para 11KT y 6,6 pg/ml para E2. El coeficiente de variación intra-ensayo fue de 6,3% para 11KT y 9.5% para E2. El coeficiente de variación inter-ensayo fue calculado en base a una muestra agrupada de varios machos *A. reicherti* incluida en cada kit, siendo de 24,2% para 11KT y 5,9% para E2. La recuperación de la extracción se estimó en 67% para 11KT y 77% para E2. El ensayo de 11KT y E2 fue validado para *A. reicherti* evaluando el efecto matriz y el paralelismo entre la curva estándar log-transformada y 4 diluciones seriadas de dos muestras. Los coeficientes de regresión de las diluciones seriadas fueron de 0.82 y 0.83 para las muestras de 11KT y de 0.89 y 0.96 para las muestras de E2; las pendientes de estas rectas no mostraron ser significativamente diferentes de la curva estándar (11KT: Test de F para el coeficiente de la interacción entre las variables Factor de Dilución y Muestra: 11KT: p = 0.13; E2: p = 0.66). El efecto matriz se evaluó mediante el % de recuperación de una cantidad conocida de hormona (standard) añadida a una muestra o “spike”, calculado como: $100 \times (\text{Lectura}_{\text{muestra} + \text{spike}} - \text{Lectura}_{\text{muestra}}) / \text{Lectura}_{\text{spike}}$. El % de recuperación del spike fue de 94,3% para 11KT y de 78,5% para E2. Para la validación de la técnica se utilizaron muestras de plasma de ejemplares macho adultos de *A. reicherti*. Debido al pequeño tamaño de los ejemplares de *A. reicherti*, algunas muestras debieron ser agrupadas para alcanzar el nivel de sensibilidad del kit de E2. Las muestras fueron agrupadas de acuerdo al estatus social adquirido durante el encuentro agonístico (dominantes, subordinados, o controles), respetando el protocolo conductual (arena neutra/residente-intruso) y considerando el peso de los animales. Para las muestras agrupadas, los valores de las variables morfométricas y conductuales de los individuos conformantes de cada pool, fueron ponderados por la

resultar ganador o perdedor sobre los niveles hormonales, se ajustó un modelo lineal generalizado con varianza estructurada por nivel del factor estatus (i.e. control, dominante, subordinado). Para evaluar diferencias entre dominantes y subordinados de una misma díada se realizó un test pareado. Debido a la naturaleza pareada de los datos, la correlación entre los niveles hormonales y parámetros de la conducta agonística se realizó de manera independiente para dominantes y subordinados. A menos que se indique lo contrario, los datos son expresados como media $\pm$ se (error estándar). Todos los análisis fueron hechos en el software R versión 3.5.2.

Puesta a punto de la técnica de cuantificación hormonal por Cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas (GCMS)

Se cumplieron diferentes etapas, desarrollados en paralelo, para la puesta a punto en la medición de hormonas esteroides por cromatografía de gases/espectrometro de masas (GCMS, Shimadzu QP 2010 Ultra, columna Agilent HP-5ms, 0.25 μ m x 30 m x 0.25 d.i). Esta técnica permite la cuantificación de múltiples compuestos en una sola muestra, utilizando hormonas marcadas con deuterio como standards internos. En líneas generales la puesta a punto se centró en diseñar una correcta extracción de las hormonas de la matriz plasmática, una apropiada volatilización de las hormonas de interés, la separación cromatográfica de las hormonas de interés, la identificación inequívoca de éstas y su cuantificación confiable.

a) Derivatización (volatilización).

Los esteroides son compuestos de volatilidad irregular a las temperaturas de trabajo en el GCMS. Esto impone un tratamiento con productos que aumenten su volatilización. Esto se logró derivatizando la muestra mediante la adición de grupos sililos. Se ensayaron tres productos: (N-trimethylsilylimidazole (TMSI, Sigma), N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA, Sigma), Silylating mixture Fluka III, en diferentes condiciones de: relación derivatizante/hormona, tiempo de reacción y temperatura de derivatización. Al cabo de las diferentes pruebas se decidió por el uso de MSTFA en una proporción derivatizante:muestra de 83:16, durante al menos 4 horas a temperatura ambiente.

b) Identificación de tiempos de retención y espectro de masa de las hormonas estándar y deuteradas (standar internos).

Se usaron 4 hormonas standar (17 β -estradiol, 11-ketotestosterona, testosterona y dihidroepiandrostenediona) y dos standar internos deuteradas (Estradiol-d, Testosterona-d). En cada hormona se obtuvo el espectro de masa (distribución de iones por relación masa-carga) y se identificó el pico base (ion de mayor intensidad con el que se cuantifica) y se

usaron al menos 4 iones característicos adicionales, que no se repiten en las otras hormonas (ejemplos de estradiol y 11-KT, Figura 12).

c) Generación del protocolo de inyección y condiciones cromatográficas.

Se pusieron a punto las rampas de temperatura, tipo de inyección, modo de inyección (manual o automático), y cantidad de muestra inyectada.

d) Curvas de repetitibilidad y sensibilidad con standards en acetona.

Se realizaron curvas de dilución en concentraciones decrecientes (Fig. 12b), y se comparó la consistencia en resultados de corridas sucesivas a corto y largo plazo.

e) Ensayos de extracción de hormonas de muestras de plasma.

Se probaron las extracciones con diferentes protocolos en columnas C18 (Agilent, Santa Clara), variando los solventes de acondicionamiento, purificación y elución.

El proceso de la puesta a punto evidenció que este método no alcanzó a ofrecer las garantías requeridas para una cuantificación confiable. En particular, hubo falta de repetitibilidad y la sensibilidad lograda no fue suficiente para el análisis de las muestras de plasma, de muy bajo volumen. Por esta razón se llevó a cabo la cuantificación por ELISA.

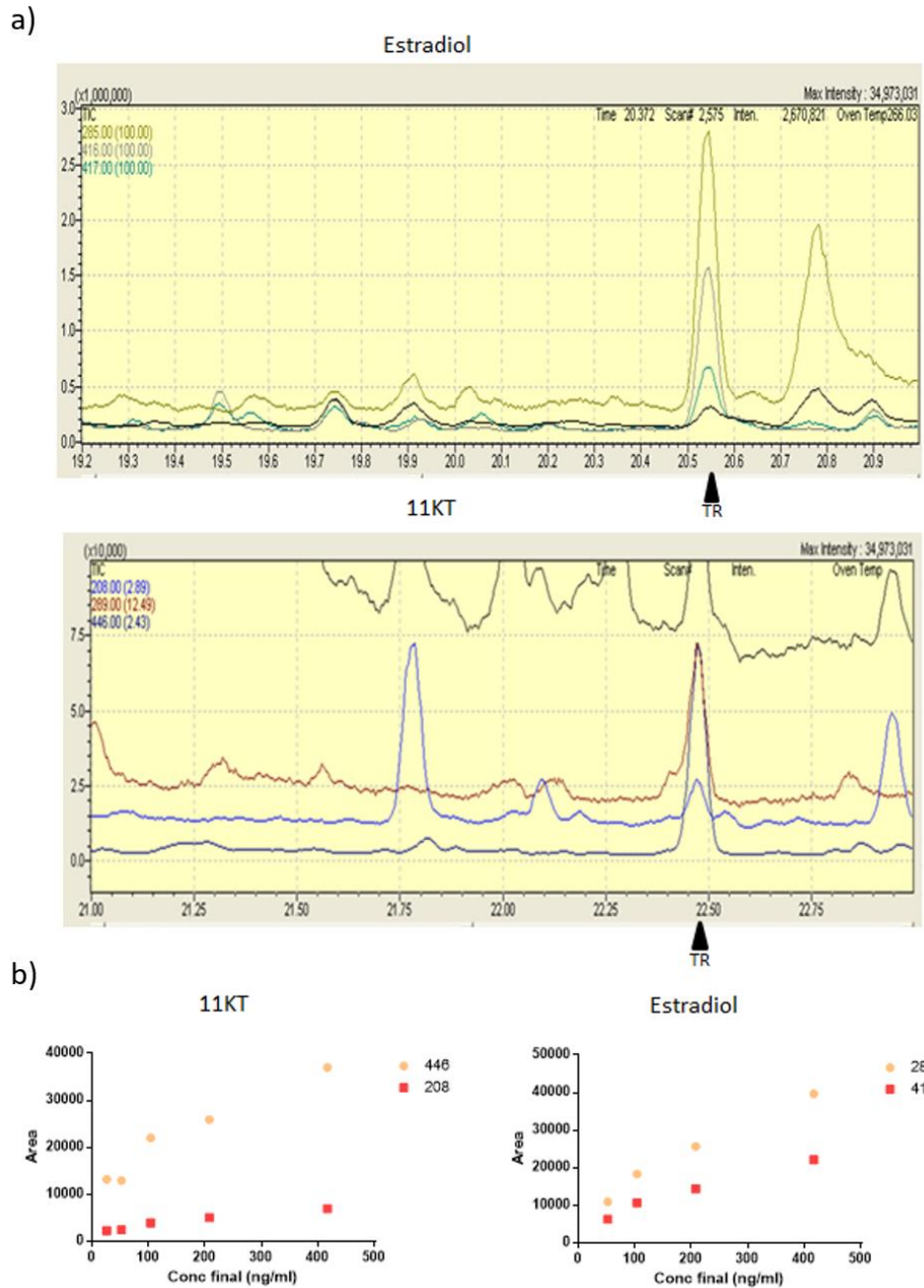


Fig. 12. Cromatogramas y curvas estándar de hormonas en GCMS. a) Arriba: cromatograma de 17β -estradiol (E2), con un tiempo de retención (TR) de 20,55 minutos, caracterizado por los iones 417 m/z y 416 m/z y con pico base en 285 m/z. Debajo: cromatograma de 11-ketotestosterona (11KT), retenido a los 22,45 minutos, caracterizado por los iones 289 m/z y 208 m/z, con pico base en 446 m/z. b) Izquierda: curva de dilución del standard de 11KT diluido en acetona. La hormona comienza a ser detectada de manera confiable a los 104 ng/ml. Derecha: curva de dilución del standard de E2 diluido en acetona. La hormona comienza a ser detectable de manera confiable a los 104 ng/ml.

2.2 Bloqueo de la vía estrogénica por administración de fadrozole

Ensayos conductuales

Para evaluar el rol de la vía estrogénica en la agresión intrasexual, se le administró el fármaco fadrozole (FAD, un inhibidor específico de la enzima aromatasa) en un protocolo en agudo, a díadas macho-macho previo a someterlos a un encuentro agonístico. La efectividad de FAD como bloqueante de la actividad de la enzima aromatasa ha sido previamente documentada para peces teleósteos y otros vertebrados (Gonçalves et al., 2007; Huffman et al., 2013; Jalabert et al., 2015; Wade et al., 1994), y el protocolo es basado en Huffman et al., (2013). Se preparó una solución madre de FAD (Sigma-Aldrich, F3806), a 10 µg/µl en EtOH 100%, y se almacenó a -20 °C. En el día previo a los experimentos conductuales, la solución madre fue diluida en PBS de modo de alcanzar la concentración final y el volumen de inyección deseados y almacenada a 4°C. Se realizaron encuentros diádicos (n = 18) entre machos con una asimetría de largo de 6 ± 4 % y de peso de 19 ± 5 % respectivamente (media $\pm$ ds). El largo y peso de los machos fue de $3,92 \pm 0,31$ cm y $1,69 \pm 0,39$ g (media $\pm$ ds) respectivamente (Tabla 2). Las contiendas se llevaron a cabo en el mismo set experimental descrito en el capítulo I (Fig. 2). Ambos machos de cada díada (n=10) fueron levemente anestesiados por hipotermia bajo inmersión en agua helada (0-5°C) e inyectados por vía intraperitoneal con FAD (20 µg/g de peso corporal, 10 µl/g de peso corporal). Pasados 60 min los machos fueron colocados uno en cada compartimiento de la arena experimental y dejados aclimatar por 15 min. Pasado este tiempo, la compuerta fue removida y el comportamiento de la díada videoregistrado por 60 min. Como control experimental, se realizaron n = 8 enfrentamientos en los que ambos machos fueron inyectados con la solución vehículo (PBS + EtOH), siguiendo el mismo protocolo para el tratamiento con FAD. La asignación de las díadas al tratamiento FAD o control (i.e. SAL) se realizó aleatoriamente. Las experiencias fueron realizadas en la estación experimental de la Sección Etología de Facultad de Ciencias, bajo las condiciones previamente mencionadas (capítulo I). El traslado de los animales del lugar de mantenimiento a la estación experimental se realizó el día previo al momento del test. Todas las experiencias fueron realizadas entre las 09:00 y las 17:00 hs, intercalando experimentos de ambos tratamientos.

Procesamiento de datos conductuales

El procesamiento de datos conductuales siguió el protocolo detallado para el capítulo I y la cuantificación hormonal, con la diferencia que se analizaron los 60 min de interacción y se consideró la díada como unidad experimental de análisis.

Análisis estadístico

Para evaluar el efecto del tratamiento con FAD sobre el comportamiento de la díada, se utilizaron modelos lineales generalizados (GLM) con distribución de errores gaussiana (Test de t o de Welch) y no gaussiana, evaluando para cada variable, la calidad de ajuste de los modelos en base a la exploración visual de los residuales, evaluación de normalidad de los residuales mediante el test de Shapiro-Wilk, y el valor de AIC. Se usaron test de Chi-cuadrado con corrección n-1 para $n < 20$, para evaluar el efecto del tratamiento sobre la ocurrencia de contiendas y sobre el resultado de la contienda en cuanto al tamaño de los machos. Los datos son expresados como media $\pm$ se (error estándar).

RESULTADOS

2.1 Relación entre el comportamiento agonístico y los niveles plasmáticos de 11-ketotestosterona y 17 β -estradiol

Se lograron obtener niveles detectables tanto de la hormona 11KT como E2 en muestras de plasma de machos adultos de *A. reicherti*. En total, se cuantificaron 47 muestras de plasma, de las cuales se utilizaron 23 para cuantificar 11KT y 24 para cuantificar E2. Las muestras de 11KT incluyen 8 dominantes, 7 subordinados y 8 individuos control, mientras que las muestras de E2 incluyen 8 muestras de dominantes, 7 muestras de subordinados (2 agrupadas) y 9 muestras de individuos control (8 agrupadas) (ver Tabla 4). La concentración plasmática (media $\pm$ ds) de 11KT fue de 1088 ± 779 pg/ml ($n = 36$), y la concentración plasmática (media $\pm$ ds) de E2 fue de 416 ± 345 pg/ml ($n = 27$).

Relación entre el comportamiento agonístico y los niveles plasmáticos de 11-ketotestosterona

Para evaluar potenciales diferencias en niveles hormonales entre individuos subordinados, dominantes y control, primero se confirmó la ausencia de diferencias significativas en algunos parámetros anatómicos entre estos grupos. Los individuos dominantes, subordinados y controles no presentaron diferencias en peso (ANOVA, $F = 1,62$, $p = 0,22$), largo (Test de Kruskal-Wallis, $\chi^2 = 4,36$, $p = 0,11$), condición corporal (ANOVA, $F = 0,83$, $p = 0,45$) o IGS (ANOVA, $F = 0,34$, $p = 0,72$) (Fig. 13). Por otra parte, el nivel plasmático de 11KT no presentó relación con el peso (ML: $t = -0,35$, $p = 0,73$, $n = 23$, Fig 14a), largo estándar (ML: $t = -0,58$, $p = 0,57$, $n = 23$, datos no mostrados), condición corporal (ML: $t = 0,55$, $p = 0,59$, $n = 23$, Fig. 14b), o IGS (ML: $t = 1,07$, $p = 0,30$, $n = 23$, Fig 14c) de los machos (Fig. 14).

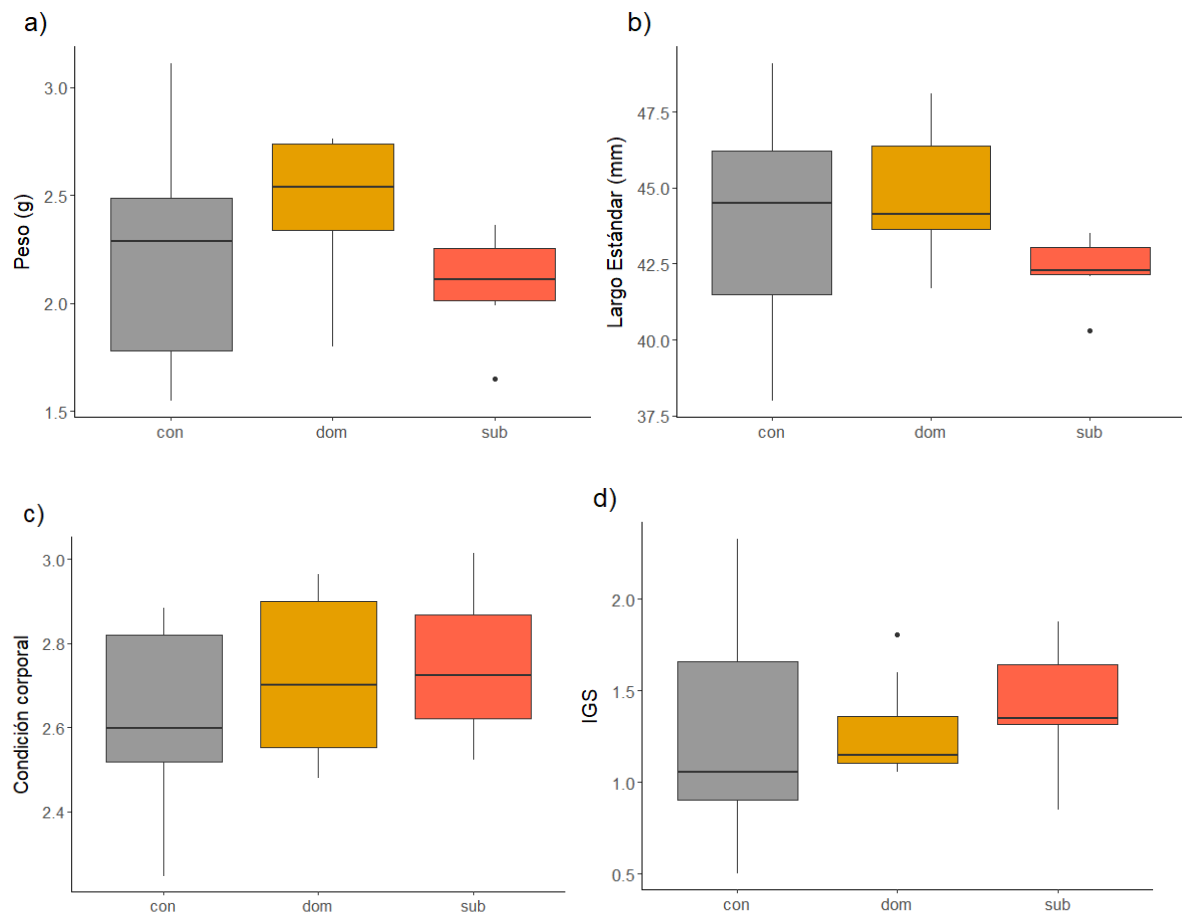


Fig. 13. a) Peso, b) largo estándar, c) condición corporal y d) índice gonadosomático para individuos control (gris), dominantes (naranja) y subordinados (rojo). Se muestra la mediana (línea negra horizontal), rango inter-cuartil (caja) y cuartiles superior e inferior (“bigotes”). ANOVA (a, c, d) Test de Kruskal-Wallis (b) ($n_{dom} = 8$, $n_{sub} = 7$, $n_{con} = 8$).

Dado que los experimentos control y agonístico fueron intercalados a lo largo del día, la sangre fue extraída a las mismas horas para machos dominantes, subordinados y control (ANOVA, $F = 1,30$, $p = 0,29$, $n = 23$). Además, no se encontró relación significativa entre los niveles de 11KT y la hora de extracción de la sangre (GLM, $t = -0,38$, $p = 0,71$, $n = 23$, Fig 14d).

Se observó un efecto marginalmente significativo de atravesar una experiencia agonística y resultar subordinado sobre el nivel de 11KT, mientras que atravesar dicha experiencia y resultar dominante no presentó efecto sobre los niveles de 11KT (GLS con varianza estructurada por nivel del factor Estatus, $F = 5,92$, $p < 0,01$, Comparaciones múltiples pos hoc de Tukey: sub-con: $z = -2,20$, $p = 0,07$; dom-con: $z = -0,09$, $p = 0,99$; sub-dom: $z = -2,78$, $p = 0,01$) (Fig 15a). Además, en el análisis pareado por díada, los machos dominantes presentaron niveles de 11KT significativamente mayores que los machos subordinados (dom: 1454 ± 249 pg/ml; sub: 481 ± 86 pg/ml, Test de t de muestras pareadas: $t = 3,31$, $p = 0,02$, $n = 7$) (Fig 15b).

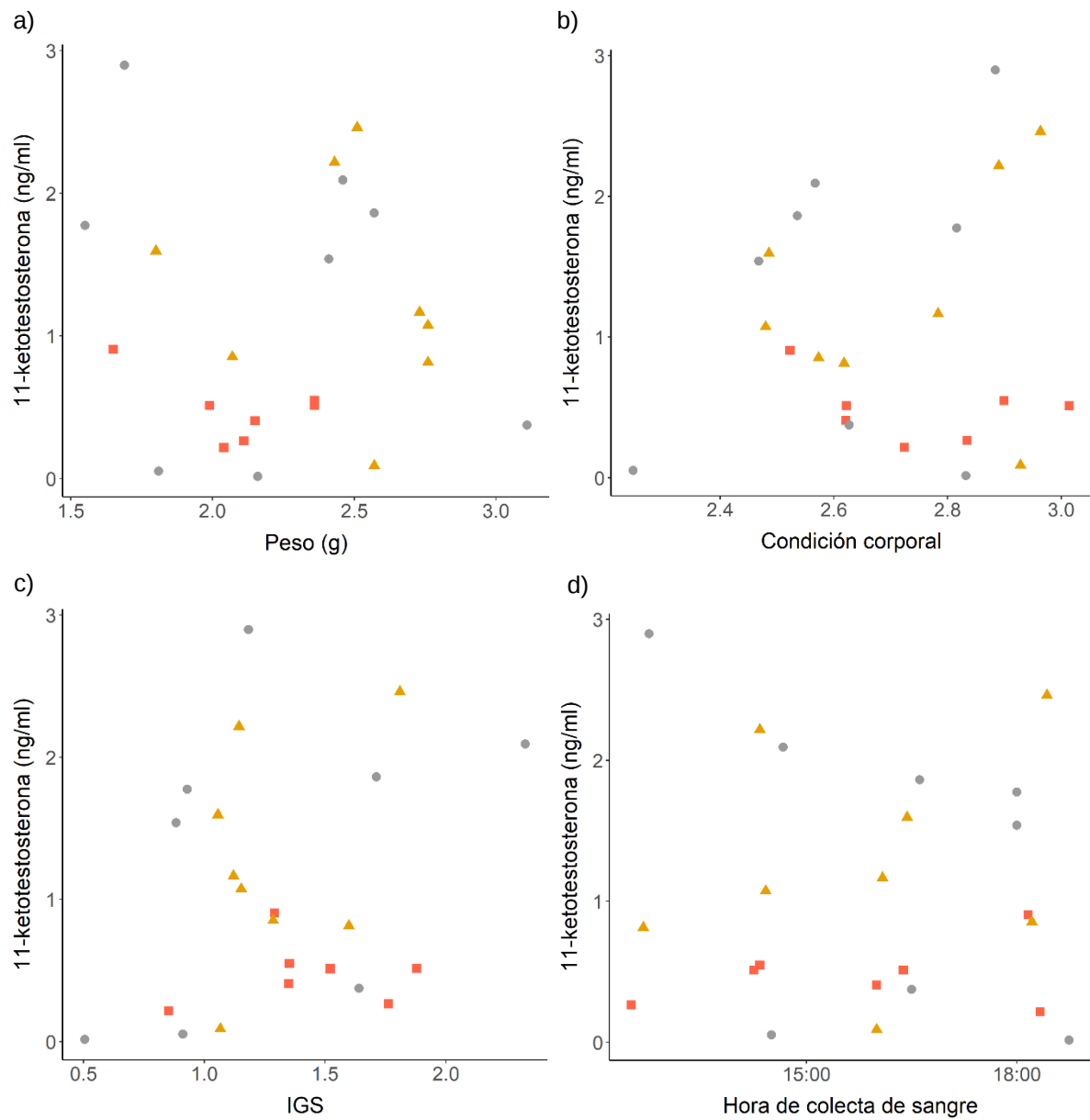


Fig. 14. Relación entre el nivel de 11KT en plasma y el peso (a), condición corporal (b), índice gonadosomático (c) y hora de colecta de la sangre (d), para dominantes (triángulos amarillos), subordinados (cuadrados rojos) y control (círculos grises). Ninguna regresión lineal resultó significativa ($n_{\text{con}} = 8$; $n_{\text{sub}} = 7$; $n_{\text{dom}} = 8$).

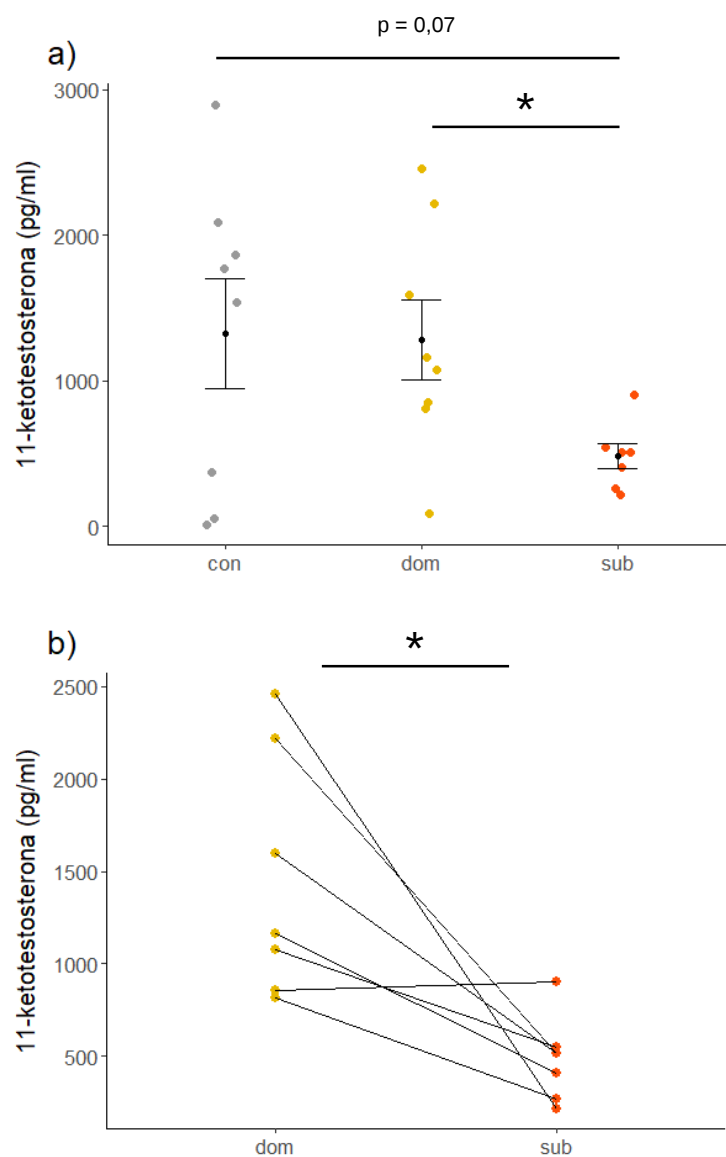


Fig 15. a) Niveles plasmáticos de 11-ketotestosterona para individuos control (n=8), dominantes (n=8) y subordinados (n=7) (Media $\pm$ SE). GLS con varianza estructurada por nivel del factor y comparaciones múltiples pos hoc de Tukey. b) Niveles plasmáticos de 11-ketotestosterona de individuos dominantes y subordinados de una misma día (líneas negras, n = 7). Test de t de muestras pareadas (b). * p-valor < 0,05.

Al asociar los niveles hormonales con el comportamiento agonístico durante las contiendas, tanto en los machos dominantes y como en los subordinados, no se encontró relación entre la concentración plasmática de 11KT y diferentes variables consideradas: latencia al primer despliegue (Dom: ML, $t = 1,21$, $p = 0,27$; Sub: GLM, $t = -0,36$, $p = 0,74$), latencia al primer ataque (Dom: ML, $t = 0,96$, $p = 0,37$; Sub: ML, $t = -0,01$, $p = 0,99$), duración de la contienda (Dom: ML, $t = -0,66$, $p = 0,53$; ML: Sub: $t = 0,36$, $p = 0,73$), número de despliegues totales pre-resolución (Dom: ML, $t = -0,06$, $p = 0,96$; GLM: Sub: $t = 0,09$, $p = 0,93$), ataques pre-resolución (Dom: GLM, $t = 0,19$, $p = 0,86$; ML: Sub: $t = -0,35$, $p = 0,74$), o número de ataques post-resolución (Dom: ML, $t = -0,75$, $p = 0,48$) (Fig. 16).

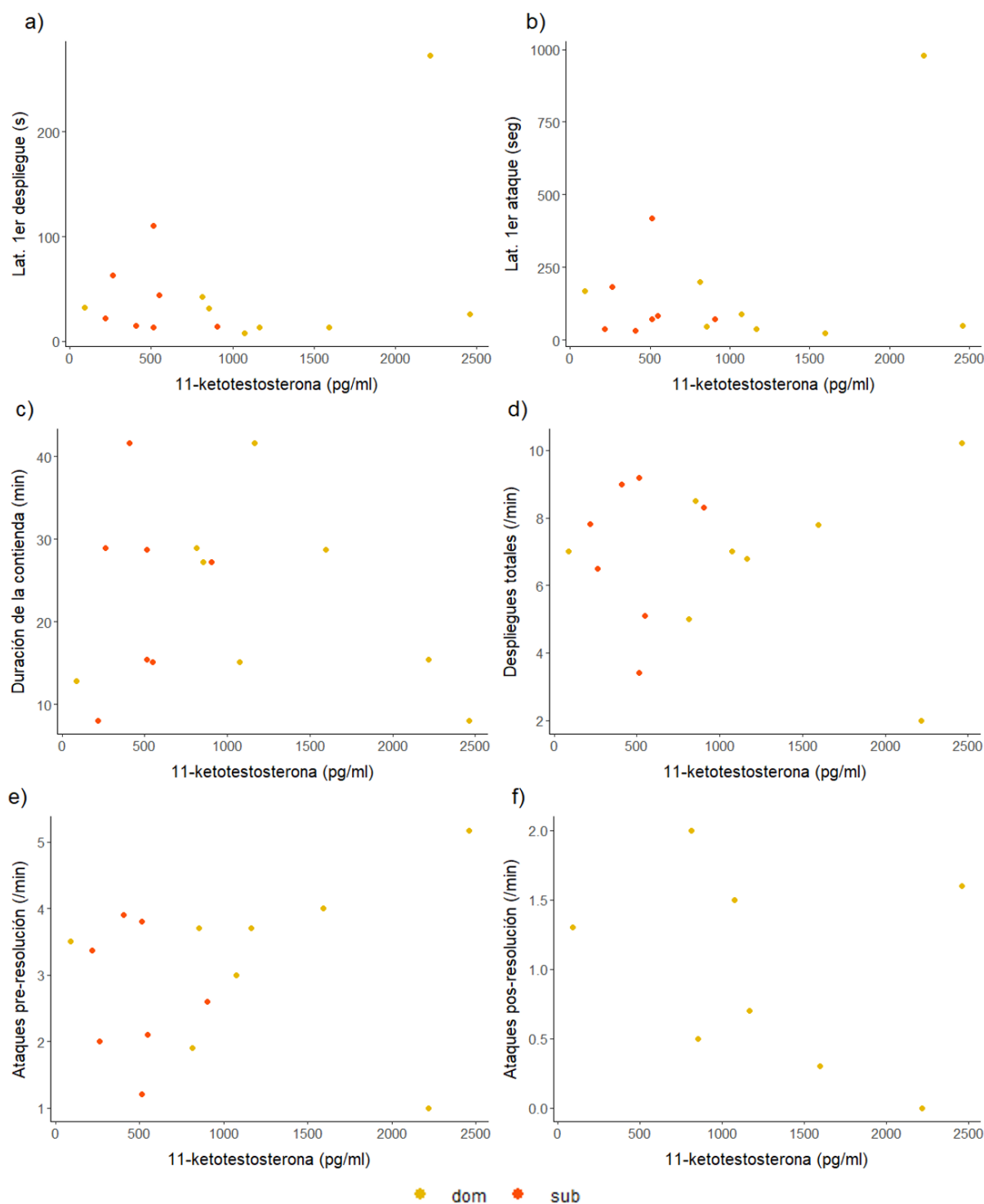


Fig 16. Relación entre niveles plasmáticos de 11KT y el comportamiento agonístico de dominantes (puntos anaranjados) y subordinados (puntos rojos). a) Latencia al primer despliegue b) latencia al primer ataque, c) duración de la contienda, d) despliegues totales pre-resolución, e) ataques pre-resolución, f) ataques post-resolución ($n_{dom} = 8$; $n_{sub} = 7$).

Relación entre el comportamiento agonístico y el nivel plasmático de 17β -estradiol

Para evaluar potenciales diferencias en niveles hormonales entre individuos subordinados, dominantes y control, primero se evaluó la existencia de diferencias significativas en algunos parámetros anatómicos y fisiológicos entre estos grupos. Los individuos dominantes fueron significativamente de mayor peso y largo que los subordinados (Peso: ANOVA, $F = 8,02$, Test pos hoc de Tukey dom-sub, $p < 0,01$; Largo estándar: ANOVA, $F = 6,92$, Test pos hoc de Tukey dom-sub, $p < 0,01$), pero no presentaron diferencias en su condición corporal (ANOVA, $F = 0,30$, $p = 0,74$) o índice gonadosomático (ANOVA, $F = 0,41$, $p = 0,69$) (Fig. 17).

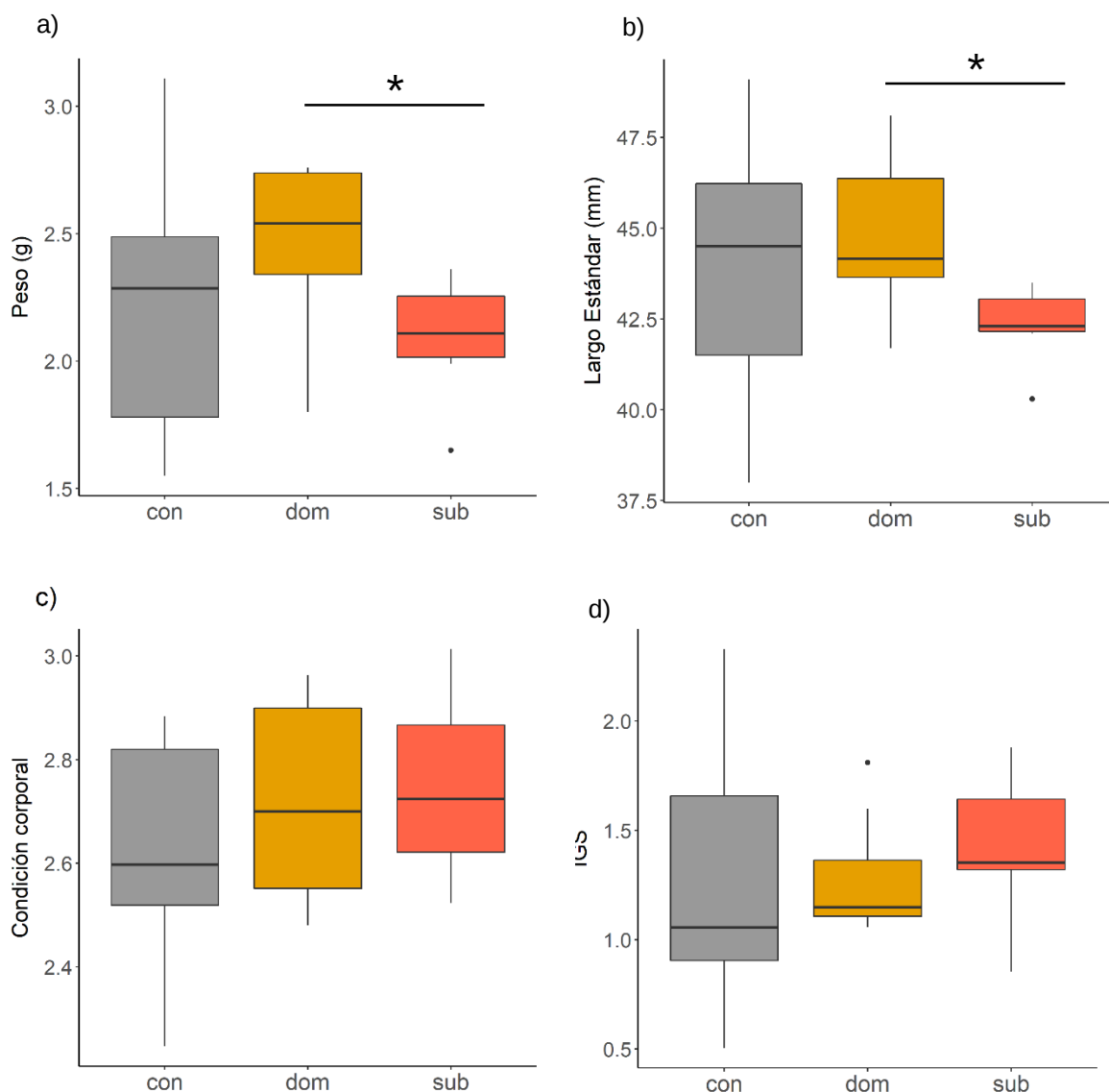


Fig. 17. Peso (a), largo estándar (b), condición corporal (c), e índice gonadosomático (d) para individuos control (gris), dominantes (naranja) y subordinados (rojo). Se muestra la mediana (línea negra horizontal), rango intercuartil (caja) y cuartiles superior e inferior ("bigotes"). * $p < 0,01$, Test pos hoc de Tuckey, $n_{con} = 9$; $n_{sub} = 7$; $n_{dom} = 8$.

El nivel de E2 en plasma no presentó relación con el peso (ML: $t = 0,83$, $df = 22$, $p = 0,42$, Fig. 18a), largo estándar (ML, $t = 1,25$, $df = 21$, $p = 0,22$, datos no mostrados), condición corporal (GLM: $t = -0,59$, $df = 21$, $p = 0,56$, Fig. 18b), o IGS (GLM: $t = 0,17$, $df = 22$, $p = 0,86$, Fig. 18c). Además, los niveles de E2 no mostraron relación con la hora de extracción de la sangre (GLM, $t = 1,72$, $p = 0,10$, Fig. 18d)

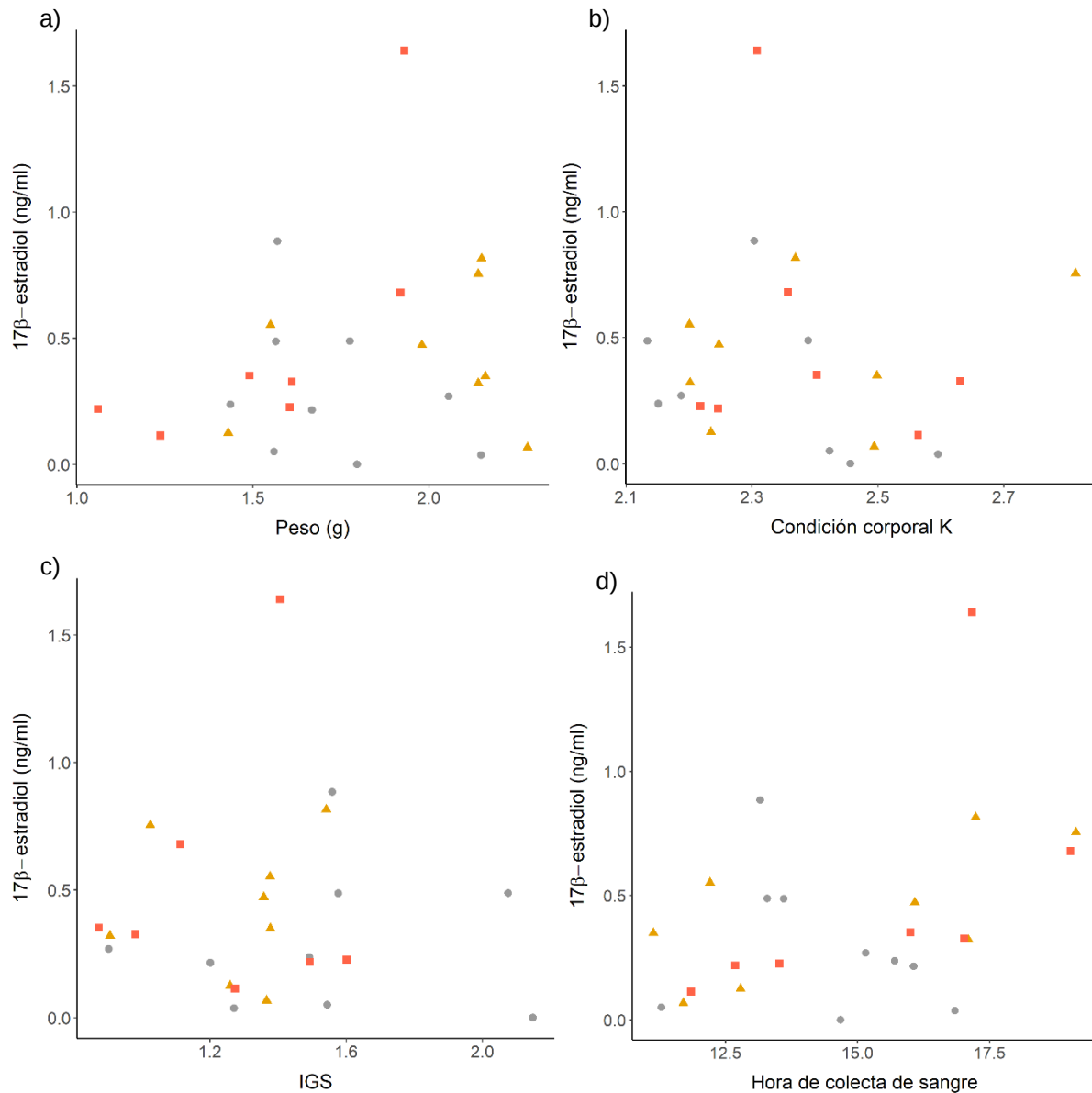


Fig. 18. Relación entre el nivel de E2 en plasma y el peso (a), largo estándar (b), condición corporal (c) e índice gonadosomático (d) de los machos, para dominantes (triángulos amarillos), subordinados (cuadrados rojos) y control (círculos grises). Ninguna regresión resultó significativa, LM (a, b), GLM (c y d).

Los niveles de E2 no exhibieron diferencias significativas entre machos control, dominantes y subordinados (GLM, $F = 0,10$, $p = 0,38$, $n_{\text{dom}} = 8$, $n_{\text{sub}} = 7$, $n_{\text{con}} = 9$) (Fig 19a) ni en el conjunto de los individuos ni en el análisis pareado en las díadas en que se obtuvieron muestras que permitieron determinar E2 para cada individuo (no agrupadas) (GLMM: $\text{Chi}^2 = 0,70$, $p = 0,40$, $n = 5$) (Fig 19b). Tampoco se observan diferencias significativas en los niveles de E2 al comparar los animales que pasaron por la experiencia agonística (dominantes + subordinados) y los animales control (GLM, $t = -1,38$, $p = 0,18$, datos no mostrados).

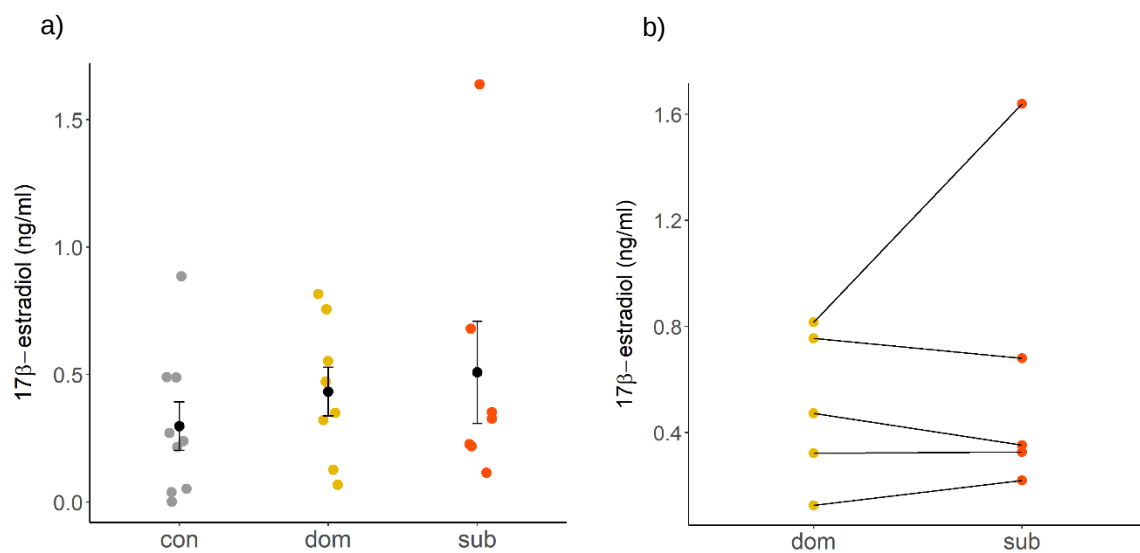


Fig. 19. a) Nivel de E2 en plasma para individuos control (gris), dominantes (naranja) y subordinados (rojo) ($n_{\text{con}} = 9$, $n_{\text{dom}} = 8$, $n_{\text{sub}} = 7$). Se muestran los datos (puntos de colores) y la media $\pm$ se (punto negro y bigotes) para cada grupo. b) Nivel de E2 en plasma de las muestras individuales (no pooleadas) pareadas (dominante y subordinado de una misma pelea) ($n = 5$). Los datos (puntos de colores) pertenecientes a una misma díada se encuentran unidos por una línea negra. Los datos mostrados en b) fueron también incluidos en a) y considerados en ambos análisis.

La concentración plasmática de E2 tanto de los machos dominantes como subordinados no mostró relación con la mayoría de las variables consideradas: latencia al primer despliegue (Dom: GLM, $t = -0,69$, $p = 0,51$; Sub: GLM, $t = 0,41$, $p = 0,69$), latencia al primer ataque (Dom: GLM, $t = -1,20$, $p = 0,27$; Sub: ML, $t = 0,36$, $p = 0,73$), duración de la contienda (Dom: ML, $t = 0,37$, $p = 0,72$; ML: Sub: $t = -0,36$, $p = 0,73$), número de despliegues totales pre-resolución (Dom: GLM, $t = -0,29$, $p = 0,78$; GLM: Sub: $t = -0,37$, $p = 0,72$), ataques pre-resolución (Dom: GLM, $t = -0,12$, $p = 0,91$; ML: Sub: $t = 0,28$, $p = 0,78$), o número de ataques post-resolución (Dom: ML, $t = -0,30$, $p = 0,77$) (Fig. 20).

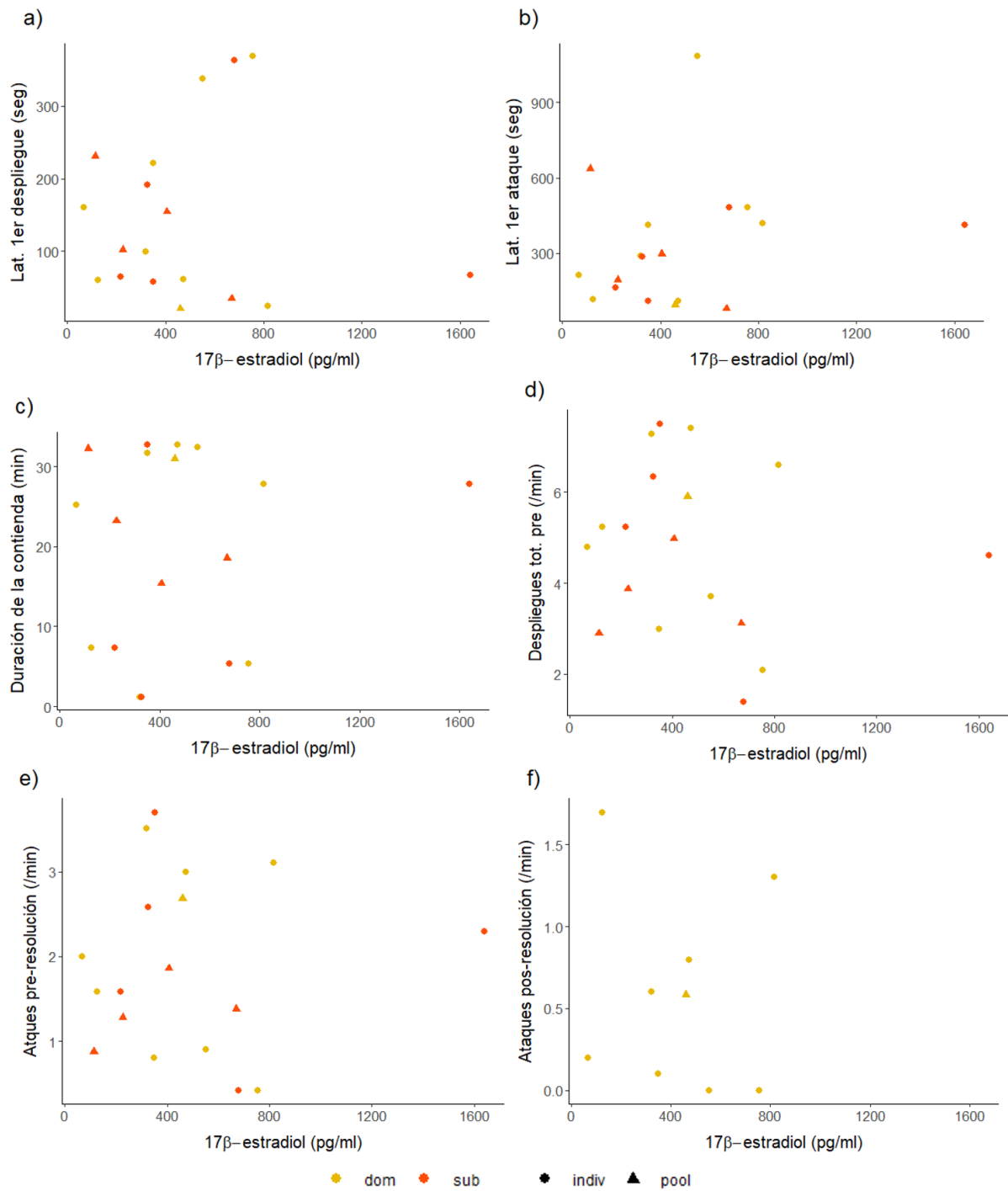


Fig 20. Relación entre niveles plasmáticos de E2 y el comportamiento agonístico de dominantes (puntos naranjas) y subordinados (puntos rojos). a) Latencia al primer despliegue, b) latencia al primer ataque, c) duración de la contienda, d) ataques pre-resolución, e) ataques post-resolución y, f) tiempo en despliegue lateral pre-resolución. Puntos: muestras individuales; triángulos: muestras agrupadas. Dominantes y subordinados fueron analizados de manera independiente ($n_{\text{dom}} = 8$, $n_{\text{sub}} = 7$).

2.2 Bloqueo de la vía estrogénica por administración de fadrozole

El tratamiento con fadrozole (FAD) no afectó la dinámica global de las interacciones agonísticas en términos cualitativos pero sí en términos cuantitativos. En todos los ensayos conductuales, tanto control como FAD, se exhibieron despliegues agonísticos, y en todos a excepción de uno, se exhibieron ataques. En ambos tratamientos se establecieron conflictos que fueron resueltos con el establecimiento de relaciones de dominancia. El tratamiento no afectó la probabilidad de los machos de mayor peso y largo de ganar la contienda (FAD: 6/9 vs. SAL: 4/6, Test de Fisher, p -valor = 1). Si bien el número de díadas que atravesaron contiendas fue menor en el tratamiento FAD la diferencia no fue estadísticamente significativa (FAD: 5/10 vs. Control: 7/8, Test de Fisher, p -valor = 0,15). En 1 de 8 experimentos control el conflicto se resolvió en la etapa de evaluación, mientras que en 4 de 10 lo hicieron en esta etapa en los experimentos con FAD. Dos encuentros agonísticos control y uno FAD no presentaron una jerarquía clara. En el primer caso, la ausencia de jerarquía ocurrió debido a contiendas no resueltas, mientras que en el segundo, la díada FAD no escaló a una contienda.

Las díadas tratadas con fadrozole realizaron significativamente menos despliegues que las díadas control (FAD: $60,9 \pm 11,7$ despliegues; SAL: $175,9 \pm 35,0$ despliegues, Test de Welch, $F = 9,69$, $p = 0,01$), y tanto el número de ataques (FAD: $13,3 \pm 4,1$ ataques; SAL, $37,5 \pm 6,3$ ataques, Test de t , $t_{16} = -3,34$, $p < 0,01$), como de despliegues laterales (FAD: $35,5 \pm 8,0$ despliegues; SAL, $72,4 \pm 14,9$ despliegues, Test de t , $t_{16} = -2,31$, $p < 0,05$) y despliegues sigmoides fue significativamente menor en el tratamiento con fadrozole (FAD: $3,2 \pm 1,1$ despliegues; SAL, $11,4 \pm 4,4$ despliegues, GLM, $z = 2,44$, $p < 0,05$) (Fig. 21a).

El tratamiento con fadrozole aumentó la latencia al primer despliegue (FAD: 553 ± 321 seg; SAL, 152 ± 66 seg, GLM, $z = -2,15$, $p < 0,05$), pero no retrasó el inicio de la contienda (primer ataque) (FAD: 974 ± 345 seg; SAL, 436 ± 292 seg, GLM, $z = -1,24$, $p = 0,21$). Por otro lado, la duración de la contienda y el tiempo a la resolución no fueron significativamente diferentes entre tratamientos (Duración de la contienda: FAD: 328 ± 272 seg; SAL, 534 ± 280 seg, GLM, $t = 0,52$, $p = 0,61$; Tiempo a la resolución: FAD: 1128 ± 395 seg; SAL, 971 ± 307 seg, GLM, $z = 0,07$, $p = 0,94$) (Fig. 21b).

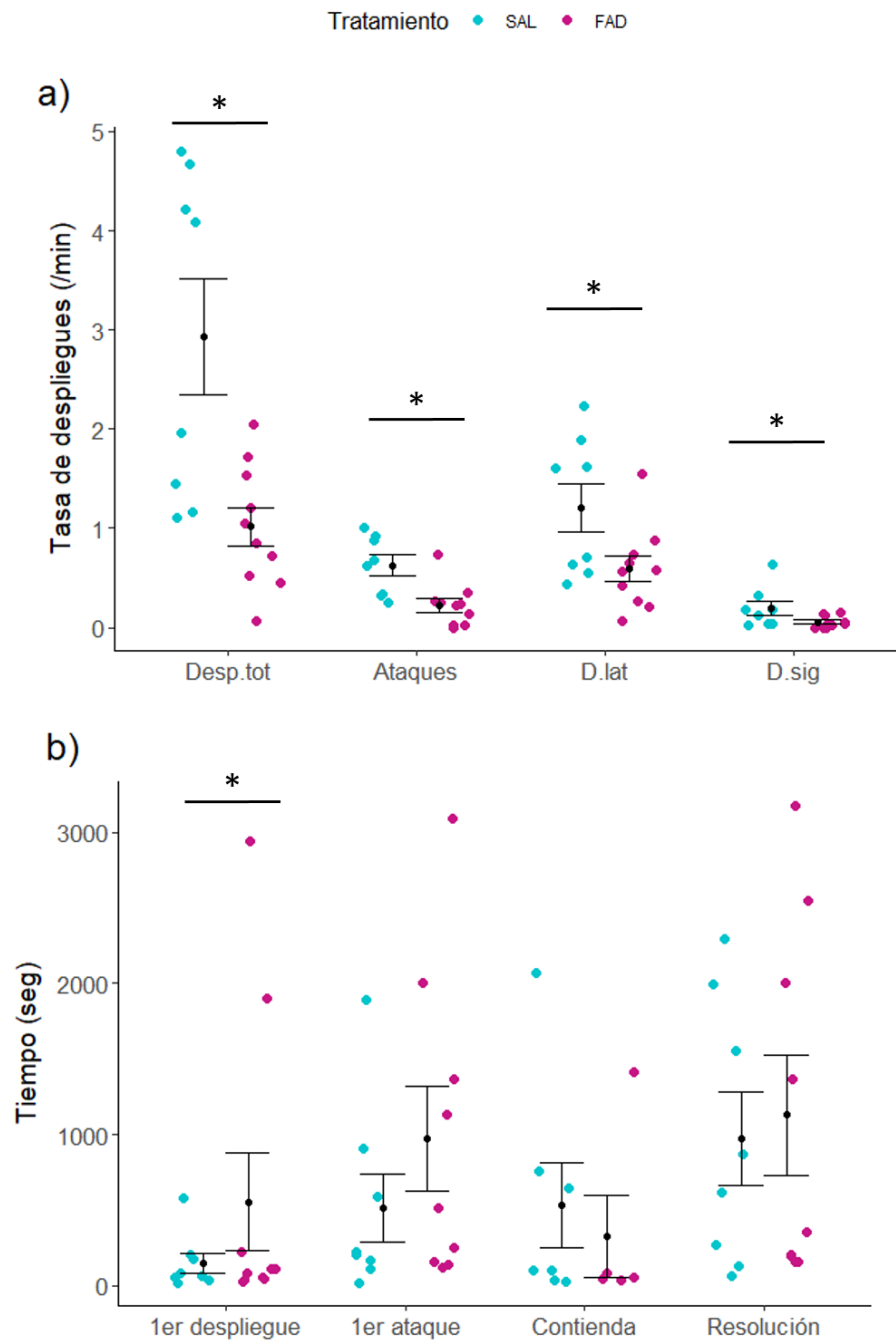


Fig 21. a) Tasa de despliegues totales (Desp.tot), ataques, despliegues laterales (D.lat) y sigmoides (D.sig) por minuto en 60 min de interacción, y b) Latencia al primer despliegue, al primer ataque, duración de la contienda y tiempo a la resolución, para el tratamiento control (SAL) y fadrozole (FAD). * $p < 0,05$ (diferentes tests estadísticos). Se muestran los valores de cada día y las media $\pm$ se (nSAL= 8; nFAD = 10).

DISCUSIÓN

Esta tesis representa el primer estudio en describir de manera rigurosa la conducta agonística de un pez teleósteo con ciclo de vida anual, analizando aspectos de su regulación hormonal, mediante mediciones de parámetros fisiológicos y experimentos de manipulación farmacológica. Este trabajo presenta, por primera vez para peces anuales, asociaciones entre parámetros de la conducta agonística y niveles plasmáticos tanto de andrógenos como de estrógenos, y aporta la primera evidencia que muestra un papel clave de la vía estrogénica en la regulación de la conducta agonística en este grupo de peces.

Comportamiento agonístico de machos de *A. reicherti*

Los machos de *A. reicherti* establecen interacciones agonísticas que atraviesan fases de evaluación y contienda, que suelen involucrar altos niveles de agresividad, y culminan con el establecimiento de relaciones de dominancia claras cuando uno de los individuos se subordina. Este comportamiento se expresa aun en ausencia de hembras o de cualquier recurso (por ejemplo, un área de puesta).

La conducta agonística desplegada por esta especie se corresponde tanto en la dinámica de la contienda como en las unidades comportamentales, al comportamiento descrito para *A. charrua* por Passos et al. (2013b). Los machos realizan despliegues laterales y despliegues sigmoides, siendo más frecuentes los primeros. Además, cuando las contiendas escalan se producen ataques que ocasionalmente terminan en mordidas. Aun cuando en términos generales son muy similares, en *A. reicherti* las fases de evaluación y de contienda son más largas que las reportadas en *A. charrua* (*A. charrua* vs *A. reicherti*: evaluación: 55,3 s vs 183,3 s; contienda: 332 s vs 2020 s). Esta diferencia en la duración de las fases de la contienda puede tener tres orígenes: a) los enfrentamientos entre machos de *A. charrua* se produjeron en presencia de hembras y esto puede aumentar la motivación agresiva vinculada a las posibilidades reproductivas, mientras que la conducta agonística en *A. reicherti* se evaluó sin presencia de hembras; b) las díadas de machos de *A. reicherti* se conformaron con una menor asimetría en el largo de los contendientes que las díadas de *A. charrua* (media $\pm$ ds: 7 ± 4 % en *A. reicherti* vs 16 ± 5 % en *A. charrua*), por lo que podrían necesitar más tiempo para dirimir el conflicto; y c) los experimentos conductuales realizados por Passos et al., (2013b) en *A. charrua* fueron realizados con ejemplares silvestres, mientras que en el presente trabajo se utilizaron animales eclosionados y criados en el laboratorio. La dinámica de las contiendas también podría verse afectada por factores como la edad y la experiencia social previa de los ejemplares.

A diferencia de lo esperado, no se constata un efecto de la residencia previa sobre el territorio sobre la dinámica de las contiendas, con excepción de la reducción en la tasa de despliegues. El efecto residente o ventaja locataria ha sido documentada en diversos taxa de animales (Parker, 1974). Sin embargo, dicha ventaja suele estar vinculada a los beneficios adquiridos por el usufructo del territorio (i.e. mejor condición física por acceder a más alimento) o correlacionar con la experiencia previa ganadora (Kokko, 2013), variables que fueron excluidas de este estudio. La reducción de la tasa de despliegues podría deberse a la reducción de los niveles de estrés del residente y, dada la alta correlación en la conducta de dominantes y subordinados, una consecuente reducción de la agresividad global de la díada.

El tamaño de los individuos afecta el resultado de la contienda: los machos de mayor tamaño (tanto en el largo como en el peso) resultaron dominantes frente a los machos de menor tamaño (27/32, $p < 0,001$). En el mismo sentido, la asimetría en el tamaño (tanto en largo como en peso) de los contendientes es un factor clave que aumenta la probabilidad de los machos de ganar la contienda: a mayor asimetría, mayor es la ventaja de los machos más grandes sobre los más chicos. Los machos de mayor tamaño poseen una ventaja competitiva también en *A. charrua* (Passos et al 2013). Esto ha sido observado en enfrentamientos diádicos en peces, incluso cuando la asimetría entre los contendientes es pequeña (Benson y Basolo, 2006; Enquist et al., 1990; Moretz, 2003; Ribowski y Franck, 1993a; Turner y Huntingford, 1986). En el caso de *A. charrua* el largo de los machos es además, un factor determinante de las preferencias de las hembras, independientemente de que éstas presencien o no el desarrollo y resultado de la contienda (Passos et al 2013b).

La asimetría en el tamaño (peso, largo o condición corporal) no afecta la duración del conflicto. Este resultado posiblemente sea debido a que el rango de la asimetría entre los contendientes fue muy chico (rango intercuartil de 5,6% para el peso y de 6,2% para el largo), debido a que el criterio de asignación de las díadas fue de asimetría en el peso de 20%. Passos et al., (2013b) observó una relación negativa entre la asimetría en largo entre dominante y subordinado y el tiempo a la resolución del conflicto en *A. charrua*, enfrentando machos con diferencias entre 8 y 29%, mientras que en este trabajo el rango en la asimetría en largo varió entre 1 y 15%. La ausencia de correlación negativa entre la asimetría de RHP y la duración del conflicto no permite distinguir si la contienda entre machos *A. reicherti* se ajusta a un modelo de auto-evaluación o evaluación mutua. Es muy probable que esta ausencia de correlación negativa se deba al bajo porcentaje de asimetría entre los contendientes. En este escenario, se analizó entonces la relación entre el tamaño de ganadores y perdedores y la duración del conflicto en el entendido de que mediante evaluación mutua se espera que la duración del conflicto correlacione positivamente con la RHP de los subordinados pero negativamente con la de los dominantes (Briffa et

al., 2013, Taylor y Elwood, 2003). En estos experimentos, la duración del conflicto se correlaciona negativamente con la condición corporal de los machos ganadores, pero no muestra relación con la condición corporal de los subordinados. Si bien la relación negativa entre la duración del conflicto y el RHP de los ganadores es necesaria para sugerir un mecanismo de evaluación mutua, no es suficiente. Passos et al., (2013b) aunque reportan una correlación negativa entre duración del conflicto y asimetría en RHP para *A. charrua* en experimentos con mayor porcentaje de asimetría entre contendientes, no evalúan la relación entre el tamaño de ganadores y perdedores y la duración del conflicto, información relevante para determinar si está presente un mecanismo de evaluación mutua del RHP en *Austrolebias*.

Por otra parte, los machos de menor RHP son igualmente agresivos que los machos de mayor RHP, sin diferencias entre ambos machos en la tasa de despliegues totales o ataques realizados previo a la resolución del conflicto, a diferencia de lo que se observa en *A. charrua* donde los machos más grandes despliegan mayor cantidad de conductas agresivas y de amenaza (Passos et al., 2013b) (Fig. 8). Además, los machos de menor tamaño, atacan significativamente antes que los de mayor tamaño (Fig. 8), y el comportamiento de ambos se encuentra fuertemente correlacionado (Fig. 10), lo que indica una escalada agresiva posiblemente debida a la baja asimetría entre los contendientes.

Si bien los machos de mayor RHP y por tanto con mayor probabilidad de ganar una contienda suelen atacar primero y ser más agresivos que los perdedores en diversos animales (revisado en Just y Morris, 2003), lo opuesto también ha sido observado (Dow et al., 1976; Enquist y Jakobsson, 1986; Morris et al., 1995; Ribowski y Franck, 1993b). Se han propuesto diversas teorías para explicar este fenómeno, desde modelos enfocados en las asimetrías en el valor del recurso para cada oponente (Dugatkin y Ohlsen, 1986; Parker, 1974), a modelos que sugieren una evaluación sub-óptima del RHP propio o mutuo (Bradbury y Vehrencamp, 1998; Just y Morris, 2003). Asimismo, Grafen (1987) explica este comportamiento en base a las oportunidades futuras de obtener un recurso, donde bajas chances aumentarían el valor del recurso para aquellos que no lo tienen, y por tanto un mayor nivel de agresividad en los individuos de menor RHP es lo esperado (efecto de desesperación, *Desperado Effect* sensu Grafen, 1987). En el pez cola de espada *Xiphophorus heileri*, el corto tiempo de vida (2-3 años en cautiverio) y la saturación de habitat, podrían explicar la menor latencia en atacar de los machos subordinados (Ribowski y Franck, 1993b). En los charcos temporales el valor del recurso aumenta a medida que transcurre el año y el charco comienza a secarse, lo que podría incrementar la motivación de los machos de bajo RHP a escalar a una contienda en *A. reicherti*.

Futuros estudios con un mayor rango de asimetría en RHP, y modificando el valor del recurso para cada oponente, permitirían evaluar el mecanismo subyacente a la toma de decisiones de los probables perdedores, tanto para escalar a una contienda como para abandonarla.

Relación entre comportamiento agonístico y 11-ketotestosterona

El comportamiento agresivo entre machos que se despliega en el periodo reproductivo ha sido relacionado con altos niveles de andrógenos de origen gonadal en todas las clases de vertebrados (Demas et al., 2007; Nelson, 2006), y más recientemente a la aromatización de T a estradiol (Trainor et al., 2006). Se ha propuesto que muchos animales modulan sus niveles hormonales en diferentes contextos sociales, lo que les permite flexibilidad conductual sin los costos de mantener altos niveles de hormonas esteroides por períodos largos. Sin embargo, las respuestas hormonales ante los desafíos sociales varían considerablemente entre diferentes especies, y hay evidencia que sugiere que esta variación se encuentra vinculada a las características de historia de vida como el sistema de apareamiento y el tipo de cuidado parental. *Austrolebias reicherti* es una especie muy ventajosa para abordar el control hormonal de la agresión reproductiva debido a su particular ciclo de vida, que transcurre en constante reproducción y alta competencia entre machos que se sostiene a lo largo de toda su vida adulta.

Para evaluar la asociación entre los niveles circulantes de 11KT y el estatus social, se realizaron rigurosos controles para confirmar la equivalencia en los grupos experimentales en cuanto a la condición corporal de los individuos (Fig. 13). Además, se comprobó una ausencia de correlación entre los valores de 11KT circulante y diferentes parámetros corporales de los individuos: peso, largo, condición corporal, IGS (Fig. 14), así como entre la 11KT y la hora de extracción de sangre. Los machos de *A. reicherti* que resultaron dominantes en un enfrentamiento diádico mostraron niveles de 11KT significativamente mayores a los machos que culminaron como subordinados, apoyando la hipótesis de que la dominancia se asocia con altos niveles de andrógenos en *A. reicherti*.

Estos resultados son consistentes con lo observado en varias especies de cíclidos (Oliveira et al., 1996; Parikh et al., 2006; Ramallo et al., 2015), así como también en otras familias de teleósteos (salmónidos: Cardwell et al., 1996; Elofsson et al., 2000; ciprínidos: Filby et al., 2010; labridae: Stiver et al., 2015) en las que los machos dominantes o territoriales presentan mayores niveles de 11KT circulantes que los machos subordinados. En los vertebrados en general, los individuos de mayor jerarquía en un grupo o que acceden a un territorio de cría, presentan niveles más elevados de andrógenos que individuos subordinados, no territoriales o que han perdido acceso a un recurso (revisado en Oliveira, 2004).

Asimismo, numerosos trabajos han documentado que los andrógenos son modulados por la experiencia social, y en particular por el resultado de una interacción agonística en vertebrados en general (Oliveira, 2004) y en peces en particular (Hirschenhauser y Oliveira, 2006; Oliveira et al., 2002). En peces, Olivera et al., (1996), mostró que los niveles de andrógenos en la orina del pez cíclido *Oreochromis mossambicus* previos al establecimiento de territorios no predicen la dominancia en un grupo, y que la diferencia en los niveles androgénicos entre machos territoriales y no territoriales se debe a que aumentan en los individuos que dominan y establecen territorios, y disminuyen en los individuos que pierden y subordinan.

Se ha hipotetizado, que mediante estas respuestas androgénicas los individuos logran adaptarse a las consecuencias y demandas de perder, ganar o simplemente participar de un conflicto agonístico, coordinando así la función reproductiva con la información social respecto a las chances futuras de reproducción (Oliveira, 2004). En este sentido, cierta evidencia sugiere que el “efecto ganador” (el aumento de la probabilidad de ganar una contienda por tener experiencias previas exitosas) podría estar modulado por andrógenos (Fuxjager et al., 2010; Oliveira et al., 2009).

Los niveles plasmáticos de 11KT de los machos que resultaron dominantes no difirieron estadísticamente de los niveles de los machos control (que no atravesaron un enfrentamiento agonístico), mientras que los niveles circulantes de los subordinados muestran una diferencia marginalmente significativa con los machos control (Fig. 15a). Esto sugiere que en *A. reicherti*, atravesar una contienda agonística no produce un efecto en los niveles plasmáticos de 11KT de los machos ganadores, sino únicamente una reducción en los niveles de los machos perdedores. Alternativamente, la respuesta en los ganadores podría requerir de una mayor ventana temporal luego de la resolución del conflicto para evidenciarse, o ser una respuesta sutil solo detectable mediante mediciones repetidas sobre los mismos individuos antes y después de la experiencia. Sin embargo, en el cíclido *Neolamprologus pulchery*, 20 min pos-resolución son suficientes para observar un aumento en los niveles de 11KT tanto en ganadores como perdedores de un conflicto agonístico (Desjardins et al., 2006). En el presente trabajo, el tiempo desde la resolución del conflicto a la extracción de sangre varió entre 17 y 51 min y presentó una media de 35 min. Otra posibilidad alternativa, es que la experiencia ganadora esté modulando los niveles T y no los de 11KT. Algunos estudios en peces, documentan aumentos de T y no de 11KT por experiencias agonísticas (Dijkstra et al., 2012; Hay y Pankhurst, 2005).

No obstante, en muchas especies los andrógenos no responden a las experiencias sociales o presentan respuestas leves (Apfelbeck y Goymann, 2011; Lynn et al., 2007; Vulllioud et al., 2013). En este sentido, la Hipótesis del Desafío (*Challenge Hypothesis*, en inglés, Wingfield et al., 1990) propone que el grado de respuesta hormonal ante un desafío social (i.e. interacciones agonísticas por un recurso en disputa), se encuentra relacionado al sistema de apareamiento y cuidado parental, que determinan en última instancia, el régimen de enfrentamientos a los que son expuestos los machos de una especie. Se propone que los machos de especies con sistemas de apareamiento monogámicos, con cuidado biparental, presentan altos niveles de respuesta androgénica ante interacciones agonísticas mientras que machos de especies polígamas sin cuidado parental, presentan bajos niveles de respuesta ante interacciones macho-macho (Goymann et al., 2007; Hirschenhauser y Oliveira, 2006; Wingfield et al., 1990, 1987). Como se mencionó antes, un aumento en los niveles plasmáticos de andrógenos pos-contienda puede repercutir en un mayor éxito reproductivo de los machos, preparándolos para futuros conflictos o disputas territoriales y promoviendo el comportamiento sexual. En especies con sistemas de apareamiento poligámico sin cuidado parental, los beneficios de mantener altos niveles de andrógenos (al menos durante la temporada reproductiva) superan a los costos (evidencia de costos de los andrógenos: De Ridder et al., 2000; revisada en Ketterson y Nolan, 1992; Wingfield et al., 1990). Estas predicciones han sido puestas a prueba en peces cíclidos. Un estudio comparativo de especies cercanamente emparentadas con sistemas de apareamiento contrastantes, evidenció mayores respuestas de 11KT ante interacciones sociales en especies monógamas/formadores de parejas que en especies poligínicas con sistema de lek (Hirschenhauser et al., 2004). El sistema de apareamiento poligínico/poliándrico de *A. reicherti* (Tassino et al., 2017), estrechamente ligado al modo de reproducción extremo de los peces anuales con particularidades únicas en su historia de vida (e.g. sin solapamiento de generaciones y por tanto ausencia de cuidado parental, alto potencial reproductivo durante toda su vida adulta, tiempo de vida efímero) suponen un escenario de intensa selección sexual y competencia entre machos, donde los beneficios de mantener altos niveles de andrógenos “por defecto” seguramente excedan a los costos. Incluso, la selección natural podría haber favorecido mecanismos en este grupo de peces, para evitar los costos de mantener altos niveles androgénicos por períodos prolongados (hipótesis planteada en Wingfield et al., 2001). En base a lo planteado, surge la hipótesis de que la ausencia de diferencia estadística entre los niveles hormonales de dominantes e individuos control observada en este trabajo, sea debida a que el andrógeno 11KT ya se encuentra en niveles cercanos a su máximo fisiológico.

Por otro lado, existe evidencia de que la depleción de los andrógenos en los machos subordinados puede ser mediada por un mecanismo estrés-dependiente. El cortisol, que se propone reduce los

niveles plasmáticos de esteroides gonadales (Pickering et al., 1987), se encuentra aumentado en individuos perdedores/subordinados en comparación con los ganadores/dominantes (Morandini et al., 2014; Øverli et al., 1999; Sakakura et al., 1998; Summers et al., 2003); pero ver Culbert et al., 2018). Sin embargo, en *A. reicherti*, la relación estrés-reproducción es particular, estrechamente relacionada con la historia de vida de los peces anuales. Conforme aumentan las temperaturas hacia el verano, aumenta el estrés de los animales evidenciado por un aumento en los niveles plasmáticos de cortisol. Por otro lado, la administración exógena de cortisol incrementa la tasa de despliegues de cortejo en machos de *A. reicherti* (Passos et al., 2016), sugiriendo que estas especies no solo son tolerantes al estrés, sino que éste puede promover las funciones reproductivas (otros ejemplos en Wingfield and Sapolsky, 2003). Futuros estudios analizando la relación entre estrés y agresión/dominancia en *Austrolebias* deberán explorar los niveles de corticoides de dominantes y subordinados, y si la depleción androgénica en machos subordinados observada en esta tesis, presenta relación con dichos niveles.

Los niveles plasmáticos de 11KT de dominantes o subordinados, no se correlacionan con el nivel de agresividad: latencia al primer ataque, número de ataques, número de despliegues de amenaza, duración del conflicto, ataques post-resolución (Fig. 16). Este resultado sin embargo, sumado al dato de que dominantes y subordinados no presentan diferencias en su nivel de agresividad previo a la resolución del conflicto (Fig. 8), también sugiere que los niveles de 11KT observados son producto de una respuesta hormonal ante la adquisición del estatus de subordinado, lo que explicaría el desacople entre el nivel hormonal y el comportamiento exhibido. En teleósteos, mientras que en algunas especies los niveles de 11KT correlacionan con el nivel de agresividad (Earley and Hsu, 2008; Remage-Healey and Bass, 2006), no se encuentra dicha correlación en dos especies de cíclidos, considerando tanto niveles hormonales previos al enfrentamiento agonístico (Scaia et al., 2018) como posteriores (Desjardins et al., 2006).

Relación entre comportamiento agonístico y 17 β -estradiol

Para evaluar la correlación entre el estradiol circulante y la conducta agonística, y dado los bajos niveles de estradiol en machos, se recurrió al uso de muestras agrupadas. Si bien este abordaje fue cuidadosamente diseñado, la pérdida de la individualidad de algunas muestras podría dificultar la identificación de diferencias sutiles entre grupos experimentales.

Todos los machos de *A. reicherti* mostraron niveles detectables de estradiol. La concentración de esta hormona en plasma fue similar a la reportada en otros machos reproductivos (Scaia et al 2018). No hubo diferencias de los niveles de estradiol circulante entre animales control y aquellos que

experimentaron una contienda, ni entre los animales dominante y subordinado (Fig. 20). Mientras muchos estudios muestran un rol de la vía estrogénica en la agresión de machos, la relación entre agresión o dominancia y niveles circulantes de E2 no es del todo clara. El abordaje de la modulación social de los estrógenos en machos ha sido reciente. En el cíclido neotropical *Cichlasoma dimerus* los altos niveles de estrógenos parecen estar asociados a menores niveles de agresividad: los machos territoriales muestran menores niveles de estradiol que aquellos no territoriales y subordinados, relación que es inversa a la de los andrógenos (Ramallo et al., 2015). En el pez anémona hermafrodita secuencial *Amphiprion akallopisos*, si bien los niveles de 11KT correlacionan con el estatus social de los machos primarios, los niveles de E2 no muestran diferencia entre machos de diferente rango (Mills et al., 2018). Sin embargo, en un estudio reciente en *C. dimerus* siguiendo un protocolo conductual similar al de esta tesis, tanto los machos ganadores como perdedores de una contienda experimentan un aumento en sus niveles de E2 así como de 11KT y T luego de 60 min de interacción (Scaia et al., 2018). En *A. burtoni* también existe una asociación positiva entre dominancia y los niveles tanto de andrógenos como de estrógenos (Huffman et al., 2012; O'Connell et al., 2013).

Los niveles de estradiol circulante no correlacionaron con el nivel de agresión ni con otros parámetros conductuales. Sin embargo, el bloqueo de la enzima aromatasa sugiere un rol de la conversión de T a E2 en la conducta agonística de machos en *A. reicherti*. El tratamiento con el bloqueante de la enzima aromatasa Fadrozole (FAD) mostró una reducción significativa de la agresión durante encuentros diádicos entre machos. El número de ataques, despliegues laterales y sigmoides fue significativamente menor en las díadas tratadas con FAD respecto a las díadas tratadas con solución vehículo (SAL) (Fig 22a). Asimismo, las díadas tratadas con FAD mostraron un aumento en su latencia a realizar despliegues agresivos (Fig. 22b). Estos resultados sugieren que la conversión de T a E2 interviene en la regulación del comportamiento agonístico en *A. reicherti*. El bloqueo de la vía estrogénica, no afectó aspectos globales de la dinámica de las contiendas: ocurrieron contiendas (interacciones con escalamiento), despliegues agresivos de amenaza (despliegues laterales y sigmoides) y ataques, como puede observarse en la figura 22. Además, se establecieron relaciones claras de dominancia y subordinación, sugiriendo que la conversión de T a E2 no interviene en el establecimiento de relaciones de jerarquía. Resultados similares fueron observados por Huffman et al., (2013) en el cíclido *A. burtoni*. El hecho de que el bloqueo de la vía estrogénica afecte ciertos aspectos del comportamiento agonístico y no otros, también indica que la inhibición de la aromatasa no provoca una depleción general del comportamiento y la motivación. De hecho, la latencia al primer ataque no mostró diferencias entre grupos experimentales indicando que ambos grupos tenían equivalentes estados motivacionales hacia la agresión. En el gymnotiforme autóctono *Gymnotus omarorum*, machos tratados con FAD en

tratamiento agudo tampoco modifican su latencia en atacar pero sí reducen su tasa de despliegues agonísticos (Jalabert et al., 2015). Por otra parte, en *A. burtoni*, mientras que el bloqueo de la aromatasa reduce la agresión, no afecta el comportamiento reproductivo (Huffman et al., 2013).

Debe ser tenido en cuenta, que el efecto de la inhibición de la aromatasa podría tanto reducir los niveles de E2 como elevar los niveles de T, y el cambio comportamental observado ser un producto de una mayor activación de la vía androgénica. De hecho, se ha reportado que el bloqueo de la enzima aromatasa cerebral reduce los niveles circulantes de E2 y aumenta los de T (Huffman et al., 2013). Sin embargo, basado en la literatura previa una mayor activación de la vía androgénica estaría más probablemente asociada a un aumento de la agresión y no a una disminución, como muestran nuestros resultados. Interesantemente, en *A. burtoni*, la activación de los receptores de andrógenos no modula la agresión, mientras que el bloqueo de los receptores de estrógenos sí reduce los comportamientos agresivos (O'Connell y Hofmann, 2012). Futuros estudios, deberían evaluar el efecto comportamental del bloqueo de los receptores de andrógenos y estrógenos en *A. reicherti*.

Finalmente, si bien este estudio no puede excluir la posibilidad de un rol del E2 circulante (sintetizado por la gónada), hay evidencias que sugieren un rol de la síntesis local de E2 a nivel central, sobre la modulación de la agresión de machos en peces. La aromatasa se encuentra presente y activa en áreas que controlan el comportamiento social y reproductivo en muchos vertebrados (Balthazart et al., 1996; Shaw, 2018) incluidos los peces (Forlano et al., 2006; Huffman et al., 2013; Strobl-Mazzulla et al., 2005) y su nivel de expresión en el SNC se ha visto puede variar con el fenotipo conductual (dominantes/subordinados) y correlacionar con el comportamiento agresivo (Gonçalves et al., 2008; Huffman et al., 2013; Ramallo et al., 2017). Por otra parte, la ausencia de correlación entre el nivel de E2 circulante y el nivel de agresión en este estudio, abona a la hipótesis de un rol de la aromatización central de T a E2 en la agresión de machos de *A. reicherti*.

CONCLUSIONES

En su conjunto esta tesis describe el comportamiento agonístico de machos de *A. reicherti*, y aporta elementos sobre el rol de los esteroides sexuales, andrógenos y estrógenos sobre dicha conducta.

Los machos de *A. reicherti* establecen interacciones agonísticas que culminan con el establecimiento de relaciones claras de dominancia, donde el tamaño es un factor clave que determina la probabilidad de ganar y acceder al recurso. A pesar de la ventaja consistente de los individuos de mayor porte, los individuos de menor RHP presentan una fuerte motivación a escalar en el enfrentamiento, lo que podría vincularse al corto ciclo de vida de los peces anuales y por tanto al alto valor del recurso. La residencia previa no alteró la dinámica global de la contienda. Sin embargo, no se descarta la presencia de un efecto residente ligado a los beneficios directos de ser un propietario (presencia de hembras, alimento, refugio, buen estado sanitario) variables que en el presente diseño experimental fueron excluidas.

En segundo lugar, los resultados de esta Tesis sugerirían un rol diferencial de andrógenos y estrógenos en la regulación de la conducta social y agonística de machos de *A. reicherti*. Por un lado, los resultados sugieren que la adquisición de un estatus social determinado producto de una interacción agonística, modula los niveles del andrógeno 11KT, disminuyendo en aquellos que pierden acceso al recurso en disputa, mientras que no modula los niveles de E2. Esto sugeriría un rol de la hormona 11KT en el mantenimiento del estatus dominante (estatus por defecto) que permitiría a los individuos mantener las funciones reproductivas activas para capitalizar futuros eventos reproductivos. Sin embargo, la ausencia de correlación entre el nivel de agresión y el nivel de 11KT sugeriría que esta hormona no modula la conducta agresiva. Por otro lado, el abordaje farmacológico evidencia que el E2 sí interviene en el desarrollo del encuentro agonístico promoviendo la agresión, mientras que no está relacionada al estatus social en sí mismo. No obstante, es necesario ahondar en el efecto de la vía androgénica sobre la conducta agresiva mediante el bloqueo de receptores o de administración exógena, así como evaluar cambios a nivel central vinculados a la vía estrogénica durante la adquisición del estatus social.

La conducta agonística es una conducta compleja en cuya regulación se ven involucrados muchos elementos hormonales aparte de los esteroides sexuales. Los cambios comportamentales finos aquí observados remarcen a su vez, el rol activacional, modulador de andrógenos y estrógenos (ver Adkins-Regan, 2005) en la regulación del comportamiento social.

Los resultados de esta tesis indican que tanto los andrógenos como los estrógenos intervienen en la regulación de la conducta agonística entre machos de *A. reicherti*.

CONTRIBUCIONES

Comunicaciones a congresos

Reyes Blengini, F., Quintana, L., Tassino, B. 2017. Rol de la vía estrogénica en la conducta agonística del pez anual *Austrolebias reicherti* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). Primeras Jornadas Científicas “Profesor Clemente Estable”, 26 y 27 de setiembre, Anexo Palacio Legislativo, Montevideo, Uruguay. **Póster.**

Reyes Blengini, F., Quintana, L., Tassino, B. 2017. Rol de la vía estrogénica en la conducta agonística del pez anual *Austrolebias reicherti* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). I Reunión de Biología del Comportamiento del Cono Sur, 2 al 4 de agosto, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Buenos Aires, Argentina. **Póster.**

Quintana, L., Zubizarreta, L., Eastman, G., **Reyes, F.**, Minteguiaga, M., Sotelo Silveira, J. y Silva, A. 2017. Female fish fights: a new model system for the study of the hormonal control of non-breeding aggression. 21st Annual Meeting of the Society for Behavioral Neuroendocrinology, 11 al 14 de junio, Hotel Maya, Long Beach, California, USA. **Poster.**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adkins-Regan, E., 2005. Hormones and Animal Social Behavior. Princeton University Press.
- Apfelbeck, B., Goymann, W., 2011. Ignoring the challenge? Male black redstarts (*Phoenicurus ochruros*) do not increase testosterone levels during territorial conflicts but they do so in response to gonadotropin-releasing hormone. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 278, 3233–3242. doi:10.1098/rspb.2011.0098
- Arezo, M.J., Pereiro, L., Berois, N., 2005. Early development in the annual fish *Cynolebias viarius*. J. Fish Biol. 66, 1357–1370. doi:10.1111/j.1095-8649.2005.00688.x
- Arnott, G., Elwood, R.W., 2009. Assessment of fighting ability in animal contests. Anim. Behav. 77, 991–1004. doi:10.1016/j.anbehav.2009.02.010
- Ball, G.F., Balthazart, J., 2002. Neuroendocrine mechanisms regulating reproductive cycles and reproductive behavior in birds. En: Hormones, Brain and Behavior, 2, 649-798.
- Balthazart, J., Absil, P., Foidart, A., Houbart, M., Harada, N., Ball, G.F., 1996. Distribution of aromatase-immunoreactive cells in the forebrain of zebra finches (*Taeniopygia guttata*): Implications for the neural action of steroids and nuclear definition in the avian hypothalamus. J. Neurobiol. 31, 129–148. doi:10.1002/(sici)1097-4695(199610)31:2<129::aid-neu1>3.3.co;2-2
- 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, 398–410. doi:10.1111/j.1439-0310.2012.02022.x
- Beletsky, L.D., Orians, G.H., Wingfield, J.C., 2016. Steroid Hormones in Relation to Territoriality, Breeding Density, and Parental Behavior in Male Yellow-Headed Blackbirds 107, 60–68.
- Belote, D.F., Costa, W.J.E.M., 2004. Reproductive behavior patterns in three species of the South American annual fish genus *Austrolebias* Costa, 1998 (Cyprinodontiformes, Rivulidae). Boletim do Museu Nacional, 514: 1-7.
- Benson, K.E., Basolo, A.L., 2006. Male-male competition and the sword in male swordtails, *Xiphophorus helleri*. Anim. Behav. 71, 129–134. doi:10.1016/j.anbehav.2005.05.004
- Berois, N., García, G., De Sá, R.O., 2016. Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution

N. CRC Press, Boca Raton.

Berois, N., Arezo, M.J., Papa, N.G., Clivio, G.A., 2012. Annual fish: Developmental adaptations for an extreme environment. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 1, 595–602. doi:10.1002/wdev.39

Borg, B., 1994. Androgens in teleost fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 109, 219–245.

Bradbury, J.W., Vehrencamp, S.L., 1998. *Principles of Animal Communication*. Sinauer Associates. doi:10.1017/S0959270910000560.7.

Brantley, R.K., Wingfield, J.C., Bass, a H., 1993. Sex steroid levels in *Porichthys notatus*, a fish with alternative reproductive tactics, and a review of the hormonal bases for male dimorphism among teleost fishes. *Horm. Behav.* doi:10.1006/hbeh.1993.1025

Briffa, M., Hardy, I.C.W., Gammell, M.P., Jennings, D.J., Clarke, D.D., Goubault, M., 2013. Analysis of animal contest data, en: Hardy, I.C.W., Briffa, M. (Eds.), *Animal Contests*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 47–85. doi:10.1017/cbo9781139051248.006

Briffa, M., Sneddon, L.U., 2010. Contest behavior, en: Westneat, D.F., Fox, C.W. (Eds.), *Evolutionary Behavioral Ecology*. Oxford University Press, Oxford, pp. 246–265. doi:0006-3568

Cardwell, J.R., Liley, N.R., 1991. Androgen control of social status in males of a wild population of stoplight parrotfish, *Sparisoma viride* (Scaridae). *Horm. Behav.* 25, 1–18. doi:10.1016/0018-506X(91)90035-G

Cardwell, J.R., Sorensen, P.W., Van Der Kraak, G.J., Liley, N.R.R., 1996. Effect of Dominance Status on Sex Hormone Levels in Laboratory and Wild-Spawning Male Trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* 101, 333–341. doi:http://dx.doi.org/10.1006/gcen.1996.0036

Cornil, C.A., Taziaux, M., Baillien, M., Ball, G.F., Balthazart, J., 2006. Rapid effects of aromatase inhibition on male reproductive behaviors in Japanese quail. *Horm. Behav.* 49, 45–67. doi:10.1016/j.yhbeh.2005.05.003

Creel, S., Wildt, D.E., Monfort, S.L., 1993. Aggression, reproduction, and androgens in wild dwarf mongooses: a test of the challenge hypothesis. *Am. Nat.* 141, 816–825.

Culbert, B.M., Gilmour, K.M., Balshine, S., 2018. Stress axis regulation during social ascension in a group-living cichlid fish. *Horm. Behav.* 103, 121–128. doi:10.1016/j.yhbeh.2018.06.007

- Darwin, C., 1872. The expression of emotions in man and animals. John Murray, Albemarle Street, London.
- De Ridder, E., Pinxten, R., Eens, M., 2000. Experimental Evidence of a Testosterone-Induced Shift from Paternal to Mating Behaviour in a Facultatively Polygynous Songbird Stable. *Experime. Behav. Ecol. Sociobiol.* 49, 24–30.
- Demas, G.E., Cooper, M.A., Albers, H.E., Soma, K.K., 2007. Novel Mechanisms Underlying Neuroendocrine Regulation of Aggression: A Synthesis of Rodent, Avian, and Primate Studies, in: *Behavioral Neurochemistry, Neuroendocrinology and Molecular Neurobiology*. Springer, New York, pp. 337–372.
- Desjardins, J.K., Hazelden, M.R., Van Der Kraak, G.J., Balshine, S., 2006. Male and female cooperatively breeding fish provide support for the “Challenge Hypothesis.” *Behav. Ecol.* 17, 149–154. doi:10.1093/beheco/arj018
- Dijkstra, P.D., Verzijden, M.N., Groothuis, T.G.G., Hofmann, H.A., 2012. Divergent hormonal responses to social competition in closely related species of haplochromine cichlid fish. *Horm. Behav.* 61, 518–526. doi:10.1016/j.yhbeh.2012.01.011
- Dow, A.M., Ewing, A.W., Sutherland, I., 1976. Studies on the Behaviour of Cyprinodont Fish. The Temporal Patterning of Aggression in *Aphyosemion striatum* (Boulenger). *Behaviour* 59, 252–268.
- Dugatkin, L.A., Ohlsen, S.R., 1986. Contrasting Asymmetries in Value Expectation and Resource Holding Power: Effects on Attack Behaviour and Dominance in the Pumpkinseed Sunfish, *Lepomis gibbosus*. *Anim. Behav.* 39, 802–804.
- Dzieweczynski, T.L., Eklund, A.C., Rowland, W.J., 2006. Male 11-ketotestosterone levels change as a result of being watched in Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147, 184–189. doi:10.1016/j.ygcen.2005.12.023
- Earley, R.L., Hsu, Y., 2008. Reciprocity between endocrine state and contest behavior in the killifish, *Kryptolebias marmoratus*. *Horm. Behav.* 53, 442–451. doi:10.1016/j.yhbeh.2007.11.017
- Elofsson, U.O.E., Mayer, I., Damsgård, B., Winberg, S., 2000. Intermale competition in sexually mature Arctic charr: Effects on brain monoamines, endocrine stress responses, sex hormone levels, and behavior. *Gen. Comp. Endocrinol.* 118, 450–460. doi:10.1006/gcen.2000.7487

- Enquist, M., Jakobsson, S., 1986. Decision Making and Assessment in the Fighting Behaviour of *Nannacara anomala* (Cichlidae, Pisces). *Ethology* 72, 143–153. doi:10.1111/j.1439-0310.1986.tb00614.x
- Enquist, M., Leimar, O., 1983. Evolution of fighting behaviour: Decision rules and assessment of relative strength. *J. Theor. Biol.* 102, 387–410. doi:10.1016/0022-5193(83)90376-4
- Enquist, M., Leimar, O., Ljungberg, T., Mallner, Y., Segerdahl, N., 1990. A test of the sequential assessment game: fighting in the cichlid fish *Nannacara anomala*. *Anim. Behav.* 40, 1–14. doi:10.1016/S0003-3472(05)80660-8
- Fernald, R.D., 1976. The Effect of Testosterone on the Behavior and Coloration of Adult Male Cichlid Fish (*Haplochromis burtoni*, Günther). *Horm. Res.* 7, 172–178.
- Filby, A.L., Paull, G.C., Bartlett, E.J., Van Look, K.J.W., Tyler, C.R., 2010. Physiological and health consequences of social status in zebrafish (*Danio rerio*). *Physiol. Behav.* 101, 576–587. doi:10.1016/j.physbeh.2010.09.004
- Forlano, P.M., Schlinger, B.A., Bass, A.H., 2006. Brain aromatase: New lessons from non-mammalian model systems. *Front. Neuroendocrinol.* 27, 247–274. doi:10.1016/j.yfrne.2006.05.002
- Furness, A.I., 2015. The evolution of an annual life cycle in killifish: adaptation to ephemeral aquatic environments through embryonic diapause. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 91, 796–812. doi:10.1111/brv.12194
- Fuxjager, M.J., Forbes-Lorman, R.M., Coss, D.J., Auger, C.J., Auger, A.P., Marler, C.A., McEwen, B.S., 2010. Winning territorial disputes selectively enhances androgen sensitivity in neural pathways related to motivation and social aggression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 12393–12398. doi:10.1073/pnas.1001394107
- García, D., Loureiro, M., Tassino, B., 2008. Reproductive behavior in the annual fish *Austrolebias reicherti* Loureiro & García a 2004 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Neotrop. Ichthyol.* 6, 243–248. doi:10.1590/S1679-62252008000200012
- García, G., 2006. Multiple simultaneous speciation in killifishes of the *Cynolebias adloffi* species complex (Cyprinodontiformes, Rivulidae) from phylogeography and chromosome data. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 44, 75–87. doi:10.1111/j.1439-0469.2005.00346.x
- García, G., Claramunt, S., Lalanne, A.I., 2004. Genetic differentiation among annual fishes of the genus

- Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) in a biosphere reserve site from Uruguay. Environ. Biol. Fishes 70, 247–256. doi:10.1023/B:EBFI.0000033339.55585.f6
- Geniole, S.N., Bird, B.M., Ruddick, E.L., Carré, J.M., 2017. Effects of competition outcome on testosterone concentrations in humans: An updated meta-analysis. Horm. Behav. 92, 37–50. doi:10.1016/j.yhbeh.2016.10.002
- Gonçalves, D., Alpedrinha, J., Teles, M., Oliveira, R.F., 2007. Endocrine control of sexual behavior in sneaker males of the peacock blenny *Salaria pavo*: Effects of castration, aromatase inhibition, testosterone and estradiol. Horm. Behav. 51, 534–541. doi:10.1016/j.yhbeh.2007.02.003
- Gonçalves, D., Teles, M., Alpedrinha, J., Oliveira, R.F., 2008. Brain and gonadal aromatase activity and steroid hormone levels in female and polymorphic males of the peacock blenny *Salaria pavo*. Horm. Behav. 54, 717–725. doi:10.1016/j.yhbeh.2008.07.014
- Goodson, J.L., 2005. The vertebrate social behavior network: Evolutionary themes and variations. Horm. Behav. 48, 11–22. doi:10.1016/j.yhbeh.2005.02.003
- Goymann, W., 2009. Social modulation of androgens in male birds. Gen. Comp. Endocrinol. 163, 149–157. doi:10.1016/j.ygcen.2008.11.027
- Goymann, W., Landys, M.M., Wingfield, J.C., 2007. Distinguishing seasonal androgen responses from male-male androgen responsiveness-Revisiting the Challenge Hypothesis. Horm. Behav. 51, 463–476. doi:10.1016/j.yhbeh.2007.01.007
- Grafen, A., 1987. The logic of divisively asymmetric contests: respect for ownership and the desperado effect. Anim. Behav. 35, 462–467. doi:10.1016/S0003-3472(87)80271-3
- Hay, A.C., Pankhurst, N.W., 2005. Effect of paired encounters on plasma androgens and behaviour in males and females of the spiny damselfish *Acanthochromis polyacanthus*. Mar. Freshw. Behav. Physiol. 38, 127–138. doi:10.1080/10236240500125528
- Heimovics, S.A., Prior, N.H., Maddison, C.J., Soma, K.K., 2012. Rapid and widespread effects of 17 β -estradiol on intracellular signaling in the male songbird brain: a seasonal comparison. Endocrinology 153, 1364–1376. doi:10.1210/en.2011-1525
- Heimovics, S.A., Trainor, B.C., Soma, K.K., 2015. Rapid Effects of Estradiol on Aggression in Birds and Mice: The Fast and the Furious. Integr. Comp. Biol. 55, 281–293. doi:10.1093/icb/icv048

- Higby, M., Beulig, A., Dwyer, J., 1991. Exogenous testosterone and social experience each enhance the development of aggressive behavior in *Cyprinodon variegatus*. *Aggress. Behav.* 17, 229–239. doi:10.1002/1098-2337(1991)17:4<229::AID-AB2480170406>3.0.CO;2-M
- Hirschenhauser, K., Oliveira, R.F., 2006. Social modulation of androgens in male vertebrates: Meta-analyses of the challenge hypothesis. *Anim. Behav.* 71, 265–277. doi:10.1016/j.anbehav.2005.04.014
- Hirschenhauser, K., Taborsky, M., Oliveira, T., Canário, A.V.M., Oliveira, R.F., 2004. A test of the “challenge hypothesis” in cichlid fish: Simulated partner and territory intruder experiments. *Anim. Behav.* 68, 741–750. doi:10.1016/j.anbehav.2003.12.015
- Hsu, Y., Earley, R.L., Wolf, L.L., 2006. Modulation of aggressive behaviour by fighting experience: Mechanisms and contest outcomes. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 81, 33–74. doi:10.1017/S146479310500686X
- Huffman, L.S., Mitchell, M.M., O’Connell, L.A., Hofmann, H.A., 2012. Hormones and Behavior Rising StARs: Behavioral, hormonal, and molecular responses to social challenge and opportunity. *Horm. Behav.* 61, 631–641. doi:10.1016/j.yhbeh.2012.02.016
- Huffman, L.S., O’Connell, L.A., Hofmann, H.A., 2013. Aromatase regulates aggression in the African cichlid fish *Astatotilapia burtoni*. *Physiol. Behav.* 112–113, 77–83. doi:10.1016/j.physbeh.2013.02.004
- Huntingford, F.A., Turner, A., 1987. *Animal Conflict*. Chapman and Hall Ltd, London.
- Jalabert, C., Quintana, L., Pessina, P., Silva, A., 2015. Extra-gonadal steroids modulate non-breeding territorial aggression in weakly electric fish. *Horm. Behav.* 72, 60–67. doi:10.1016/j.yhbeh.2015.05.003
- Just, W., Morris, M.R., 2003. The Napoleon Complex: why smaller males pick fights. *Evol. Ecol.* 17, 509–522. doi:10.1023/B
- Ketterson, E.D., Nolan, V.J., 1992. Hormones and Life Histories : An Integrative Approach. *Am. Nat.* 140, S33–S62.
- Kime, D.E., 1993. “Classical” and “non-classical” reproductive steroids in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 3, 160–180.

- King, J.A., 1973. The Ecology of Aggressive Behavior. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 4, 117–138.
- Kokko, H., 2013. Dyadic contests: modelling fights between two individuals, en: Hardy, I.C.W., Briffa, M. (Eds.), *Animal Contests*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 5–32.
doi.org/10.1017/CBO9781139051248.004
- Li, C.-Y., Huang, S.-P., Garcia, M., Fuller, A., Hsu, Y., Earley, R.L., 2018. Sexual phenotype drives variation in endocrine responses to social challenge in a quasi-clonal animal. *R. Soc. Open Sci.* 5, 180002. doi:10.1098/rsos.180002
- Liley, N.R., Kroon, F.J., 1995. Male dominance, plasma hormone concentrations, and availability of milt in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Zool.* 73, 826–836. doi:10.1139/z95-097
- Lincoln, G.A., Guinness, F., Short, R. V., 1972. The way in which testosterone controls the social and sexual behavior of the red deer stag (*Cervus elaphus*). *Horm. Behav.* 3, 375–396.
doi:10.1016/0018-506X(72)90027-X
- Lorenz, K., 1963. *On Aggression*. Routledge Classics, London.
- Loureiro, M., De Sá, R.O., 2016. Diversity of Aplocheiloidei, en: Berois, N., García, G., De Sá, R.O. (Eds.), *Annual Fishes: Life History, Strategy, Diversity, and Evolution*. CRC Press, Boca Raton, pp. 3–32.
doi:10.1201/b19016
- Loureiro, M., García, G., 2008. *Austrolebias reicherti* Loureiro & García, a valid species of annual fish (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from Uruguay. *Zootaxa* 1–15.
- Loureiro, M., García, G., 2006. Transgresiones y regresiones marinas en la costa atlántica y lagunas costeras de Uruguay: efectos sobre los peces continentales, en: Menafrá, R., Rodríguez-Gallego, L., Scarabino, F., Conde, D. (Eds.), *Bases Para La Conservación y El Manejo de La Costa Uruguaya. Vida Silvestre Uruguay*, Montevideo, pp. 545–555.
- Lynn, S.E., Hahn, T.P., Breuner, C.W., 2007. Free-Living Male Mountain White-Crowned Sparrows Exhibit Territorial Aggression Without Modulating Total or Free Plasma Testosterone. *Condor* 109, 173. doi:10.1650/0010-5422(2007)109[173:fmmwse]2.0.co;2
- Maruska, K.P., Fernald, R.D., 2010. Behavioral and physiological plasticity: Rapid changes during social ascent in an African cichlid fish. *Horm. Behav.* 58, 230–240. doi:10.1016/j.yhbeh.2010.03.011

- Maynard Smith, J., 1974. The theory of games and the evolution of animal conflicts. *J. Theor. Biol.* 47, 209–221. doi:10.1016/0022-5193(74)90110-6
- Maynard Smith, J., Parker, G.A., 1976. The logic of asymmetric conflicts. *Anim. Behav.* 24, 159–175.
- Maynard Smith, J., Price, G.R., 1973. The logic of animal conflict. *Nature* 246, 16–18.
doi:10.1038/246421a0
- McCarthy, M.M., De Vries, G.J., Forger, N.G., 2009. Sexual Differentiation of the Brain: Mode, Mechanisms, and Meaning, en: Pfaff, D., Arnold, A.P., Etgen, A.M., Fahrbach, S.E., Rubin, R.T. (Eds.), *Hormones, Brain and Behavior*. Elsevier, San Diego, pp. 1707–1744.
- Mills, S.C., O'Donnell, J.L., Bernardi, G., Beldade, R., 2018. Natural endocrine profiles of the group-living skunk anemonefish *Amphiprion akallopisos* in relation to their size-based dominance hierarchy. *J. Fish Biol.* 92, 773–789. doi:10.1111/jfb.13559
- Morandini, L., Honji, R.M., Ramallo, M.R., Moreira, R.G., Pandolfi, M., 2014. The interrenal gland in males of the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*: Relationship with stress and the establishment of social hierarchies. *Gen. Comp. Endocrinol.* 195, 88–98. doi:10.1016/j.ygcen.2013.10.009
- Moretz, J.A., 2003. Aggression and RHP in the Northern Swordtail Fish, *Xiphophorus cortezi*: The Relationship between Size and Contest Dynamics in Male-Male Competition. *Ethology* 109, 995–1008. doi:10.1046/j.0179-1613.2003.00938.x
- Morris, M.R., Gass, L., Ryan, M.J., 1995. Assessment and Individual Recognition of Opponents in the Pygmy Swordtails *Xiphophorus nigrensis* and *X. multilineatus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 37, 303–310.
- Naftolin, F., Ryan, K.J., Davies, I.J., Reddy, V. V, Flores, F., Petro, Z., Kuhn, M., 1975. The Formation of Estrogens by Central Neuroendocrine Tissues. *Proc. 1974 Laurentian Horm. Conf.* 31, 295–319. doi:10.1016/b978-0-12-571131-9.50012-8
- Neat, F.C., Mayer, I., 2002. Plasma concentrations of sex steroids and fighting in male *Tilapia zillii*. *J. Fish Biol.* 54, 695–697. doi:10.1006/jfbi.1998.0897
- Nelson, J.S., Grande, T.C., Wilson, M.V.H., 2016. *Fishes of the World*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- Nelson, R.J., 2011. *An introduction to Behavioral Endocrinology* (4th ed.). Sinauer Associates, Inc.,

Nelson, R.J., 2006. *Biology of Aggression*. Oxford University Press, Oxford.

O'Connell, L.A., Ding, J.H., Hofmann, H.A., 2013. Sex differences and similarities in the neuroendocrine regulation of social behavior in an African cichlid fish. *Horm. Behav.* 64, 468–476.
doi:10.1016/j.yhbeh.2013.07.003

O'Connell, L.A., Hofmann, H.A., 2012. Social status predicts how sex steroid receptors regulate complex behavior across levels of biological organization. *Endocrinology* 153, 1341–1351.
doi:10.1210/en.2011-1663

O'Connell, L.A., Hofmann, H.A., 2011a. The Vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: A comparative synthesis. *J. Comp. Neurol.* 519, 3599–3639. doi:10.1002/cne.22735

O'Connell, L.A., Hofmann, H.A., 2011b. Genes, hormones, and circuits: An integrative approach to study the evolution of social behavior. *Front. Neuroendocrinol.* 32, 320–335.
doi:10.1016/j.yfrne.2010.12.004

Ogawa, S., Lubahn, D.B., Korach, K.S., Pfaff, D.W., 1997. Behavioral Effects of Estrogen Receptor Gene Disruption in Male Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 1476–1481.

Oliveira, R.F., 2004. Social Modulation of Androgens in Vertebrates: Mechanisms and Function. *Adv. Study Behav.* doi:10.1016/S0065-3454(04)34005-2

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*. *Horm. Behav.* 30, 2–12.
doi:10.1006/hbeh.1996.0002

Oliveira, R.F., Hirschenhauser, K., Carneiro, L.A., Canario, A.V.M., 2002. Social modulation of androgen levels in male teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 132, 203–215.
doi:10.1016/S1096-4959(01)00523-1

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. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 276, 2249–2256.
doi:10.1098/rspb.2009.0132

Øverli, Ø., Harris, C.A., Winberg, S., 1999. Short-Term Effects of Fights for Social Dominance and the Establishment of Dominant-Subordinate Relationships on Brain Monoamines and Cortisol in

- Rainbow Trout. Brain. Behav. Evol. 54, 263–275. doi:10.1159/000006627
- Oyegbile, T.O., Marler, C.A., 2005. Winning fights elevates testosterone levels in California mice and enhances future ability to win fights. Horm. Behav. 48, 259–267.
doi:10.1016/j.yhbeh.2005.04.007
- Pankhurst, N.W., Barnett, C.W., 1993. Relationship of population density, territorial interaction and plasma levels of gonadal steroids in spawning male demoiselles *Chromis dispilus* (pisces: Pomacentridae). Gen. Comp. Endocrinol. 90, 168–176. doi:10.1006/gcen.1993.1071
- Parikh, V.N., Clement, T.S., Fernald, R.D., 2006. Androgen level and male social status in the African cichlid, *Astatotilapia burtoni*. Behav. Brain Res. 166, 291–295. doi:10.1016/j.bbr.2005.07.011
- Parker, G.A., 1974. Assessment strategy and the evolution of fighting behaviour. J. Theor. Biol. 47, 223–243. doi:10.1016/0022-5193(74)90111-8
- Passos, C., 2013. *Austrolebias*: un modelo para explorar la selección sexual. Tesis doctoral, Universidad de la República.
- Passos, C., Reyes, F., Tassino, B., Rosenthal, G.G., González, A., 2013a. Female annual killifish *Austrolebias reicherti* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) attend to male chemical cues. Ethology 119, 891–897. doi:10.1111/eth.12129
- Passos, C., Tassino B., C. Jalabert, L. Quintana, Langevin, K., Silva, A., 2017. Estrés y reproducción en ambientes efímeros. Primera Reunión de Biología del Comportamiento del Cono Sur, Buenos Aires
- Passos, C., Tassino, B., Loureiro, M., Rosenthal, G.G., 2013b. Intra- and intersexual selection on male body size in the annual killifish *Austrolebias charrua*. Behav. Processes 96, 20–26.
doi:10.1016/j.beproc.2013.01.008
- Passos, C., Tassino, B., Reyes, F., Rosenthal, G.G., 2014. Seasonal variation in female mate choice and operational sex ratio in wild populations of an annual fish, *Austrolebias reicherti*. PLoS One 9. doi:10.1371/journal.pone.0101649
- Passos, C., Tassino, B., Rosenthal, G.G., Reichard, M., 2016. Reproductive Behavior and Sexual Selection in Annual Fishes, en: Berois, N., García, G., De Sá, R.O. (Eds.), Annual Fishes: Life History, Strategy, Diversity, and Evolution. CRC Press, Boca Raton, pp. 207–229.

- Pickering, A.D., Pottinger, T.G., Carragher, J., Sumpter, J.P., 1987. The effects of acute and chronic stress on the levels of reproductive hormones in the plasma of mature male brown trout, *Salmo trutta* L. Gen. Comp. Endocrinol. 68, 249–259. doi:10.1016/0016-6480(87)90036-0
- Podrabsky, J.E., Carpenter, J.F., Hand, S.C., 2001. Survival of water stress in annual fish embryos: dehydration avoidance and egg envelope amyloid fibers. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 280, R123-31. doi:10.1152/ajpregu.2001.280.1.R123
- Quiring, D.P., 1944. Transplantation of testes (by Berthold, A. A.), Bull. Hist. Med. 16, 399–401
- Ramallo, M.R., Birba, A., Honji, R.M., Morandini, L., Moreira, R.G., Somoza, G.M., Pandolfi, M., 2015. A multidisciplinary study on social status and the relationship between inter-individual variation in hormone levels and agonistic behavior in a Neotropical cichlid fish. Horm. Behav. 69, 139–151. doi:10.1016/j.yhbeh.2015.01.008
- Ramallo, M.R., Morandini, L., Birba, A., Somoza, G.M., Pandolfi, M., 2017. From molecule to behavior: Brain aromatase (cyp19a1b) characterization, expression analysis and its relation with social status and male agonistic behavior in a Neotropical cichlid fish. Horm. Behav. 89, 176–188. doi:10.1016/j.yhbeh.2017.02.005
- Remage-Healey, L., Bass, A.H., 2006. From social behavior to neural circuitry: Steroid hormones rapidly modulate advertisement calling via a vocal pattern generator. Horm. Behav. 50, 432–441. doi:10.1016/j.yhbeh.2006.05.007
- Reyes, F., Tassino, B., Passos, C., 2018. Females of the annual killifish *Austrolebias reicherti* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) recognize conspecific mates based upon chemical cues. Behav. Processes 155. doi:10.1016/j.beproc.2017.08.007
- Ribowski, A., Franck, D., 1993a. Demonstration of Strength and Concealment of Weakness in Escalating Fights of Male Swordtails (*Xiphophorus hefleri*). Ethology 274, 265–274.
- Ribowski, A., Franck, D., 1993b. Subordinate swordtail males escalate faster than dominants: A failure of the social conditioning principle. Aggress. Behav. 19, 223–229. doi:10.1002/1098-2337(1993)19:3<223::AID-AB2480190307>3.0.CO;2-T
- Rohwer, S., Wingfield, J.C., 1981. A Field Study of Social Dominance, Plasma Levels of Luteinizing Hormone and Steroid Hormones in Wintering Harris' Sparrows. Z. Tierpsychol. 57, 173–183. doi:10.1111/j.1439-0310.1981.tb01321.x

- Sakakura, Y., Tagawa, M., Tsukamoto, K., 1998. Whole-Body Cortisol Concentrations and Ontogeny of Aggressive Behavior in Yellowtail (*Seriola quinqueradiata* Temminck & Schlegel; Carangidae). Gen. Comp. Endocrinol. 109, 286–292.
- Sano, K., Tsuda, M.C., Musatov, S., Sakamoto, T., Ogawa, S., 2013. Differential effects of site-specific knockdown of estrogen receptor α in the medial amygdala, medial pre-optic area, and ventromedial nucleus of the hypothalamus on sexual and aggressive behavior of male mice. Eur. J. Neurosci. 37, 1308–1319. doi:10.1111/ejn.12131
- Scaia, M.F., Morandini, L., Noguera, C.A., Trudeau, V.L., Somoza, G.M., Pandolfi, M., 2018. Can estrogens be considered as key elements of the challenge hypothesis? The case of intrasexual aggression in a cichlid fish. Physiol. Behav. 194, 481–490. doi:10.1016/j.physbeh.2018.06.028
- Schlinger, B.A., Callard, G. V., 1990. Aromatization mediates aggressive behavior in Quail. Gen. Comp. Endocrinol. 79, 39–53. doi:10.1016/0016-6480(90)90086-2
- Schlinger, B.A., Callard, G. V., 1989a. Estrogen Receptors in Quail Brain: A Functional Relationship to Aromatase and Aggressiveness. Biol. Reprod. 40, 268–275.
- Schlinger, B.A., Callard, G. V., 1989b. Aromatase activity in quail brain: Correlation with aggressiveness. Endocrinology 124, 437–443. doi:10.1210/endo-124-1-437
- Serra, W.S., Loureiro, M., 2018. *Austrolebias queguay* (Cyprinodontiformes, Rivulidae), a new species of annual killifish endemic to the lower Uruguay river basin. Zoosystematics Evol. 94, 547–556. doi:10.3897/zse.94.29115
- Sessa, A.K., Harris, R.M., Hofmann, H.A., 2013. Sex steroid hormones modulate responses to social challenge and opportunity in males of the monogamous convict cichlid, *Amatitlania nigrofasciata*. Gen. Comp. Endocrinol. 189, 59–65. doi:10.1016/j.ygcen.2013.04.031
- Shaw, K., 2018. Aromatase expression and function in the brain and behavior: A comparison across communication systems in teleosts. J. Chem. Neuroanat. 94, 139–153. doi:10.1016/j.jchemneu.2018.10.004
- 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. J. Exp. Biol. 216, 2412–20. doi:10.1242/jeb.082180
- Simon, N.G., Lu, S., 2006. Androgens and Aggression, en: Nelson, R.J. (Ed.), Biology of Aggression.

Oxford University Press, New York, p. 529.

Simpson, B.R.C., 1979. The phenology of annual killifishes. Symposia of the Zoological Society of London, 44, pp.243–261.

Stiver, K.A., Harris, R.M., Townsend, J.P., Hofmann, H.A., Alonzo, S.H., 2015. Neural Gene Expression Profiles and Androgen Levels Underlie Alternative Reproductive Tactics in the Ocellated Wrasse, *Symphodus ocellatus*. *Ethology* 121, 152–167. doi:10.1111/eth.12324

Strobl-Mazzulla, P.H., Moncaut, N.P., López, G.C., Miranda, L.A., Canario, A.V.M., Somoza, G.M., 2005. Brain aromatase from pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis*): cDNA cloning, tissue expression, and immunohistochemical localization. *Gen. Comp. Endocrinol.* 143, 21–32. doi:10.1016/j.ygcen.2005.02.026

Summers, T., Summers, C., Moore, M., Korzan, W., Woodley, S., Ronan, P., Höglund, E., Watt, M., Greenberg, N., 2003. Temporal patterns of limbic monoamine and plasma corticosterone response during social stress. *Neuroscience* 116, 553–563. doi:10.1016/s0306-4522(02)00708-x

Tassino, B., Passos, C., Jalabert, C., De Giacomi, S., Quintana, L., Silva, A., 2016. Stress and reproduction in ephemeral environments: tolerance or positive regulation? XII Congress International Society for Neuroethology, Montevideo.

Tassino, B., Passos, C., Loureiro, M., Franco-Trecu, V., 2017. Territorialidad y estabilidad de la dominancia en el pez annual *Austrolebias reicherti*. Primera Reunión de Biología del Comportamiento del Cono Sur, Buenos Aires.

Taylor, P.W., Elwood, R.W., 2003. The mismeasure of animal contests. *Anim. Behav.* 65, 1195–1202. doi:10.1006/anbe.2003.2169

Tian, H., Wu, P., Wang, W., Ru, S., 2015. Disruptions in aromatase expression in the brain, reproductive behavior, and secondary sexual characteristics in male guppies (*Poecilia reticulata*) induced by tributyltin. *Aquat. Toxicol.* 162, 117–125. doi:10.1016/j.aquatox.2015.03.015

Trainor, B.C., Kyomen, H.H., Marler, C.A., 2006. Estrogenic encounters: How interactions between aromatase and the environment modulate aggression. *Front. Neuroendocrinol.* 27, 170–179. doi:10.1016/j.yfrne.2005.11.001

Trainor, B.C., Nelson, R.J., Lin, S., Finy, M.S., Rowland, M.R., 2007. Photoperiod reverses the effects of estrogens on male aggression via genomic and nongenomic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104,

9840–9845. doi:10.1073/pnas.0701819104

Trainor, B.C., Sima Finy, M., Nelson, R.J., 2008. Rapid effects of estradiol on male aggression depend on photoperiod in reproductively non-responsive mice. *Horm. Behav.* 53, 192–199.

doi:10.1016/j.yhbeh.2007.09.016

Turner, G.F., Huntingford, F.A., 1986. A problem for game theory analysis: assessment and intention in male mouthbrooder contests. *Anim. Behav.* 34, 961–970. doi:10.1016/S0003-3472(86)80155-5

Villars, T.A., 1983. Hormones and Aggressive Behavior in Teleost Fishes, en: Svare, B.B. (Ed.), *Hormones and Aggressive Behavior*. Plenum Press, New York, pp. 261–85. doi:10.1007/978-1-4613-3521-4

Volff, J.N., 2005. Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity (Edinb.)*. 94, 280–294. doi:10.1038/sj.hdy.6800635

Vullioud, P., Bshary, R., Ros, A.F.H., 2013. Intra- and interspecific aggression do not modulate androgen levels in dusky gregories, yet male aggression is reduced by an androgen blocker. *Horm. Behav.* 64, 430–438. doi:10.1016/j.yhbeh.2013.06.007

Wade, J., Schlinger, B.A., Hodges, L., Arnold, A.P., 1994. Fadrozole: a potent and specific inhibitor of aromatase in the Zebra Finch brain. *Gen. Comp. Endocrinol.* 94, 53–61. doi:10.1006/gcen.1994.1059

Wingfield, J.C., Ball, G.F., Dufty, A.M.J., Hegner, R.E., Ramenofsky, M., 1987. Testosterone and aggression in Birds. *Sigma Xi, Sci. Res. Honor Soc.* 75, 602–608.

Wingfield, J.C., Hahn, T.P., 1994. Testosterone and territorial behavior in sedentary and migratory sparrows. *Anim. Behav.* 47, 77–89.

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. *Am. Nat.* 136, 829–846.

Wingfield, J.C., Lynn, S.E., Soma, K.K., 2001. Avoiding the “costs” of testosterone: Ecological bases of hormone-behavior interactions. *Brain. Behav. Evol.* 57, 239–251. doi:10.1159/000047243

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, en:
Nelson, R.J. (Ed.), *Biology of Aggression*. Oxford University Press, New York, p. 529.

Wingfield, J.C., Sapolsky, R.M., 2003. Reproduction and Resistance to Stress: When and How. *J. Neuroendocrinol.* 15, 711–724.

Wourms, J.P., 1972. Duration in the Eggs of Annual Fishes. *J. Exp. Zool.* 182, 389–414.
doi:10.1016/0002-9149(87)91006-X