

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA – FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA Y EMBRIOLOGIA



“Análisis del rol de isotocina sobre el comportamiento eléctrico y locomotor de *Gymnotus omarorum*”.

Ciclo de Metodología Científica II – 2019

Grupo de investigación: 89

Investigadores:

Añasco, Lara

Malán, Lucía

Mosteiro, Lucía

Padín, Valentina

Robalez, Matías

Secco, Eugenia

Orientadora:

Dra. Paula Pouso,

Depto Histología y Embriología, Facultad de Medicina

Co - orientadora

Dra. Rossana Perrone, Facultad de Psicología-IIBC

Montevideo, octubre 2019

ÍNDICE DE CONTENIDO

<i>RESUMEN</i>	2
<i>ABSTRACT</i>	3
<i>INTRODUCCIÓN</i>	4
<i>OBJETIVOS</i>	10
<i>METODOLOGÍA</i>	11
<i>RESULTADOS</i>	14
<i>DISCUSIÓN</i>	21
<i>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</i>	24
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	25
<i>AGRADECIMIENTOS</i>	29

RESUMEN

El comportamiento social en peces teleósteos es modulado por nonapéptidos hipotalámicos como lo son la isotocina (IT) y vasotocina (AVT) que son producidos en el área preóptica (APO); los mismos son homólogos a los nonapéptidos hipotalámicos en mamíferos: oxitocina (OT) y vasopresina (AVP) en quienes además de cumplir con funciones fisiológicas, intervienen en el comportamiento social.

Gymnotus omarorum es un pez eléctrico que emite descargas eléctricas (DOE) controladas por el núcleo electromotor bulbar (NEB). En esta especie, altamente agresiva todo el año, el AVT modula la frecuencia basal (FB) de la DOE y el comportamiento agresivo. Recientemente se describieron neuronas IT(+) en el APO y proyecciones IT(+) en el NEB. Sin embargo no se conoce el rol de la IT en la FB de la DOE ni en el comportamiento agonístico de la especie. Este trabajo exploró el posible efecto diurno de la IT sobre la FB de la DOE y despliegues locomotores en individuos aislados no reproductivos de *Gymnotus omarorum*. Los animales fueron inyectados por vía intraperitoneal con: IT; IT + antagonista IT (Atosiban, (AT)); IT + antagonista AVT (Manning compound); AVT +AT; y salino. El registro eléctrico y locomotor se realizó una hora antes y dos horas después de la inyección. Por primera vez encontramos que únicamente la inyección con AVT+ AT provocó un aumento significativo de la FB de la DOE respecto a todos los tratamientos. Los resultados sugieren que la IT endógena puede tener efecto sobre la FB de la DOE. Se explorarán en el futuro ensayos farmacológicos con AT en individuos aislados y durante el comportamiento agonístico.

Palabras clave: comportamiento social, isotocina, peces eléctricos.

ABSTRACT

The social behavior in teleost fish is modulated by hypothalamic nonapeptides such as isotocin (IT) and vasotocin (AVT) that are produced in the preoptic area (POA); which are homologous to oxytocin and vasopressin in mammals.

Gymnotus omarorum is an electric fish that emits electric discharges (EODs) controlled by a medullary electromotor nucleus, the pacemaker (PM). In this species, highly aggressive throughout the year, the AVT modulates the EOD rate and the aggressive behavior. Recently, IT (+) neurons were described in the POA, and IT (+) projections nearby the PM. However, the role of IT on EOD rate or in the agonistic behavior of the species is still unknown. This work explored the diurnal effect of IT on the EOD rate and locomotor displays in non-breeding and isolated *Gymnotus omarorum*. Fish were injected intraperitoneally with: IT; IT + IT antagonist (Atosiban, (AT)); IT + AVT antagonist (Manning compound); AVT + AT; and saline. The electrical and locomotor recordings were measured one hour before and two hours after the injection. For the first time we found that only the injection with AVT + AT caused a significant increase in the EOD rate compared to all other treatments. The results suggest that endogenous IT may have an effect on the EOD rate. It will be explored in the future pharmacological trials about the modulation EOD rate by AT and during agonistic behavior.

Keyword: social behavior, isotocin, electric fish.

INTRODUCCIÓN

COMPORTAMIENTO SOCIAL

El comportamiento social, según su definición más clásica propuesta por Niko Tinbergen en 1953, comprende las interacciones entre individuos de la misma especie, donde alguno de ellos obtiene un beneficio. Todas las especies animales a lo largo de la evolución han desarrollado alguna conducta que les permite interactuar con individuos de la misma especie, ya sea para establecer vínculos y conformar un grupo, o para mantenerse solitario y establecer relaciones intermitentemente, por ejemplo, para reproducirse.

Es a partir de la observación de modelos animales que se han descrito dos grandes tipos de comportamiento social. Por un lado, el comportamiento reproductivo, que tiene como objetivo la unión de los gametos para perpetuar la especie e intercambiar genes y que involucra conductas como cortejo y apareamiento de machos y hembras. (Tinbergen, 1953). Por otro lado, el comportamiento agonístico se trata de cualquier comportamiento combativo entre dos individuos de la misma especie que compiten por un recurso. El mismo está influenciado por una variedad de factores ambientales y basados en la experiencia de cada individuo, siendo muchas veces incluso más determinantes que las propias competencias motoras y anatómicas (Nelson, 2006).

BASES NEURALES DEL COMPORTAMIENTO SOCIAL

Red cerebral del comportamiento social (RCCS)

Según planteó Newman en 1999, las áreas del cerebro involucradas en el control del comportamiento social constituyen una red de núcleos altamente conservada. Para los mamíferos se sugirió originariamente la existencia de seis nodos o núcleos: la amígdala medial extendida, el tabique lateral, el área preóptica (APO), el hipotálamo anterior, el hipotálamo ventromedial y el mesencéfalo. Cada uno de estos núcleos está implicado en el control de múltiples formas de socialización y comportamientos (Newman, 1999). Además, dichos núcleos también están conectados de manera bidireccional (Risold y Swanson, 1997; Coolen et al., 1998; Dong y Swanson, 2004), y cada área contiene receptores de esteroides sexuales que son esenciales para la diferenciación sexual y coordinación temporal del comportamiento social (Choleris, 2013). A cada situación conductual particular le corresponde un patrón distribuido de

actividad en la RCCS, moldeado por moduladores endógenos (hormonas esteroideas, neuropéptidos hipotalámicos) y exógenos (factores ambientales, contexto social).

Neuropéptidos hipotalámicos en mamíferos

Debido a importantes estudios previos, se ha encontrado que determinados neuropéptidos que se producen en áreas hipotalámicas que pertenecen a la RCCS juegan un importante rol en la modulación del comportamiento social; estos son la oxitocina OT y AVP (Olfield y Hofmann, 2010; Kelly y Goodson, 2014). Los mismos pertenecen a la superfamilia de los nonapéptidos, y difieren en tan solo dos residuos de aminoácidos, específicamente en la tercera y octava posición (Caldwell et al 2008). En mamíferos son producidos mayoritariamente por los núcleos supraóptico (SON) y paraventricular del hipotálamo (PVN). Las prolongaciones de las neuronas de estos núcleos hipotalámicos llegan a la neurohipófisis desde donde se liberan los neuropéptidos al torrente sanguíneo para cumplir con las funciones periféricas. Por lo tanto, se puede decir que estos nonapéptidos tienen acción tanto a nivel central (vía proyecciones neuronales) como a nivel periférico (vía torrente sanguíneo) (Fricker, 2012). También ha sido descrita su presencia a nivel del líquido cefalorraquídeo (Dogterom et al., 1977). Las áreas que forman parte de la RCCS además intervienen en comportamientos no sociales e incluso en otras funciones que no tienen que ver directamente con el comportamiento, un claro ejemplo de esto es la acción periférica de la AVP y la OT (López Ramírez et al 2014). La importancia de estudiar el rol de estos nonapéptidos, radica en que un fragmento de su familia peptídica se encuentra altamente conservada en diferentes filos del reino animal y a lo largo de la evolución en el tiempo, lo que ha permitido realizar investigaciones en animales vertebrados e invertebrados y así extrapolar los hallazgos a los seres humanos para avanzar en la comprensión de las conductas sociales.

Vasopresina (AVP)

A pesar de que la AVP es un importante modulador del comportamiento social, son más conocidas sus importantes acciones periféricas, tales como la vasoconstricción y la antidiuresis (López - Ramírez, 2014). En mamíferos la AVP se produce mayoritariamente en las áreas: PVN y SON. Estudios comportamentales han descrito la importante función de la AVP en el comportamiento social. En humanos, estudios realizados en sujetos con trastornos de la personalidad, se encontraron altas concentraciones de AVP en el líquido cefalorraquídeo (Coccaro et al., 1998). Además existen comparaciones muy interesantes entre especies de vertebrados (una definida como agresiva y la otra no) en donde se realiza esta misma

observación (altas y bajas concentraciones de AVP respectivamente) (Thompson & Walton, 2013).

Se han identificado tres subtipos de receptores para AVP. El AVPR1 se encuentra ampliamente distribuido a nivel central, por lo que es el blanco de experimentos con antagonistas de dicho receptor tal como es el Manning Compound (MC) (Thompson & Walton 2013).

Oxitocina (OT)

En mamíferos, la OT es un nonapéptido hipotalámico sintetizado principalmente en los SON y PVN (Choleris, 2013). Su rol ha sido primariamente descrito a nivel periférico, donde cumple funciones importantes durante el parto y la lactancia, como resultado de su liberación en el sistema circulatorio desde terminales nerviosas en la hipófisis posterior. Por otro lado, existen sitios de síntesis y liberación dentro del sistema nervioso central donde la OT actúa como un neuromodulador con un diverso rango de funciones tanto en hombres como en mujeres, estas incluyen cuidado maternal, comportamiento afiliativo y sexual (Insel y Shapiro, 1992), memoria social (Dluzen et al, 1988) y aseo.

En cuanto al comportamiento social, se ha visto que la OT es capaz de disminuir reacciones agresivas ya que al administrarla de manera exógena, se observa esta modificación en el comportamiento de los roedores a la hora de enfrentarse ante un intruso (Calcagnoli, 2013). Además estudios experimentales han demostrado una clara actividad de la OT en la reducción del estrés, siendo capaz de disminuir la liberación de cortisol, mediando la respuesta a la amenaza, reduciendo la hostilidad y la agresión en determinadas situaciones (Ring, 2005). También se han observado ratones “knockout” de OT con niveles de agresión notablemente superiores en una interacción con ratones de otra cepa (Hattori, 2015). Sin embargo, estudios más recientes han determinado un importante papel de la OT en el establecimiento y la regulación de la agresión social, específicamente se ha observado que en roedores induce agresión materna como un mecanismo de defensa de las crías ante amenazas externas (Caughey, 2011). Esto ha dado lugar a la gran interrogante de si la OT interviene regulando el comportamiento social desplazándolo hacia un comportamiento agonístico, al menos en determinadas situaciones y de ser así cómo acontecería dicha modulación.

Hasta el momento, solo se ha identificado un receptor de OT (OTR) que pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteína G y ha sido localizado tanto a nivel periférico como a nivel central. A nivel periférico se distribuye en órganos como útero, ovario, riñón, corazón,

endotelio vascular, entre otros (López-Ramírez, 2014) mientras que, a nivel central, se han hallado sitios de unión específico a OT en numerosas áreas cerebrales que incluyen el núcleo olfatorio anterior, grupos celulares del tubérculo olfatorio, surco lateral del cerebro, estria terminal, núcleo ventromedial hipotalámico, núcleo paraventricular del hipotálamo, amígdala central, mesencéfalo, núcleo accumbens, subículo ventral del hipocampo y región del caudoputamen (Choleris, 2013), así como en la médula espinal (López- Ramírez, 2014).

Como se mencionó anteriormente, hoy sólo se conoce un receptor para la OT y dos de sus antagonistas conocidos son: AT y un análogo de ornitina vasotocina (OVTA). El Atosiban se indica para retrasar el parto pretérmino; sin embargo, ambos tienen leve afinidad por el receptor de AVP (López Ramírez et al 2014), por lo que discernir claramente los efectos del mismo constituye un verdadero desafío para la neurociencia.

PECES ELÉCTRICOS

Los peces eléctricos constituyen un excelente modelo para llevar a cabo el estudio de los fundamentos neuroendocrinos del comportamiento, ya que poseen órganos eléctricos (Mago-Leccia, 1994) capaces de generar descargas eléctricas (descarga de órgano eléctrico, DOE) de baja intensidad que interviene por un lado en la electrolocalización en el ambiente y por el otro en la electrocomunicación con sus pares (Lissman 1958, Bastian 1986). Por lo tanto estas señales eléctricas son consideradas señales sociales y se pueden ver influenciadas por otras variables modificables. Estas funciones además son posibles gracias a que los peces eléctricos poseen electrorreceptores específicos para detectar corrientes con propiedades eléctricas diferentes a las del agua circundante (figura 1).

El patrón de emisión de la DOE, es el resultado de la actividad del núcleo electromotor bulbar (NEB), el cual está constituido por dos tipos de células, las neuronas marcapaso (MP) que son capaces de descargar espontáneamente, y las neuronas relé que proyectan hacia la médula espinal (Caputi et al., 2005). En la mayoría de los peces eléctricos pertenecientes al orden gymnotiforme, el órgano eléctrico está formado por electrocitos (células de origen miogénico), invadidas por electromotoneuronas espinales. Éste patrón de invasión-activación de los electrocitos determinan la forma de la DOE, mientras que la densidad y tamaño de estas células determinan la amplitud de la DOE (Caputi et al., 2005). El patrón de descarga modifica la frecuencia y forma de onda según el entorno en el que se encuentra el pez. Estas modificaciones se consideran señales eléctricas sociales (SESS) (Macadar et al. 2007). Es entonces que dichas

SEs se modulan por el NEB, el cual funciona como integrador del comportamiento social eléctrico, lo que le confiere ventajas experimentales: se identifica perfectamente y permite realizar registros electrofisiológicos, cuyas señales eléctricas son cuantificables y medibles, permitiendo observar los efectos de las modulaciones farmacológicas (Hagedorn et al., 1988).

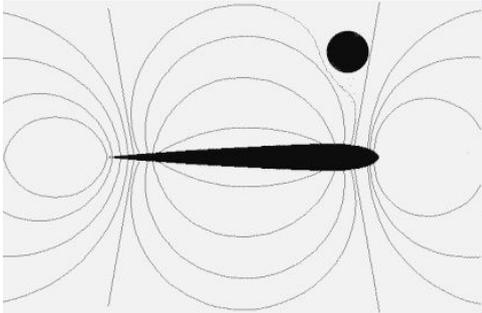


Figura 1: Esquema de un pez eléctrico rodeado por las líneas de corriente emitidas por el mismo hacia su entorno cercano. El círculo negro representa un objeto de conductividad diferente a la del agua. Los electrorreceptores de la piel permiten detectar las distorsiones generadas por el objeto y promueven la construcción de la imagen neural del objeto (Tomado de Macadar y col., 2000).

NONAPÉPTIDOS EN PECES ELÉCTRICOS

Aunque la OT y la AVP son exclusivos de los mamíferos, es sabido que también en especies como, por ejemplo, los peces teleósteos, los nonapéptidos son moduladores importantes del comportamiento social. El homólogo de AVP en peces es la vasotocina (AVT), y el homólogo de OT es la isotocina (IT), sintetizadas mayoritariamente por neuronas del APO. (Goodson & Bass, 2001; Thompson & Walton, 2013).

Gymnotus omarorum es un pez eléctrico de descarga débil solitario (figura 2), altamente agresivo durante todo el año (Batista et al. 2012), sin dimorfismo sexual (Perrone y Silva 2012). La ventaja de trabajar sobre este modelo es que dichas señales eléctricas, codificadas según su frecuencia y forma de onda, llevan consigo información sobre características individuales y su estado fisiológico.

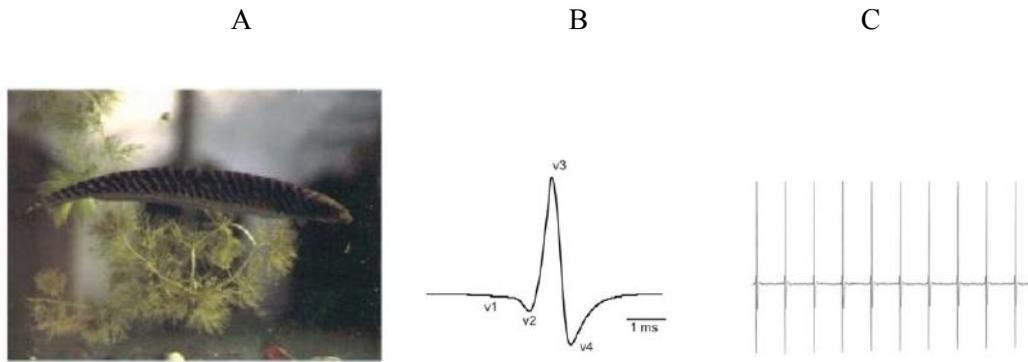


Figura 2: a) *Gymnotus omarorum*; b) DOE sin dimorfismo sexual de *Gymnotus omarorum*, registro cabeza-cola. c) Frecuencia de la DOE de *Gymnotus omarorum* en fase de reposo y período no reproductivo. Tomado de Perrone 2012.

En 2012 Perrone y colaboradores desarrollaron el primer trabajo en peces eléctricos donde se abordó el rol de la AVT en la modulación eléctrica en comportamientos sociales en un modelo con peces eléctricos de descarga débil de la especie *B. gauderio* y *Gymnotus omarorum*. Los resultados mostraron que el efecto de AVT en *B. gauderio* aumentaba significativamente la frecuencia de la DOE, sin embargo no tenía ningún efecto sobre la frecuencia de la DOE de *Gymnotus omarorum*. En una segunda serie experimental, con el fin de evaluar los efectos del AVT endógeno, se inyectó MC (10 $\mu\text{g/g}$) a los individuos aislados 5 minutos previos a la inyección de AVT (1 $\mu\text{g/g}$) y se observó un incremento en la frecuencia basal de la DOE en ambas especies. (Perrone, 2012; Perrone et al, 2014). Por otro lado, en la especie *Gymnotus omarorum* se confirmó a través de una compleja estrategia experimental que durante el comportamiento agonístico entre díadas de machos, las neuronas AVTérgicas se activan diferente en los machos dominantes respecto a los subordinados. (Pouso, 2017). Mediante estudios inmunohistoquímicos se identificó la presencia de neuronas AVTérgicas (Pouso et al., 2017) e ITérgicas (Pouso, 2017) en el APO de ambas especies, así como proyecciones Itérgicas en la cercanía del NEB (Paula Pouso comunicación personal).

OBJETIVOS:

Objetivo general:

Describir el efecto farmacológico de IT sobre el comportamiento basal eléctrico y locomotor en individuos no reproductivos de *Gymnotus omarorum*.

Objetivos específicos:

1. Describir el efecto farmacológico de la inyección intraperitoneal diurna de IT, así como de su antagonista sobre la frecuencia basal de DOE en individuos aislados no reproductivos de *Gymnotus omarorum*.
2. Describir el efecto farmacológico de la inyección intraperitoneal diurna de IT, así como de su antagonista sobre el porcentaje de tiempo en movimiento en individuos aislados no reproductivos de *Gymnotus omarorum*.

METODOLOGÍA

Se utilizaron 32 peces no reproductivo de la especie *Gymnotus omarorum* albergados en el Instituto Clemente Estable. El rango de pesos varió desde los 12 y los 42 gramos y el rango del largo fue entre 14.5 y 25 cm. Las variables ambientales fueron mantenidas dentro de los rangos normales para su hábitat en el bioterio del Instituto Clemente Estable. Se siguió protocolo aprobado por la Comisión honoraria de la experimentación animal (CHEA).

Colecta de peces: Los peces de la especie *Gymnotus omarorum* fueron recolectados en el departamento de Maldonado, Laguna del Sauce, el resultado fue la colección de machos y hembras, ya que no es posible la identificación de su sexo a simple vista ni a través de la decodificación de su DOE. Estos ejemplares adultos fueron alojados en compartimientos individuales dentro de tanques exteriores. Los experimentos comportamentales se realizaron al menos 10 días después de colectados para permitir la adaptación de los animales al alojamiento. Se aseguró de minimizar el estrés de los animales durante todo el procedimiento.

Estación experimental: Ubicada en el Instituto Clemente Estable, la misma consistió en cuatro peceras, de 50cm x 60cm x 20cm. Se controló ciclo luz/oscuridad, temperatura y conductividad para reproducir su hábitat natural. Dichas peceras poseen dos pares de electrodos ortogonales en las paredes para el registro de la DOE. Para observar los despliegues locomotores, se usaron cámaras sensibles a luz infrarroja para enfocar el fondo de la pecera. Los datos de audio y video fueron registrados a través de software instalados en 2 computadoras.

Diseño experimental: Se preparó la estación de manipulación de los peces. Para las peceras se utilizó agua corriente y desionizada de manera de lograr una conductividad aproximada de 100 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$ y una temperatura aproximada de 17°. Se realizó registro de dichos datos

Se procedió a recolectar los peces desde el bioterio mediante calderín y se colocó cada uno en el contenedor asignado para llevarlos a la estación donde fueron pesados y medidos. Se colocaron los peces en sus peceras correspondientes y se les otorgó un período de adaptación de aproximadamente 45 minutos. Se comenzó registro de audio y video pre- inyección durante 1 hora.

Para cumplir con los objetivos se realizó un abordaje farmacológico que consistió en la inyección intraperitoneal de determinadas drogas previamente establecidas, con sus respectivas dosis (tabla 1) en peces pertenecientes a la especie *Gymnotus omarorum*. Estos procedimientos fueron llevados a cabo por la Dra. Paula Pouso y la Dra. Rossana Perrone. Se continuó con el registro audiovisual durante las dos horas post de inyección como fuente de datos para su posterior análisis. Para que cada grupo fuera representativo, a la hora de la elección de

pertenencia a cada grupo de tratamiento, fue tomada en cuenta la variable peso y largo de los animales.

Tabla 1: Sustancias a inyectar.

	ISOTOCINA (IT)	VASOTOCINA (AVT)	MC*	AT**
DOSIS	3 microg/g (1 microg = 1 microL)	2 microg/g	3 microg/g (1 microg = 1 microL)	3 microg/g (25 microg = 1 microL)

Tabla 1: Dosis y concentraciones sustancias a inyectar. Referencias: IT (Isotocina), AVT (Vasotocina), AT Atosiban, es un antagonista de isotocina (IT); (Cardoso, 2015). MC: Manning Compound, es un antagonista de AVT (vasotocina). Salino: Suero salino (control).

Adquisición y procesamiento de datos: El procesamiento y cuantificación de resultados fue realizado sin saber el grupo de tratamiento al que pertenecía el animal.

1) Comportamiento eléctrico

Señales eléctricas: Las señales eléctricas fueron amplificadas y adquiridas a la PC por tarjetas de audio donde fueron procesadas a través del programa Clampfit (versión 10.7)

Frecuencia de la DOE: Se tomaron intervalos de 10 segundos cada 5 minutos para medir la frecuencia de la DOE. En dichos intervalos el pez estaba inmóvil respecto a los electrodos de registro, esto es lo que ocurre la mayor parte del tiempo en individuos aislados para las horas del día (fase de reposo). En estos segmentos elegidos, donde se mantuvo constante la amplitud, se calculó la frecuencia utilizando la función “Detección de eventos” del programa Clampfit.

Para graficar los datos obtenidos, se utilizó el programa OriginPro (versión 8E), donde se calculó la frecuencia media de cada segmento de 10 segundos tomados cada 5 minutos y se graficaron dichos valores en función del tiempo.

Para comparar entre distintos grupos experimentales, se calcularon índices de variación de la frecuencia, que permite comparar todos los resultados. Se calculó el porcentaje de variación de la frecuencia de las DOE entre la hora previa y la primera y segunda post-inyección.

Para normalizar datos, se tomó la diferencia entre la mediana de la frecuencia de la primera hora post inyección y la mediana de la hora previa (el valor inicial), y se dividió entre la mediana de la hora previa a la inyección. Se multiplicó por 100 para poder hacerlo en porcentaje.

Posteriormente se repitió el cálculo con la frecuencia de la segunda hora post-inyección en lugar de la primera.

Para leer los resultados se tuvo en cuenta el signo del valor del índice. Cuando el índice es negativo, expresa una disminución de la frecuencia, mientras que un índice positivo indica un aumento de la frecuencia.

2) Comportamiento locomotor:

Las imágenes fueron digitalizadas y adquiridas por tarjetas capturadoras y almacenadas en PCs para su posterior análisis, que se realizó con el programa Virtualdub 1.9.11. Como parámetro locomotor se midió la frecuencia de aparición de las unidades “movimiento” durante el periodo de observación para luego cuantificar que porcentaje de tiempo se encontraba en movimiento.

Estadística: Las discusiones que se generaron fueron a partir del análisis de los datos obtenidos en el experimento completo, es decir incluidos todos los grupos experimentales, con tablas brindadas por las tutoras porque con un n tan reducido no se podrían haber obtenido observaciones concluyentes.

Los datos de las señales eléctricas y los parámetros locomotores fueron analizados usando test no paramétricos, por eso los datos se expresan usando medianas y sus desvíos. Luego de tener los valores de las medianas, con el fin de establecer si esos valores son significativos (a un valor de significancia de 0,05), se utilizó el test estadístico de Kruskal-Wallis. Luego de obtener los p valores se utilizó el Dunn test post hoc en el programa PAST (Past 3.22, Hammer, 2008).

RESULTADOS

Se procesaron por separado los despliegues eléctricos y locomotores.

1) Comportamiento eléctrico

Señales eléctricas para cuatro muestras del 10/7

Los resultados eléctricos están representados en la figura 3 a través de cuatro gráficas que corresponden a la variación de la frecuencia de la DOE en cuatro peces del día 10/7, para los tratamientos: AVT/AT, IT/AT y Salino. Del minuto -60 al 0 representa la primer hora pre inyección, del minuto 0 al 60 representa la primer hora luego de administrado el tratamiento y del minuto 60 al 120, la segunda hora post-inyección.

Figura 3: Efecto de los tratamientos sobre la frecuencia basal de la DOE.

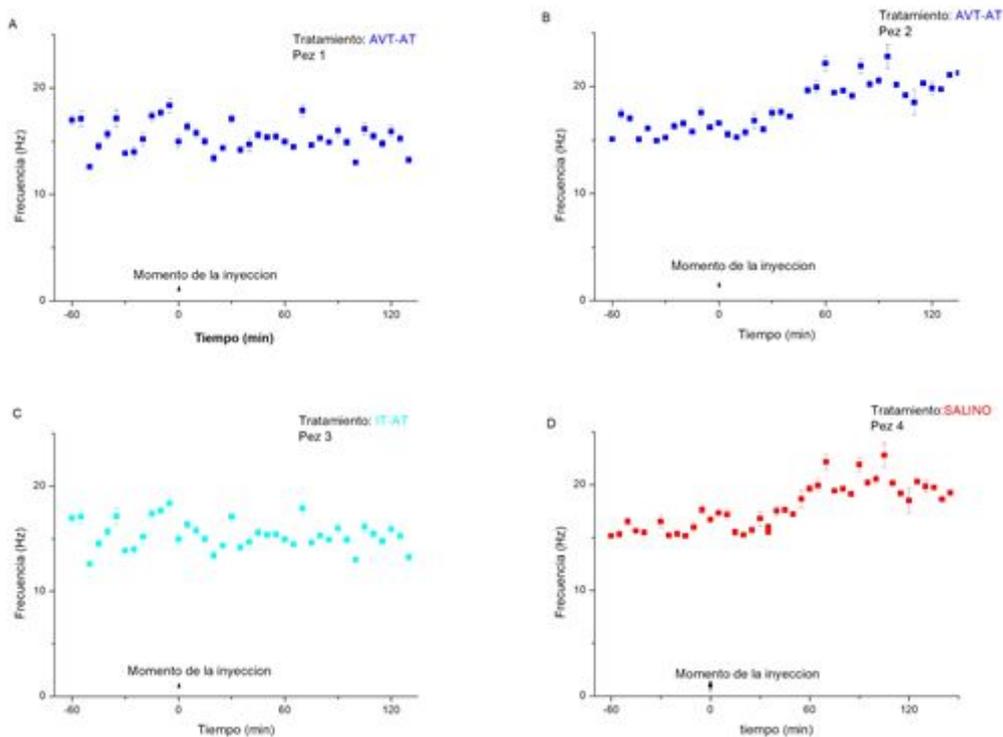


Figura 3: Efecto de los tratamientos sobre la frecuencia basal de la DOE en los 4 peces del 10/7. A) Pez 1 tratado con AVT-AT; B) Pez 2 tratado con ATV-AT; C) Pez 3 tratado con IT-AT; D) Pez 4 tratado con SALINO. Referencias: IT (Isotocina), AVT (Vasotocina), AT Atosiban, es un antagonista de isotocina (IT), MC: Manning Compound, es un antagonista de AVT (vasotocina). Salino: Suero salino (control), Hz (Hertz), min (minutos).

En la figura 3 A, cuyo tratamiento fue AVT - AT, no se observan cambios significativos en la frecuencia de las DOE luego de su administración, sin embargo, en la figura 3 B, con el mismo tratamiento, se ve claramente un aumento en la frecuencia de las DOE post inyección. La figura 3 C, que recibió IT - AT no mostró modificaciones en la frecuencia de las DOE. Por último, el tratamiento con Suero Salino (figura 3 D), no tuvo efecto en la frecuencia de las DOE.

En la tabla 2 se muestran los valores de frecuencia de DOE para los tratamientos administrados el 10/7, considerando la frecuencia pre tratamiento y la post tratamiento tanto en la primer como en la segunda hora.

Tabla 2: Frecuencias de DOE pre y post tratamientos del 10/7

	AVT-AT	AVT-AT	IT-AT	Salino
Frecuencia pre- tratamiento (Hertz)	16,32	16,14	15,67	15,51
Frecuencia 1ra hora Post tratamiento	14,99	17,21	14,99	17,19
Frecuencia 2da hora Post tratamiento	15,26	19,84	15,26	20,17

Tabla 2: Frecuencias de las DOE para los cuatro peces del 10/7 para cada tratamiento.

En la tabla 2 se observa que uno de los tratamientos con AVT/AT logra disminuir la frecuencia de DOE mientras que en el otro individuo con el mismo tratamiento la frecuencia aumenta. Con lo que respecta a IT/AT, la frecuencia se mantiene relativamente constante con una disminución de la frecuencia de la DOE poco notoria. Un resultado que se aprecia luego de la administración de suero salino es que la frecuencia aumenta, lo cual podría ser explicado por la influencia de la manipulación experimental ya que no concuerda con lo que se observó en el total de las muestras.

La tabla 3 muestra los índices de variación de frecuencia para los resultados anteriores para la primer y segunda hora luego de administrado los tratamientos descritos. Los signos positivos significan un aumento de la frecuencia de la DOE (AVT/AT y salino), y los signos negativos significan una disminución en la frecuencia de DOE (AVT/AT y IT/AT).

Tabla 3: Índices de variación de frecuencia para primera y segunda hora post tratamiento.

	AVT-AT	AVT-A T	IT-A T	Salino
Índice de variación de frecuencia 1ra hora post tratamiento	-8,16	6,69	-4,31	10,82
Índice de variación de frecuencia 2da hora post tratamiento	-6,51	22,98	-2,59	30,01

Tabla 3: índices de variación de frecuencia para los cuatro peces del 10/7 . Los índices **positivos (en naranja)** significan aumento de frecuencia, los índices **negativos (en lila)** significan disminución. Referencias: IT (Isotocina), AVT (Vasotocina), AT (Atosiban, antagonista de IT), MC: Manning Compound, antagonista de AVT. Salino: Suero salino (control).

Resultados eléctricos totales: Dichos datos fueron brindados por las tutoras de la investigación.

En la tabla 4 se muestra el índice de variación de frecuencia para la primer hora luego de administrado cada tratamiento. La administración de suero salino disminuye la frecuencia de DOE para todas las observaciones excepto una que aumenta significativamente que puede corresponder a alteraciones en la manipulación experimental. Con respecto al tratamiento con IT se puede observar que la frecuencia de DOE aumenta en dos de las observaciones y disminuye en cuatro de ellas. Una observación significativa es que el tratamiento con AVT/AT logra aumentar la frecuencia de DOE en todas las observaciones. Para el tratamiento con IT/AT se observa que disminuye en todas las muestras, excepto en una. En el tratamiento con IT/MC la mayoría de los peces disminuyen la frecuencia de la DOE.

Tabla 4: Índices de variación de frecuencia en 1ra hora post-inyección según tratamiento.

	SALINO	IT	AVT-AT	IT-AT	IT-MC
Índices de variación de frecuencia (Hz) en 1ra hora post tratamiento	13,92	-10,54	22,32	-4,31	-6,23
	-11,36	7,42	10,91	-23,24	3,27
	-29,24	6,92	16,84	5,99	-5,84
	-2,25	-3,94	19,77	-8,36	-6,49
	-26,74	-1,24	8,51	-25,87	-2,38
	-1,58	-5,16	25	-6,81	-1,59

Tabla 4: Índices de variación de frecuencia para todos los grupos experimentales en la primer hora post inyección. Los índices **positivos (en naranja)** significan aumento de frecuencia, los índices **negativos (en violeta)** significan disminución. Referencias: IT (Isotocina), AVT (Vasotocina), AT Atosiban, es un antagonista de isotocina (IT); MC: Manning Compound, es un antagonista de AVT (vasotocina). Salino: Suero salino (control).

En la tabla 5 se muestra el resultado para la segunda hora luego de administrado el tratamiento. La administración de suero salino disminuye la frecuencia de DOE para todas las observaciones excepto una que aumenta significativamente que puede corresponder a alteraciones en la manipulación experimental. Con respecto al tratamiento con IT se puede observar que la frecuencia de DOE aumenta en tres de las observaciones y disminuye en tres de ellas. Se observa nuevamente el aumento de frecuencia de DOE en todas las observaciones para el tratamiento con AVT/AT, constituyendo un resultado significativo. Para el tratamiento con IT/AT se observa que disminuye en todas las muestras, excepto en una. En el tratamiento con IT/MC la mayoría de los peces disminuyen la frecuencia de la DOE.

Estas observaciones fueron representadas en la figura 4. El cambio significativo que se observa en ella es el incremento de la frecuencia de la DOE en el tratamiento con AVT/AT.

Tabla 5: Índices de variación de frecuencia en 2da hora post-inyección según tratamiento.

	SALINO	IT	AVT-AT	IT-AT	IT-MC
Índices de variación de frecuencia (Hz) 2da hora post-inyección	19,49	0,49	20,57	-2,59	4,22
	-0,86	8,47	27,57	-9,59	-8,95
	-28,79	12,71	19,14	2,44	-4,47
	-4,79	-2,07	21,25	-6,16	-9,72
	-41,65	-1,47	12,19	-28,44	-3,50
	-3	-9,95	24,89	-9,62	-3,00

Tabla 5: Índices de variación de frecuencia para todos los grupos experimentales en la segunda hora post inyección. Los índices **positivos (en naranja)** significan aumento de frecuencia, los índices **negativos (en violeta)** significan disminución y los cercanos a **cero (verde oscuro)** significa que no variaron su frecuencia. Referencias: IT (Isotocina), AVT (Vasotocina), AT Atosiban, es un antagonista de isotocina (IT); MC: Manning Compound, es un antagonista de AVT (vasotocina). Salino: Suero salino (control).

Figura 4: Gráficas de índices de variación de frecuencia totales

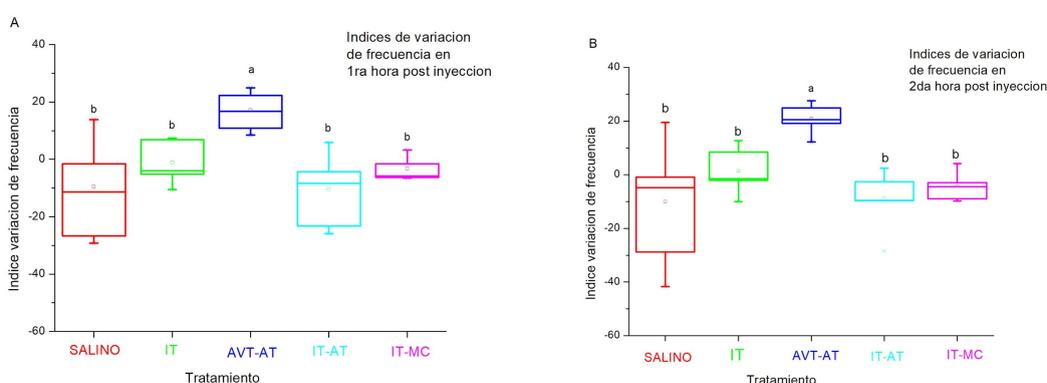


Figura 4: Índice de variación de frecuencias correspondientes a los diferentes tratamientos administrados; A) Índices en la primer hora post - inyección. B) Índices en la 2da hora post-inyección. La letra diferente (a) representa un resultado significativamente diferente a los demás (Kruskal Wallis, Dunn test post hoc $p < 0,01$). Las letras iguales (b) representan

resultados no significativamente diferentes entre sí (KW Dunn test post hoc $p > 0,05$), Referencias: IT (Isotocina), AVT (Vasotocina), AT Atosiban, MC: Manning Compound. Salino: Suero salino (control).

2) Comportamiento locomotor (para muestra de cuatro peces del 10/7)

Con lo que respecta a los despliegues locomotores se puede observar que luego de la inyección, el porcentaje de tiempo en movimiento en el caso del pez 4 al que se le administró suero salino, disminuyó en la primera hora, y disminuyó aún más en la segunda hora. El pez 3 con el tratamiento de IT/AT también disminuyó el porcentaje de tiempo en movimiento con respecto al registro pre inyección. El pez 2 tratado con AVT/AT aumentó considerablemente el porcentaje de tiempo en el que el pez estuvo en movimiento. No obstante el pez 1, al que también se le administró AVT/AT, se puede observar que en la primera hora desciende marcadamente el porcentaje de tiempo en movimiento, y luego en la segunda hora asciende (Tabla 6 y figura 5).

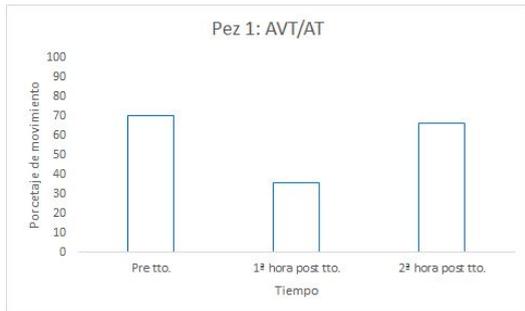
Tabla 6: Actividad locomotora

	Pez 4 SALINO	Pez 3 IT-AT	Pez 2 AVT-AT	Pez 1 AVT-AT
% movimiento pre inyección de tratamiento	20,54	79,9	9,44	70,45
% movimiento 1ra hora post tratamiento	17,13	47,25	46,26	36,10
% movimiento 2da hora post tratamiento	15,35	52,56	59,29	66,6

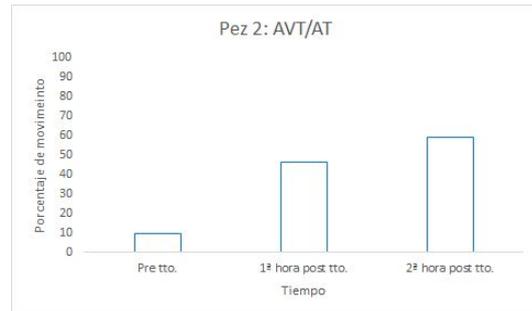
Tabla 6: Actividad locomotora en porcentaje de tiempo en movimiento durante la hora pre tratamiento y la primera y segunda hora post tratamiento.

Figura 5: Actividad locomotora

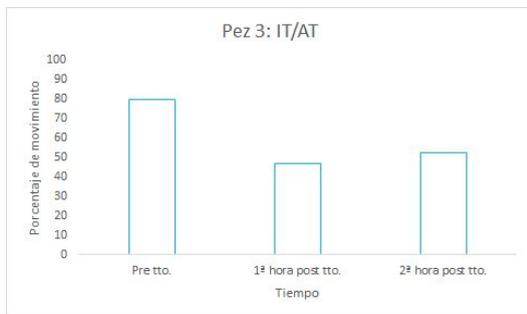
A



B



C



D



Figura 5: Efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad locomotora a lo largo del tiempo. A) AVT-AT b) AVT-AT C) IT-AT D) Salino. Se representa el porcentaje de tiempo en movimiento pre y post tratamiento.

DISCUSIÓN

Este es el primer trabajo en peces eléctricos donde se aborda el efecto diurno de la IT en la modulación del comportamiento basal eléctrico y locomotor. Si bien la administración única de la IT no mostró efectos sobre la FB así como tampoco lo hicieron en los tratamientos con IT-AT e IT-MC, se encontró que únicamente la inyección con AVT+ AT provocó un aumento significativo de la FB de la DOE respecto al resto de los tratamientos.

La IT es un nonapéptido que promueve el acercamiento social en peces teleósteos (Thompson and Walton, 2004) y aves (Goodson et al., 2009). Así como también la agresión maternal en ratas (Bosch and Neumann, 2012). En peces, se ha estudiado que la IT inhibe la vocalización en machos y el antagonista de la IT aumenta las mismas (Goodson and Bass, 2000a). En otros estudios se vio que puede estimular el comportamiento reproductivo (Mennigen et al., 2008) e inhibir la formación de cardumen (Reddon 2012). El objetivo a largo plazo es explorar la modulación de IT en el comportamiento social para lo que fue necesario, previamente, realizar estos estudios en el comportamiento basal.

El abordaje experimental consistió en explorar si los tratamientos administrados tenían algún efecto sobre la frecuencia de la DOE en condiciones basales: durante el día, en individuo aislado y fuera del período reproductivo.

El hecho de que se haya elegido trabajar con combinaciones con un inhibidor de receptores de IT (Atosiban) y de AVT (MC), se explica porque ambos nonapéptidos comparten gran parte de su secuencia de aminoácidos pudiendo existir una modulación alostérica en sus receptores (Caldwell et al 2008). Dicho esto, con esta combinación de tratamientos se intenta observar el efecto puro de un nonapéptido, IT o AVT, sin la hipotética modulación por el otro nonapéptido.

Efecto IT sobre frecuencia de la DOE:

Tanto en el grupo delimitado como en el total de las observaciones, la administración de IT aislada parece no tener un efecto significativo, tampoco se ve efecto junto a AT. No podemos extraer conclusiones sobre su efecto en otros comportamientos ya que se trata de animales aislados, sin embargo esto no descarta la posibilidad de que exista efecto en un encuentro diádico, teniendo en cuenta que IT y AVT son neuropéptidos con un rol en el comportamiento social en otras especies de peces (Reddon et al 2012).

La administración de IT junto a MC no arrojó resultados significativos, comparados con el control.

Efecto AVT - AT sobre la frecuencia de la DOE:

De las observaciones más llamativas que obtuvimos, fue el hecho de que la frecuencia aumentó de manera potente luego de la administración de AVT/AT.

Para el grupo delimitado por cuatro muestras, esto se puede observar en la figura 3B y en su índice de cambio de frecuencia positivo; la figura 3A, con el mismo tratamiento no logra mostrar dicho aumento. Sin embargo, la tabla 4 de índices de cambio de frecuencia para el experimento completo, muestra un significativo aumento de frecuencia en todos los peces.

Existe el antecedente del estudio de Perrone, 2014 en el que la administración de AVT intraperitoneal aislada mostró un aumento de la frecuencia notorio a los 10 minutos, disminuyendo luego de ese tiempo. En este estudio la inyección de AT con AVT determinó un aumento de la frecuencia persistente en el tiempo. Por lo tanto la IT podría estar modulando de manera negativa la acción de la AVT en el estado basal, ya que al inhibir sus receptores el efecto de la AVT se prolonga. Una forma más precisa de comparar dichos estudios sería tomando intervalos de 10 minutos, sin embargo, con fines prácticos, fueron elegidos intervalos de 1 hora.

Efecto suero salino sobre las DOE:

Otra manifestación a destacar a partir de las observaciones de los índices de cambio de frecuencia de todas las muestras experimentales, es que la inyección con suero salino hizo descender la frecuencia global de manera considerable. Esto llama la atención ya que el antecedente en estudios similares, muestran el mantenimiento de la frecuencia o en su defecto un leve aumento de esta; por lo que este descenso en la frecuencia de DOE podría ser explicado por influencia de la manipulación experimental. El hecho de que la inyección con salino haya bajado la frecuencia en algunos peces, hizo que la frecuencia global del tratamiento con dicha solución haya descendido. Esto podría enmascarar algunos resultados, sobre todo en variaciones de frecuencia más sutiles. Sin embargo, la observación anterior de que la AVT junto al AT haya aumentado la frecuencia considerablemente, habla de que este último es un tratamiento con un efecto notorio sobre el comportamiento eléctrico del pez.

Efecto sobre la actividad locomotora.

Aún no fueron analizados los datos del estudio completo, por lo que las observaciones se

limitan al grupo seleccionado de cuatro peces, cuya actividad eléctrica fue representada en la figura 3. Es así que al tener un n tan bajo no es posible extraer conclusiones respecto a la relación de la actividad locomotora con la frecuencia de la DOE, sin embargo se pueden realizar ciertas observaciones. Por un lado, en el pez 2, donde se había hallado un aumento en su DOE, también se observó un aumento notorio en su actividad locomotora. Sin embargo en el pez 1, que recibió el mismo tratamiento, no se observó lo mismo, sino que se vió una marcada actividad locomotora que luego descendió para subir nuevamente en la segunda hora post inyección.

La inyección con IT/AT muestra un descenso en la actividad locomotora a lo largo de las dos horas posteriores a la inyección.

El individuo que recibió una inyección con suero salino mantuvo a lo largo del tiempo una baja actividad locomotora. Esto es bastante llamativo ya que se relaciona con el efecto de dicho tratamiento sobre la DOE.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Por primera vez exploramos el efecto diurno de la IT en la frecuencia basal de la DOE en peces aislados no reproductivos de la especie *Gymnotus omarorum*. También exploramos por primera vez el efecto diurno de la IT sobre el porcentaje de tiempo en movimiento en peces aislados no reproductivos de la especie *Gymnotus omarorum*. Este estudio se apoyó en el importante antecedente del estudio de la influencia de la administración intraperitoneal de AVT sobre el comportamiento basal así como sobre encuentros diádicos entre individuos de la especie *Gymnotus omarorum*. Por primera vez encontramos que únicamente la inyección con AVT+ AT provocó un aumento significativo de la FB de la DOE respecto a todos los tratamientos. Las observaciones realizadas a partir del análisis de los datos obtenidos sugieren que la IT endógena puede modular la frecuencia basal de la DOE.

. Con el fin de explorar la acción de la IT endógena, se podrían realizar en el futuro ensayos farmacológicos con AT en estado basal y durante el comportamiento agonístico. Además resultaría de mucha utilidad realizar un abordaje inmunohistoquímico, en busca de proyecciones de neuronas ITérgicas en los cerebros de estos animales, con el fin de relacionar sus conductas con las zonas cerebrales que intervienen.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bastian J. Gain control in the electrosensory system mediated by descending inputs to the electrosensory lateral line lobe. *J Neurosci*. 1986;6(2):553–62.
- Batista G, Zubizarreta L., Perrone R, Silva A. Non-sexbiased dominance in a sexually monomorphic electric fish: fight structure and submissive electric signalling. *Ethology* 2012;118: 398–410.
- Bosch OJ, Neumann ID. Both oxytocin and vasopressin are mediators of maternal care and aggression in rodents: From central release to sites of action [Internet]. *Hormones and Behavior*. Academic Press; 2012; 61(3):293–303. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0018506X11002637>
- Calcagnoli F, De Boer SF, Althaus M, Den Boer JA, Koolhaas JM. Antiaggressive activity of central oxytocin in male rats. *Psychopharmacology*. 2013;229(4):639–51.
- Caldwell HK, Lee HJ, Macbeth AH, Young WS. Vasopressin: Behavioral roles of an “original” neuropeptide. *Prog Neurobiol*. 2008;84(1):1–24.
- Caldwell HK. Oxytocin and Vasopressin: Powerful Regulators of Social Behavior. *Neuroscientist*. 2017;23(5):517–28.
- Caputi AA, Carlson BA, Macadar O. Electric Organs and Their Control. *Electroreception*. 2006;410–51.
- Caughey SD et al. Changes in the intensity of maternal aggression and central oxytocin and vasopressin V1a receptors across the peripartum period in the rat. *Journal of neuroendocrinology*. 2011; 23(11): 1113-1124.
- Choleris E, Pfaff DW, Kavaliers M. Oxytocin, vasopressin, and related peptides in the regulation of behavior. *Oxytocin, Vasopressin, and Related Peptides in the Regulation of Behavior*. 2011; 1–401
- Coccaro EF, Kavoussi RJ, Hauger RL, Cooper TB, Ferris CF. Cerebrospinal Fluid Vasopressin Levels. *Arch Gen Psychiatry*. 1998;55(8):708.
- Coolen LM, Wood RI. Bidirectional connections of the medial amygdaloid nucleus in the Syrian hamster brain: simultaneous anterograde and retrograde tract tracing. *Journal of Comparative Neurology*. 1998;399(2):189-209.
- Dluzen DE et al. The effects of infusion of arginine vasopressin, oxytocin, or their antagonists into the olfactory bulb upon social recognition responses in male rats. *Peptides*. 1998;19 (2): 999–1005.

- Dogterom J. et al. Evidence for the release of vasopressin and oxytocin into cerebrospinal fluid: measurements in plasma and CSF of intact and hypophysectomized rats. *Neuroendocrinology*. 1977; 24(2):108-118.
- Dong H, Swanson LW. Organization of axonal projections from the anterolateral area of the bed nuclei of the stria terminalis. *J. Comp. Neurol*. 2004; 468: 277-298.
- Fricker LD. Neuropeptides and Other Bioactive Peptides: From Discovery to Function. *Colloquium Series on Neuropeptides*. 2012;1(3): 1–122.
- Goodson JL, Bass AH. Vasotocin innervation and modulation of vocal-acoustic circuitry in the teleost *Porichthys notatus*. *J Comp Neurol*. 2000;422(3):363–79.
- Goodson JL, Bass AH. Social behavior functions and related anatomical characteristics of vasotocin/vasopressin systems in vertebrates [Internet]. *Brain Research Reviews*. 2001;35(3):246–65.
- Goodson JL, Schrock SE, Klatt JD, Kabelik D, Kingsbury MA. Mesotocin and Nonapeptide Receptors Promote Estrildid Flocking Behavior. *Science* (80-) [Internet]. 2009 Aug 14;325(5942):862 LP – 866. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/325/5942/862.abstract>
- Hagedorn M. Ecology and Behavior of a Pulse-Type Electric Fish, *Hypopomus occidentalis* (Gymnotiformes, Hypopomidae), in a Fresh-Water Stream in Panama. *Copeia* [Internet]. 1988;1988(2):324–35.
- Hattori T, Kanno K, Nagasawa M, Nishimori K, Mogi K, Kikusui T. Impairment of interstrain social recognition during territorial aggressive behavior in oxytocin receptor-null mice. *Neurosci Res* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2019 Oct 26];90:90–4. Available from:
- Insel TR, Shapiro LE. Oxytocin receptor distribution reflects social organization in monogamous and polygamous voles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(13):5981–5.
- Jirikowski GF, Caldwell JD, Pedersen CA, Stumpf WE. Estradiol influences oxytocin-immunoreactive brain systems. *Neuroscience* [Internet]. 1988 Apr 1 [cited 2019 Oct 27];25(1):237–48.
- Kelly AM, Goodson JL. Social functions of individual vasopressin–oxytocin cell groups in vertebrates: what do we really know?. *Front. Neuroendocrinol*. 2014; 35: 512–529.
- Lee PC. *Social structure and evolution*. Cambridge University Press; 1994 p. 266–303.
- Lissman, H. W. On the function and evolution of electric organs in fish. *Journal of Experimental Biology*. 1958; 35,156-191.
- López-Ramírez CE, Arámbula-Almanza J, Camarena-Pulido EE. Oxitocina, la hormona que todos utilizan y que pocos conocen. *Ginecol Obstet Mex*. 2014;82(7):472–82.

- Macadar O, Sierra F, Silva A. Los peces eléctricos. 2000;
- Macadar O, Silva A. Comunicación eléctrica en peces sudamericanos del orden gymnotiformes. Vol. 39, Revista Latinoamericana de Psicología. 2007. p. 31–45.
- Mago-Leccia F. Electric fishes of the continental waters of America. Biblioteca de la Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas, y Naturales, Caracas. Venezuela [Internet]. 1994 [cited 2019 Oct 27];29:1–206.
- Mennigen JA, Martyniuk CJ, Crump K, Xiong H, Zhao E, Popesku J, et al. Effects of fluoxetine on the reproductive axis of female goldfish (*Carassius auratus*). *Physiol Genomics*. 2008;35(3):273–82.
- Nelson, R.J. *Biology of aggression*. Oxford University Press. 2006.
- Newman SW. The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;877:242–57.
- Oldfield RG, Hofmann HA. Neuropeptide regulation of social behavior in a monogamous cichlid fish. *Physiol Behav* [Internet]. 2011 Mar 1 [cited 2019 Oct 26];102(3–4):296–303.
- Perrone R. La vasotocina modula el comportamiento social de dos especies de peces eléctricos con diferente socialidad. Tesis de Doctorado. PEDECIBA, 2012
- Pouso P et al. An immunohistochemical study on the distribution of vasotocin neurons in the brain of two weakly electric fish, *Gymnotus omarorum* and *Brachyhypopomus gauderio*. *Tissue Cell* [Internet]. 2017;49(2):257–69.
- Pouso P. Estudio comparativo de las bases neurales del comportamiento social en peces eléctricos y anuros. Tesis de doctorado PEDECIBA, 2017.
- Reddon AR, O'Connor CM, Marsh-Rollo SE, Balshine S. Effects of isotocin on social responses in a cooperatively breeding fish. *Anim Behav* [Internet]. 2012 Oct 1 [cited 2019 Oct 29];84(4):753–60
- Ring R. The Central Vasopressinergic System: Examining the Opportunities for Psychiatric Drug Development. *Curr Pharm Des*. 2005;11(2):205–25.
- Risold PY, Thompson RH, Swanson LW. The structural organization of connections between hypothalamus and cerebral cortex [Internet]. *Brain Research Reviews*. 1997 [cited 2019 Oct 23]; 24(2-3):197–254.
- Silva AC, Perrone R, Zubizarreta L, Batista G, Stoddard PK. Neuromodulation of the agonistic behavior in two species of weakly electric fish that display different types of aggression. *J Exp Biol*. 2013;216(13):2412–20.

- Thompson RR, Walton JC. Peptide effects on social behavior: Effects of vasotocin and isotocin on social approach behavior in male goldfish (*Carassius auratus*). *Behav Neurosci*. 2004;118(3):620–626.
- Thompson RR, Walton JC. Social regulatory functions of vasotocin and isotocin in fish. *Oxytocin, vasopressin and related peptides in the regulation of behavior*. 2013; 75-96.
- Tinbergen N. *Social behaviour in animals: with special reference to vertebrates*. Oxford, England:Wiley.1953.
- Zubizarreta L, Perrone R, Stoddard PK, Costa G, Silva AC. Differential serotonergic modulation of two types of aggression in weakly electric fish. *Front Behav Neurosci*. 2012;(OCTOBER 2012).

AGRADECIMIENTOS

Queremos ofrecer nuestro sincero agradecimiento a:

Las tutoras, la Dra. Paula Pouso y a la Dra. Rossana Perrone por su apoyo y consideración.

Al Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) por abrirnos sus puertas y hacernos sentir parte de una importante investigación científica.