

Modulación serotoninérgica de la conducta agonística: Activación diferencial del sistema serotoninérgico según el tipo de agresión

Lucía Zubizarreta

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

Montevideo, Uruguay

Orientadora: Ana Silva

Tribunal

Annabel Ferreira (Presidente)

Michel Borde (Vocal)

Cecilia Scorza (Vocal)

A Matías, mi parceiro del alma

Agradecimientos

A los 3 miembros del tribunal, por sus excelentes comentarios y sugerencias, que mejoraron esta tesis.

A Ana, gracias por tener la mezcla perfecta de exigencia y humanidad que te obliga a sacar las cosas adelante sin descuidar otros aspectos de la vida. Con una asombrosa energía lidera un grupo en el que da gusto trabajar.

A la gente de la UBNC: Roxi, Laura, Paula, Ceci, Adri, Fede, Gervasio y Taba. Gracias por hacer del laboratorio un lugar disfrutable e interesante a la vez. Agradezco también los innumerables lab-meetings en los que pusieron sus cerebros a pensar en mis experimentos como si fueran los de ustedes. Especial agradecimiento a Roxi por ayudarme, enseñarme y por ser la persona más generosa que conozco y a Laura por saber escuchar, aconsejar y guiar.

A mis compañeros de laboratorio y almuerzos.

A nuestros asesores estadísticos Maira, Marrano y Daniel.

A Bettina Tassino, Laura Quintana, Cecilia Scorza y Hans Hofmann que generosamente ayudaron a mejorar el paper Frontiers.

Este trabajo no habría sido posible sin la colaboración con el Departamento de Neuroquímica del IIBCE. Agradezco la buena onda y disposición de todos sus integrantes, especialmente a Gustavo Costa.

A Phil Stoddard y familia, por alojarme durante mi pasantía en Miami como si fuera parte de la familia y a los integrantes del Stoddard lab que me abrieron las puertas.

Las fuentes de financiación que hicieron posible la realización de esta tesis fueron: ANII Beca de Maestría 2241, Proyecto ANII_FCE_2472 y PEDECIBA.

A mi familia "expandida": A mis padres, por el apoyo incondicional; a mis hermanos por ser mis compañeros de la vida; a Claudio, a Teresa, a la familia Kent-D'Amato y a la familia Zarucki-Rodriguez-Cano.

A mis amigos, con los que comparto no solo charlas científicas.

A Matías, gracias por estar ahí siempre.

La conducta agonística y la expresión de diferentes tipos de agresión en contexto agonístico aportan un marco teórico adecuado para evaluar cómo los circuitos y mediadores que controlan el comportamiento social son capaces de coordinarse para ejecutar una salida comportamental especie-específica y dependiente del contexto. La serotonina (5-HT) ejerce el principal control inhibitorio sobre la agresión y la activación de receptores 5-HT_{1A} está involucrada en su acción. Aún cuando está ampliamente demostrada la vinculación entre la 5-HT y la agresión, no existen evidencias que determinen si la 5-HT está involucrada de manera diferente en la regulación de los distintos tipos de agresión. Se utilizaron dos especies de peces eléctricos autóctonos con diferente nivel de socialidad con el propósito de: 1- identificar diferentes tipos de agresión, y 2- evaluar diferencias interespecíficas en la modulación serotoninérgica vinculada a diferentes tipos de agresión. *Gymnotus omarorum*, especie solitaria, despliega agresión exclusivamente territorial no reproductiva en días intra- e inter-sexuales. Los conflictos se resuelven en base a una asimetría de peso entre los contendientes y se desarrollan con una dinámica rápida (duración del conflicto = 147 ± 82 s) que incluye despliegues locomotores específicos y un patrón secuencial de señales de sumisión eléctrica. *Brachyhyopomus gauderio*, especie gregaria, despliega agresión por competencia entre machos ligada a la reproducción. Los conflictos sólo ocurren si se aumenta el valor del recurso en base a una residencia prolongada para uno de los contendientes en el sitio de cortejo y se desarrollan con una dinámica más lenta (duración del conflicto = 379 ± 209.5 s), e incluyen despliegues locomotores específicos pero no presentan señales eléctricas de sumisión. Se encontraron diferencias entre los dos tipos de agresión tanto en la activación del sistema serotoninérgico (niveles de 5-HT y recambio de 5-HT), como en la modulación con un agonista 5-HT_{1A}. Luego de la resolución del conflicto en la agresión ligada a la reproducción desplegada por *B. gauderio*, la activación serotoninérgica sigue el patrón esperado, siendo los niveles de 5-HT mayores en subordinados que en controles. Luego de la agresión territorial desplegada por *G. omarorum* tanto dominantes como subordinados exhiben niveles menores de 5-HT que los controles lo que indica una respuesta no convencional y diferente a la observada en la agresión ligada a la reproducción. Asimismo, se encontraron diferencias interespecíficas en el recambio serotoninérgico basal y en el perfil dinámico de los niveles de 5-HT del pre-conflicto a la post-resolución. Las diferencias entre tipos de agresión también se evidencian mediante la administración de 8-OH-DPAT (agonista 5-HT_{1A}) al dominante potencial, el cual provoca una reducción de los niveles de agresión y cambios en el resultado de la contienda en la agresión territorial de *G. omarorum*, y no tiene efecto sobre la agresión ligada a la reproducción de *B. gauderio*. Los resultados de esta tesis evidencian una participación diferente del sistema serotoninérgico en dos tipos de agresión, lo que podría constituir una estrategia general en el control neuroendócrino de la agresión en vertebrados.

Abreviaturas	7
Introducción	8
<i>Niveles de socialidad</i>	<i>8</i>
<i>Conducta agonística y agresión</i>	<i>8</i>
<i>Control neural del comportamiento social: socialidad y agresión</i>	<i>9</i>
<i>Modulación serotoninérgica de la agresión</i>	<i>10</i>
<i>Gymnotiformes como modelo para estudiar las bases neurales de comportamientos sociales</i>	<i>12</i>
<i>Antecedentes particulares de modulación serotoninérgica de la conducta agonística en Gymnotiformes</i>	<i>13</i>
<i>Dos especies Gymnotiformes con diferentes niveles de socialidad</i>	<i>14</i>
Hipótesis y Objetivos	15
<i>Hipótesis de trabajo</i>	<i>15</i>
<i>Objetivo general.....</i>	<i>15</i>
<i>Objetivos específicos</i>	<i>15</i>
<i>Organización de los resultados</i>	<i>16</i>
Métodos.....	17
<i>Animales.....</i>	<i>17</i>
<i>Colecta y alojamiento.....</i>	<i>17</i>
<i>Estación experimental</i>	<i>18</i>
<i>Protocolos conductuales</i>	<i>19</i>
<i>Gymnotus omarorum.....</i>	<i>19</i>
<i>Brachyhyopomus gauderio</i>	<i>20</i>
<i>Administración de 8-OH-DPAT</i>	<i>21</i>
<i>Procesamiento de datos conductuales.....</i>	<i>22</i>
<i>Despliegues locomotores</i>	<i>22</i>
<i>Despliegues eléctricos.....</i>	<i>22</i>
<i>Análisis de monoaminas.....</i>	<i>23</i>
<i>Análisis estadísticos.....</i>	<i>24</i>
Capítulo 1 Caracterización de la conducta agonística e identificación de tipos de agresión	26
<i>Resultados</i>	<i>26</i>
<i>A- Gymnotus omarorum</i>	<i>26</i>

<i>B- Brachyhyppopomus gauderio</i>	30
<i>Discusión</i>	32
Capítulo 2 Correlación entre actividad serotoninérgica y tipos de agresión	37
<i>Resultados</i>	37
<i>Discusión</i>	39
Capítulo 3 Modulación farmacológica de los tipos de agresión	42
<i>Resultados</i>	42
<i>Cuadro3.1</i>	44
<i>Efectos de la administración de 8-OH-DPAT sobre la interacción social en G. omarorum</i>	44
<i>Discusión</i>	46
Discusión General	49
Perspectivas	53
Contribuciones	55
<i>Artículos publicados y en preparación</i>	55
<i>Posters presentados en congresos</i>	55
<i>Desarrollos experimentales y técnicos</i>	56
Referencias	58
Material suplementario	63
<i>CD conteniendo versión electrónica de la tesis y artículos publicados</i>	63

Abreviaturas

5-HT – 5-hidroxitriptamina, Serotonina

5-HIAA – Ácido 5 Hidroxi-Indol-Acético

RCS – Red del Comportamiento Social

AVT – Vasotocina

DOE – Descarga del Órgano Eléctrico

SES – Señales Eléctricas Sociales

8-OH-DPAT – 8-hydroxy-di-n-propylamino tetralin

MDMA – 3,4-Metilendioximetanfetamina

HPLC – Cromatografía Líquida de alta Performance

SAL – Short Attack Latency

LAL – Long Attack Latency

TPH – Triptofano Hidroxilasa

MAOA – Monoamino Oxidasa A

5-HTT – Transportador de 5-HT

Introducción

Niveles de socialidad

Los comportamientos sociales abarcan las interacciones entre individuos de la misma especie en las que uno o más obtienen beneficios, y pueden ser agonísticos, afiliativos o sexuales (Tinbergen, 1953; Nelson, 2006; Blumstein *et al.*, 2010). Según la tendencia a asociarse con otros individuos y formar grupos sociales, las especies se pueden dividir como pertenecientes a diferentes niveles de socialidad (Lee, 1994). Los distintos niveles de socialidad se caracterizan por la estabilidad en las relaciones que establecen los individuos por un tiempo o espacio determinado. En este contexto, las especies pueden ser solitarias, donde los individuos realizan todos sus comportamientos solos excepto el apareamiento; gregarias, donde los individuos se agrupan de manera inestable o altamente sociales, donde los individuos son sociales para todas sus interacciones siguiendo reglas complejas.

Conducta agonística y agresión

La conducta agonística es un comportamiento social relacionado al conflicto entre miembros de la misma especie (Lorenz, 1963; King, 1973). Está ampliamente difundido en invertebrados y vertebrados, y es una importante fuerza modeladora de la estructura social de las especies. Las interacciones agonísticas en general siguen las mismas fases estereotipadas, evaluación, contienda y post-resolución, e incluyen 3 tipos principales de comportamientos: despliegues de amenaza, agresión y despliegues de sumisión (Nelson, 2006; Summers & Winberg, 2006). La agresión entonces es un componente de las interacciones agonísticas, definido como despliegues explícitos realizados con la intención de infligir un daño físico a otro individuo (King, 1973). Los conflictos tienden a aparecer cuando los recursos tales como territorio, alimento o pareja son limitados (King, 1973). La agresión se puede clasificar en diferentes tipos dependiendo del recurso por el que se compita, del contexto o de quien toma la iniciativa de atacar (Wingfield *et al.*, 2006). En contexto agonístico es posible definir 3 tipos de agresión: agresión ligada a la reproducción, agresión ligada a jerarquías sociales y agresión territorial (Moyer, 1968; Brain, 1979; Wingfield *et al.*, 2006).

En los distintos grados de asociación entre individuos que se dan según la socialidad de cada especie no es esperable observar todos los tipos de agresión en contexto

agonístico. Por ejemplo, es poco probable que especies gregarias desplieguen agresión territorial exclusiva, y que especies solitarias desplieguen agresión vinculada al establecimiento de jerarquías sociales.

Control neural del comportamiento social: socialidad y agresión

Hoy se entiende que el control de todos los comportamientos sociales en vertebrados, y la toma de decisiones sociales, depende del procesamiento distribuido en circuitos ubicados principalmente en el telencéfalo y el mesencéfalo. Este conjunto de áreas que se superponen en el control de los diferentes comportamientos sociales se conocen colectivamente como 'red de toma de decisiones sociales, RDS (social decision making network SDMN, O'Connell & Hofmann, (2011, 2012)), y se compone de la red del comportamiento social, RCS (social behavior network, SBN, Newman, (1999)) y el sistema dopaminérgico. La estructura y función de las redes que controlan los comportamientos sociales están conservadas entre vertebrados y ha sido descrita hasta el momento en mamíferos, aves, anfibios y peces (Goodson, 2005; Goodson & Kabelik, 2009; O'Connell & Hofmann, 2011; O'Connell & Hofmann, 2012). Los nodos que componen la RCS se caracterizan por estar conectados recíprocamente, activarse diferencialmente dependiendo del estímulo social particular, ser blanco de hormonas esteroideas sexuales y poseer neuronas productoras de neuropéptidos. Se postula que las áreas de la RCS presentan un patrón de activación espacio-temporal diferente para cada estímulo social, por ejemplo, se puede describir un patrón de activación neuronal particular para el comportamiento sexual y otro para el agonístico (Newman, 1999). Asimismo, de acuerdo al nivel de socialidad de una especie, se pueden observar diferentes patrones de activación (Goodson, 2005; Goodson & Wang, 2006). Por ejemplo, Goodson & Kingsbury (2011), demuestran que existen convergencias en el funcionamiento de la RCS en las especies gregarias y las territoriales en 5 especies de pinzones, monógamos y con cuidado biparental, que difieren en el grado de asociación. El patrón espacio-temporal de activación del sistema AVTérgico dentro de la RCS medido por abordajes comportamentales e histoquímicos es compartido por las especies solitarias y se diferencia del de las especies gregarias.

El control neural de la agresión, como comportamiento social, depende de la activación de la RCS y RDS. En particular, las áreas implicadas en el control de la agresión incluyen: área preóptica media, septum lateral, hipotálamo anterior y ventromedial, núcleo de la estría terminalis, sustancia gris periacueductual y amígdala medial (Nelson & Trainor, 2007). Estas áreas son componentes del sistema límbico, cuyas funciones y estructura están conservadas

entre reptiles y mamíferos (Bruce & Neary, 1995). Asimismo, en peces teleósteos se reconocen áreas telencefálicas equivalentes a determinados componentes del sistema límbico (Echteler & Saidel, 1981; Wullimann & Mueller, 2004). Los mediadores neuroquímicos que controlan y modulan la agresión son serotonina, dopamina, GABA, noradrenalina, vasopresina, óxido nítrico y hormonas esteroideas (Nelson & Trainor, 2007). La idea de que la RCS presenta un patrón de activación espacio-temporal diferente según el comportamiento expresado se puede trasladar a los tipos de agresión. En este sentido, Goodson & Kabelik (2009) comprobaron en los mismos individuos de una especie territorial de pinzón que la participación del sistema AVTérgico es diferente para la modulación de la agresión territorial que para la agresión ligada a la competencia por pareja.

Debido a que los circuitos que controlan la agresión están conservados en vertebrados y que son modulados por los mismos mediadores neuroquímicos; para generar una salida comportamental específica (por ej. un tipo de agresión determinado), es necesario que dichos mediadores se coordinen de manera espacio-temporal específica. Hasta el momento, no existe suficiente evidencia que establezca patrones espacio-temporales de activación de la RCS distintivos de cada tipo de agresión. Una manera de explorar esta hipótesis es buscar modelos (especies y diseños experimentales) que permitan evaluar confiablemente cómo tipos particulares de agresión se corresponden con un determinado patrón de activación de la red.

Modulación serotoninérgica de la agresión

La serotonina (5-HT) es un neurotransmisor clave que se distribuye de manera ubicua en el SNC. Debido a esto, está involucrada en el control de múltiples procesos tales como memoria, aprendizaje, ingesta de alimentos, sueño, reproducción, ritmos circadianos, termo-regulación, percepción del dolor, y comportamientos sociales (Kriegebaum et al., 2010). Asimismo, el principal control inhibitorio sobre la agresión es dependiente de la 5-HT (Nelson & Chiavegatto, 2001). Manipulaciones experimentales que incrementan los niveles de 5-HT provocan una inhibición de la agresión en un amplio rango de vertebrados (Fachinelli et al., 1989; Deckel & Jevitts, 1997; Ferris et al., 1997; Larson & Summers, 2001; Winberg et al., 2001; Perreault et al., 2003; Reist et al., 2003; Sperry et al., 2003). Asimismo, la hipótesis de deficiencia de serotonina sostiene que niveles bajos de actividad del sistema 5-HTérgico están correlacionados con una predisposición a la agresión o violencia. Esta hipótesis fue formulada

en base a la correlación existente entre los niveles cefalorraquídeos bajos de ácido 5 Hidroxi-Indol-Acético (5-HIAA), catabolito de la 5-HT, y el comportamiento agresivo o violento en humanos y primates (Krakowski, 2003). A pesar de la aparente simpleza en la relación entre 5-HT y agresión, los estudios donde se analizan los cambios en niveles de 5-HT o de actividad 5-HTérgica en interacciones agonísticas sin intervención farmacológica muestran que ésta no es tan lineal como generalmente se cree. En muchas especies estudiadas (primates, ratas, hamsters, reptiles y peces), la actividad 5-HTérgica luego de una interacción agonística se incrementa de manera consistente en subordinados (Yodyingyuad et al., 1985; Blanchard et al., 1991; Summers & Greenberg, 1995; Overli et al., 1999; Summers et al., 2005b) y disminuye o permanece incambiada en dominantes (van Erp & Miczek, 2000; Ferrari et al., 2003; Summers et al., 2003). Cuando se analiza el curso temporal de actividad del sistema 5-HTérgico durante las diferentes fases de una interacción agonística, se hace evidente que la relación entre 5-HT y agresión no es lineal, ya que la actividad del sistema fluctúa en las diferentes etapas y es a su vez diferente en individuos dominantes y subordinados (Summers & Winberg, 2006), Fig. 1). Antes de la contienda, individuos que poseen niveles elevados de 5-HT tienen mayor predisposición para ser subordinados. En la etapa de evaluación, se observa un incremento temprano de la 5-HT en individuos dominantes, y en la contienda los niveles de 5-HT se incrementan tanto en dominantes como en subordinados. En la etapa de contienda niveles elevados de 5-HT no provocan una inhibición de la agresión. Luego de la resolución del conflicto, los niveles de 5-HT decrecen en dominantes y permanecen elevados en subordinados, provocando una inhibición de la agresión.

El efecto inhibitorio de la 5-HT sobre la agresión está mediado principalmente por receptores del tipo 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B} (Nelson & Chiavegatto, 2001; Nelson & Trainor, 2007). La administración de agonistas de receptores 5-HT_{1A} inhiben la conducta agonística y/o inducen subordinación en teleósteos (Clotfelter et al., 2007; Allee et al., 2008), anfibios (Ten Eyck, 2008), reptiles (Deckel & Fuqua, 1998), aves (Sperry et al., 2003), y mamíferos (Olivier & Mos, 1992; Sánchez et al., 1993; Miczek et al., 1998; Simon et al., 1998; de Boer et al., 1999).

Aún cuando está ampliamente demostrada la vinculación entre la 5-HT y la agresión, no existen evidencias que determinen si la 5-HT está involucrada de manera diferente en la regulación de los distintos tipos de agresión desplegados en el contexto agonístico.

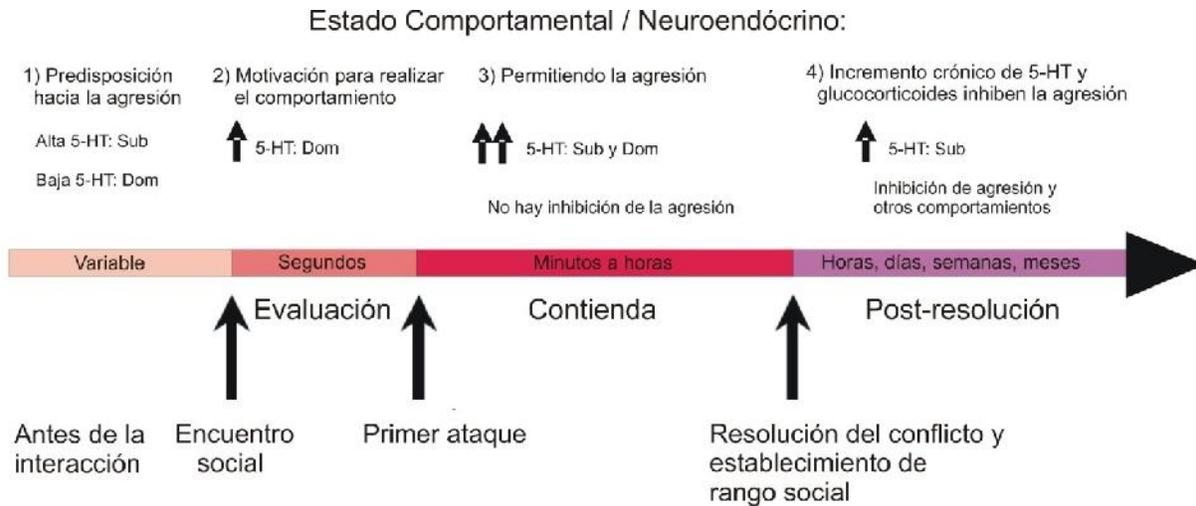


Figura 1: Esquema representativo de las etapas de los encuentros agonísticos y la actividad del sistema serotoninérgico asociada. Modificado de Summers y Winberg, 2006.

Gymnotiformes como modelo para estudiar las bases neurales de comportamientos sociales

Los teleósteos ofrecen un modelo experimental novedoso y ventajoso para el estudio de la agresión y sus mecanismos neurales, dado que poseen una RCS más sencilla y accesible a la exploración experimental directa. En particular, el uso de Gymnotiformes, peces eléctricos de descarga débil, presenta ventajas para el estudio de las bases neurales de comportamientos sociales. Todo comportamiento en peces eléctricos incluye despliegues locomotores y eléctricos. Las modulaciones transitorias de la frecuencia de descarga del órgano eléctrico (DOE) sirven de señales eléctricas sociales (SES) distintivas y conspicuas, fáciles de registrar, caracterizar y cuantificar. Éstas son sexualmente dimórficas, presentan variaciones estacionales, y son moduladas por el contexto social (Silva *et al.*, 2008). El circuito neural responsable de la generación del la DOE y de sus modulaciones de frecuencia ha sido muy estudiado y es bien conocido, lo que facilita la búsqueda de los mecanismos de control subyacentes. La frecuencia de la DOE es controlada por un núcleo electromotor bulbar, de descarga espontánea. Este núcleo es influido por entradas superiores pre-marcapasos, para producir modificaciones transitorias de frecuencia que constituyen SES (revisado en Quintana, 2010).

Se han hecho importantes contribuciones sobre la modulación serotoninérgica de fenómenos periféricos como la forma de onda de la DOE y su plasticidad circadiana, así como su influencia en contextos sociales en *Brachyhyopomus gauderio*, desarrollado por el grupo del Dr. Philip Stoddard. En individuos aislados de *B. gauderio*, la administración de 5-HT provoca un aumento en la amplitud y de la duración de la fase P2 de la DOE, señales que, en un contexto agonístico son rápidamente moduladas por los machos (Stoddard *et al.*, 2003). La modulación serotoninérgica de la forma de onda no es debida a una acción directa de 5-HT sobre el órgano eléctrico, sino a la acción indirecta a través de melanocortinas (Markham & Stoddard, 2005). La administración de 8-OH-DPAT (agonista de receptores presinápticos y postsinápticos 5-HT_{1A}) provoca una disminución de la amplitud y de la duración de la fase P2 de la DOE (Allee *et al.*, 2008). De los estudios antes mencionados se extrae que la 5-HT y los receptores 5-HT_{1A} están involucrados en la modulación de las señales de comunicación.

Los antecedentes que sugieren una modulación serotoninérgica sobre el comportamiento agonístico en gymnotiformes son escasos. En *Apteronotus leptorhynchus*, los núcleos pre-marcapasos poseen inervación serotoninérgica (Johnston *et al.*, 1990). En esta misma especie la administración de 5-HT disminuye la producción de chirps (aumentos breves y transitorios en la frecuencia de la DOE acompañados de alteraciones en la forma de la DOE) de un pez frente a un 'playback' (señal eléctrica de otro pez grabada anteriormente y luego reproducida en el tanque de otro pez) (Maler & Ellis, 1987). En *Gymnotus omarorum* (antes *Gymnotus carapo*), un tratamiento farmacológico con MDMA (3,4-Metilendioximetanfetamina), que aumenta la transmisión serotoninérgica, provoca una disminución de despliegues locomotores característicos de los encuentros agonísticos, como las mordidas y las trabadas de mandíbulas (Capurro *et al.*, 1997). En *A. leptorhynchus*, estudios posteriores muestran que el dimorfismo en la generación de chirps está correlacionado con la inervación serotoninérgica: dado que los núcleos pre-marcapasos responsables de los chirps están inervados por más terminales de 5-HT en hembras que en machos, e incluso existe una mayor inervación serotoninérgica en hembras subordinadas que en aquellas socialmente dominantes (Telgkamp *et al.*, 2007). En cuanto al rol de los receptores 5HT_{1A}, en *A. leptorhynchus* la administración de 8-OH-DPAT parece aumentar la conducta agonística ya que incrementa el número de chirps producidos frente a un playback.

Brachyhyppopomus gauderio (Giora & Malabarba, 2009) es una especie gymnotiforme de pulso, distribuida al noreste del Uruguay y suroeste de Brasil. Durante el período reproductivo (noviembre a enero) exhibe un marcado dimorfismo sexual morfológico y electrofisiológico (Hopkins *et al.*, 1990; Caputi *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 1999; Miranda *et al.*, 2008). Esta especie es gregaria y vive en grandes grupos con una proporción sexual de 3 hembras a 1 macho durante el período reproductivo, lo que sugiere un sistema de apareamiento poligínico (Miranda *et al.*, 2008).

Gymnotus omarorum (Richer-de-Forges *et al.*, 2009) es una especie gymnotiforme de pulso, distribuida en todo el Uruguay (Silva *et al.*, 2003; Richer-de-Forges *et al.*, 2009). A diferencia de *B. gauderio*, no presenta dimorfismo sexual, es un pez altamente agresivo, solitario, con permanencia y defensa de territorio (Miranda, 2007). Es un reproductor estacional que despliega comportamiento agresivo dentro y fuera del período reproductivo. La ausencia de dimorfismo sexual y la presencia de comportamiento agresivo fuera del período reproductivo hacen de *G. omarorum* un excelente candidato para estudiar agresión territorial.

Dos especies de gymnotiformes con diferente nivel de socialidad constituyen un modelo con ventajas para 1- identificar diferentes tipos de agresión desplegados por cada especie, y 2- evaluar diferencias interespecíficas en la modulación serotoninérgica vinculada a diferentes tipos de agresión.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis de trabajo

Las bases neurales de la conducta agonística están conservadas en vertebrados, y el rol de la serotonina como principal inhibidor de la agresión es ampliamente aceptado. Sin embargo, hasta el momento no se ha realizado un estudio comparativo que evalúe si patrones de activación particulares del sistema serotoninérgico están asociados a diferentes tipos de agresión y si dicha activación diferencial constituye una estrategia neural que subyace al despliegue de diferentes tipos de agresión.

La hipótesis de trabajo de esta tesis plantea que existe una activación diferencial del sistema serotoninérgico distintivo de cada tipo de agresión.

Objetivo general

Evaluar si existen diferencias en el control serotoninérgico entre dos tipos de agresión evidenciadas en *Gymnotus omarorum* y *Brachyhypopomus gauderio*.

Objetivos específicos

- 1- Identificación de los tipos de agresión desplegados por *Gymnotus omarorum* y *Brachyhypopomus gauderio* mediante la caracterización del comportamiento agonístico en ambas especies.
- 2- Determinación de los niveles tisulares de 5-HT y recambio serotoninérgico en *Gymnotus omarorum* y *Brachyhypopomus gauderio*. Evaluación en dominantes, subordinados y controles. Comparar la actividad del sistema serotoninérgico entre tipos de agresión.
- 3- Estudiar el efecto de un agonista 5-HT_{1A} en *Gymnotus omarorum* y *Brachyhypopomus gauderio* con el fin de evaluar la modulación farmacológica diferencial entre tipos de agresión.

Los resultados se organizan en 3 capítulos (Cap 1, Cap 2 y Cap 3), cada uno de ellos con una discusión específica (Fig. 2). El estudio preliminar en el que se caracteriza la conducta agonística en ambas especies y se identifica el tipo de agresión desplegado por cada una constituye el capítulo 1, dividido en 2 secciones: A- Caracterización de la conducta agonística y tipo de agresión en *G. omarorum* (resultados que componen el artículo adjunto); y B- Caracterización de la conducta agonística y tipo de agresión en *B. gauderio*. En el capítulo 2, se exploran las diferencias entre los 2 tipos de agresión en la actividad basal del sistema 5-HTérgico y los cambios de dicha actividad luego de las contiendas. En el capítulo 3, se exploran las diferencias entre los 2 tipos de agresión en la modulación farmacológica con 8-OH-DPAT (agonista de receptores 5-HT_{1A}).

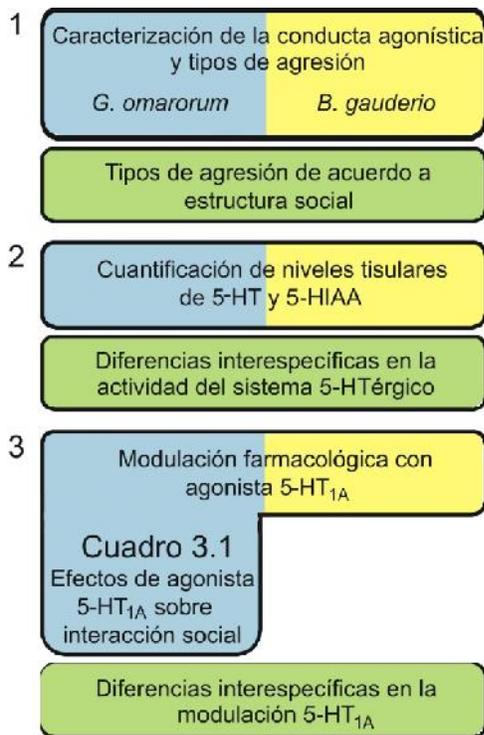


Figura 2: Organización de los resultados.

- Resultados de *G. omarorum*.
- Resultados de *B. gauderio*.
- Discusión

Métodos

Animales

Se utilizaron machos sexualmente maduros de *Brachyhypopomus gauderio* (Giora & Malabarba, 2009), anteriormente denominado *B. pinnicaudatus*. El rango de longitud corporal fue de 16,5 a 22 cm y el rango de peso de 6,5 a 16 g. *B. gauderio* exhibe dimorfismo sexual morfológico (Hopkins, 1991), lo que permite la fácil separación de machos y hembras. Todos los experimentos en *B. gauderio* se realizaron durante el periodo reproductivo, que comprende los meses de noviembre a marzo. Se utilizaron adultos no-reproductivos de *Gymnotus omarorum* (Richer-de-Forges *et al.*, 2009), anteriormente denominado *G. carapo*. El rango de longitud corporal fue de 14.5 a 30 cm y de peso corporal de 7 a 78.4 g. Debido a que *G. omarorum* no exhibe dimorfismo sexual morfológico ni electrofisiológico, el sexo de los individuos y el estado reproductivo fue determinado luego de los experimentos por inspección gonadal. Los experimentos en *G. omarorum* se realizaron durante el periodo no reproductivo, que comprende los meses de mayo a octubre.

Colecta y alojamiento

Brachyhypopomus gauderio fue obtenido de una población nativa (Laguna Lavalle, 31°48'S, 55°13'W, Departamento de Tacuarembó, Uruguay) y de una colonia ubicada en Miami, Estados Unidos (Florida International University). Los peces fueron colectados con un calderín de 1x1m, utilizando un detector de señales eléctricas compuesto por dos electrodos de registro conectados a un parlante que detector transforma la señal eléctrica emitida por el pez en un sonido audible (Silva *et al.*, 2003). Se alojaron en piscinas exteriores de 500 l replicando la proporción social observada en la naturaleza durante el período reproductivo (2 machos y 6 hembras) (Miranda *et al.*, 2008). *Gymnotus omarorum* se colectó en la Laguna del Sauce (34°51'S, 55°07'W, Departamento de Maldonado, Uruguay), y los individuos fueron alojados en compartimientos individuales ubicados en piscinas exteriores de 500 l.

Ambas especies se alojaron en las piscinas exteriores por al menos 10 días antes de la realización de los experimentos, para asegurar su correcta aclimatación luego del transporte. Las variables ambientales fueron mantenidas dentro de los rangos normales encontrados en el hábitat natural (condiciones de período reproductivo para *B. gauderio* y de período no reproductivo para *G. omarorum*, Silva *et al.* 2003). La temperatura del agua se mantuvo entre

20°C y 30 °C (período reproductivo) y entre 8 y 21°C (período no reproductivo). El fotoperíodo natural se encuentra entre Luz-Oscuridad (LD) 14:10 a LD 13:11 (período reproductivo) y LD 10:14 a LD 11:13 (período no reproductivo). La conductividad del agua se mantuvo por debajo de 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$ empleando agua deionizada. La superficie del agua se cubrió con plantas acuáticas (*Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes*, *Salvinia* sp) que ofrecen refugio y remeda el hábitat natural. Los peces fueron alimentados con *Tubifex tubifex* ad libitum. Todos los procedimientos incluidos en el proyecto de Maestría así como el FCE_2009_2472 fueron aprobados por el comité de ética del IIBCE (protocolo No.007/02/2010). La colecta de animales fue aprobada por la DINARA, MGAP (resolución No. 065/2004).

Estación experimental

Los experimentos conductuales se realizaron en una estación experimental que permite el registro simultáneo de video y señales eléctricas, Fig. 3 (Silva *et al.*, 2007). Los tanques de 50 l (50 x 60 x 20 cm), fueron acondicionados para reproducir las condiciones del hábitat natural, y se encontraban visual, acústica y térmicamente aislados del ambiente. Los parámetros fisicoquímicos (temperatura conductividad y pH del agua) así como el ciclo luz-oscuridad de las piscinas exteriores fue reproducido en los tanques interiores. Los experimentos se realizaron durante la noche y en oscuridad total, y los tanques se iluminaron con paneles de diodos de emisión de luz infrarroja (LEDs-53F3BT, Fablet y Bertoni). El fondo de los tanques es enfocado por cámaras sensibles a la luz infrarroja (SONY CCD-Iris y RoHS CCD Digital Video Camera). Dos pares de electrodos ortogonales adosados a las paredes de los tanques permiten el registro de la DOE de peces en libre movimiento y las señales eléctricas se amplificaron (FLA-01, Cygnus Technologies Inc). Tanto las imágenes como las señales eléctricas se adquirieron en una computadora por medio de una tarjeta de video (Pinnacle Systems, PCTV-HD pro stick) y se grabaron para ser analizadas. Los peces permanecieron en los tanques de registro durante 4 horas previo al experimento, a temperatura constante (27–29°C en período reproductivo y 20–22°C en período no reproductivo).

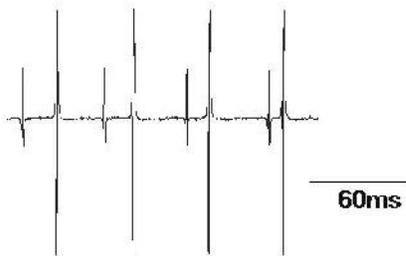


Figura 3: Registros de la estación conductual. Arriba: se muestra un cuadro obtenido de un video filmado en oscuridad total y grabado con luz infrarroja. Es posible observar desde el fondo de la pecera los 2 peces (en este caso de la especie *B. gauderio*) y como se intenta recrear el ambiente mediante plantas acuáticas. En rojo y verde se representa la ubicación de los electrodos que registran las DOEs. Abajo: descargas registradas en uno de los canales (un par de electrodos). Se observa que la amplitud de las descargas es diferente entre los 2 peces por su posición relativa respecto al par de electrodos.

Protocolos conductuales

Gymnotus omarorum

1) Protocolo de compuerta

El comportamiento agonístico y el tipo de agresión de *G. omarorum* fue evaluado en encuentros diádicos utilizando un protocolo de compuerta durante el período no reproductivo ($n = 33$, Fig. 4). Este procedimiento asume que el territorio es el único recurso por el cual los individuos compiten y provee a ambos contendientes simetría en cuanto al recurso y a su valor: arena no enriquecida, territorio de igual tamaño, igual tiempo de residencia y experiencia previa. Se utilizaron adultos con una diferencia de peso del 0.2% al 50% y diferencia de longitud del 0% al 23.3%.

Diez minutos luego del apagado de la luz se levantó la compuerta, y los peces se separaron 10 min luego de la resolución del conflicto. Dominante y subordinado fueron retirados del tanque y eutanizados con una sobredosis de 0.1% 2-fenoxietanol. Los animales utilizados para la cuantificación de monoaminas fueron eutanizados de manera mecánica, por decapitación. Luego de la eutanasia el sexo fue identificado por inspección gonadal.

Los protocolos conductuales en esta especie se realizaron durante el período reproductivo debido a que las SES previamente reportadas en contexto reproductivo y agonístico sólo se observan durante el período reproductivo (Perrone et al., 2009). Con el objetivo de identificar el recurso por el cual los machos luchan (territorio y/o obtención de pareja) y para evidenciar el tipo de agresión desplegado por esta especie (agresión territorial o agresión ligada a la reproducción) realizaron encuentros diádicos entre machos y se evaluaron 3 protocolos conductuales.

Se utilizaron machos sexualmente maduros con una diferencia de peso del 0 al 34% y una diferencia de longitud del 0 al 23%. Para evaluar su estado reproductivo los machos fueron testeados una noche previa al experimento con una hembra. Únicamente aquellos que realizaron despliegues de cortejo, es decir los que exhibieron 2 de los siguientes 3 comportamientos: despliegues locomotores característicos del cortejo, aumento nocturno de la frecuencia basal de la DOE y emisión de chirps (Perrone et al., 2009), fueron testeados luego durante la segunda noche en uno de los siguientes protocolos (Fig. 4):

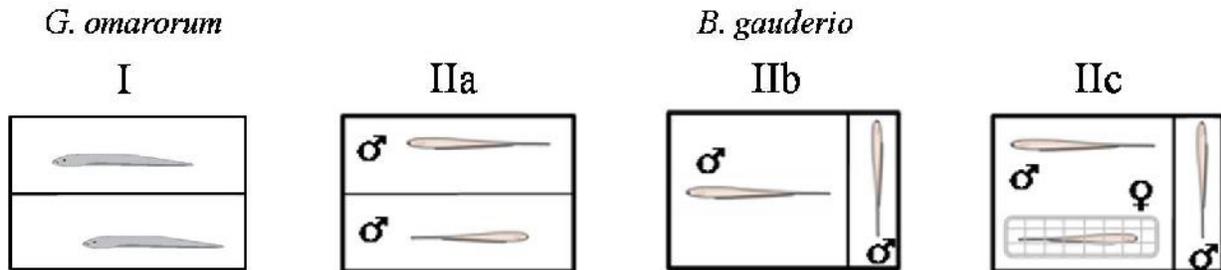


Figura 4: Protocolos conductuales utilizados para evaluar agresión. Protocolo I de compuerta en encuentros diádicos de *G. omarorum*. Protocolos II a, b, c, encuentros entre machos de *B. gauderio*. Protocolo de compuerta (IIa), Protocolo Residente – Intruso (IIb), Protocolo Residente – Intruso con hembra presente (IIc). Todos los protocolos en *B. gauderio* se realizaron con machos pre-testeados la noche anterior con una hembra.

IIa) Protocolo de compuerta

Cuatro horas antes de comenzado el experimento, ambos machos pre-testeados fueron colocados en compartimientos iguales separados por una compuerta. Se evaluó la agresión

territorial en encuentros diádicos entre machos de *B. gauderio* utilizando el mismo procedimiento que *G. omarorum* (protocolo IIa, n=8).

IIb) Protocolo residente-intruso

Debido a que el territorio *per se* puede no ser suficiente para desencadenar agresión en esta especie gregaria, se utilizó un protocolo asimétrico con el objetivo de aumentar la motivación de los machos hacia la agresión. Se enfrentaron machos residentes (pre-testeados) contra machos intrusos con una diferencia de tamaño significativa a favor del residente. En este protocolo, el macho residente posee una asimetría de tamaño (y por lo tanto más capacidad de lucha para defender el recurso) pero también se agrega una asimetría en el valor del recurso ya que el residente es dueño del territorio en el que la noche anterior cortejó una hembra. Treinta minutos luego del atardecer se retiró la hembra y 5 min después se introdujo un macho intruso en el tanque. Los peces se separaron 10 min luego de la resolución del conflicto (n = 8).

IIc) Protocolo residente-intruso con hembra presente

Para testear si la presencia de la hembra era necesaria para desencadenar agresión entre machos se utilizó un tercer procedimiento similar al protocolo IIb pero manteniendo la hembra en una red durante la contienda (n = 8).

Administración de 8-OH-DPAT

La modulación farmacológica de la conducta agonística se realizó utilizando el protocolo I en *G. omarorum* (n=12), que desencadena agresión territorial y el protocolo IIc en *B. gauderio* (n=8), que desencadena agresión ligada a la reproducción en la configuración más compleja y similar a la natural. El efecto de la experiencia previa en encuentros agonísticos juega un papel importante condicionando un segundo encuentro, por lo que no se pueden utilizar los mismos individuos para realizar el encuentro basal sin droga (control) y luego modulado farmacológicamente. En *G. omarorum* la única variable importante para la determinación de la dominancia es el peso (ver Tabla 1 en capítulo 1A), por lo que se utilizaron diadas con una diferencia de peso corporal del 6.1 al 29.7% en las que de acuerdo al análisis estadístico es posible predecir que el pez más pesado ganará la contienda. En *B. gauderio* no se realizó el

mismo análisis que en *G. omarorum*, por lo que se tomó la decisión de utilizar díadas con una asimetría positiva en diferencia de peso y longitud a favor del residente, que en experimentos controles (Protocolo IIc) resultan dominadas en todos los casos por el residente (ver Tabla 2 en capítulo 1B). El agonista de receptores 5-TH_{1A}, 8-hydroxy-di-n-propylamino tetralin (8-OH-DPAT) se compró en Tocris Cookson Inc. (Ballwin, MO, USA). Se inyectaron los dominantes potenciales (el macho residente de mayor tamaño en *B. gauderio* y el individuo más pesado en *G. omarorum*) intraperitoneal o intramuscular una hora antes del encuentro. Se inyectó 1µl/g de peso corporal a una concentración de 2.5 mM de 8-OH-DPAT disuelto en salino fisiológico como fue previamente reportado (Stoddard et al., 2003; Allee et al., 2008).

Procesamiento de datos conductuales

Despliegues locomotores

Los videos se analizaron utilizando los mismos criterios en ambas especies. Se identificaron las mismas fases en encuentros agonísticos en ambas especies: a) evaluación o pre-conflicto: desde el tiempo 0 (remoción de compuerta en los protocolos I y IIa; introducción del intruso en protocolos IIb y IIc) a la aparición del primer ataque; b) contienda: desde la aparición del primer ataque a la resolución del conflicto (tiempo de resolución); c) fase de post-resolución: 10 min. La resolución del conflicto se estableció como el momento en que se observan 3 alejamientos consecutivos sin ataques por parte del subordinado. Este criterio define la resolución del conflicto de manera no-ambigua ya que los peces que realizan los 3 alejamientos nunca cambiaron su estatus de subordinados en los 10 min. posteriores de interacción. La tasa de ataques se calculó dividiendo el número de ataques (mordidas, topeteos y trabadas de mandíbulas, Black 1970) por la duración del conflicto en segundos. En *G. omarorum* se realizó un análisis posterior de los niveles de agresión para correlacionarlos con las señales eléctricas, separándolos en bajos (tasa de ataques <0.2) y medios (tasa de ataques ≥0.2, <0.4).

Despliegues eléctricos

Mediante el sistema de adquisición simultánea de señales eléctricas y de despliegues locomotores es posible distinguir cual DOE es emitida por cada individuo de la díada. Las señales eléctricas adquiridas fueron analizadas determinando amplitud e intervalo entre DOEs con Clampfit (Molecular Devices Corporation). Se calculó la latencia de aparición del primer

apagado y la del primer chirp como el tiempo al primer apagado o chirp dividido la latencia al primer ataque. La frecuencia de apagados y frecuencia de chirps se calculó por separado para la fase de contienda y la post-resolución dividiendo el número de apagados o chirps dividido la duración de la fase en segundos. Se midió el tiempo total interrumpido durante la contienda y post-resolución como el porcentaje de tiempo apagado por duración de la fase.

Análisis de monoaminas

Se cuantificó 5-HT y 5-HIAA en dominantes y subordinados de *G. omarorum* (n=7 díadas) y *B. gauderio* (luego de protocolo IIc, n = 7 díadas). Como controles, para determinar los niveles basales de 5-HT y 5-HIAA se utilizaron individuos sometidos a la misma manipulación excepto el enfrentamiento agonístico (*G. omarorum*, n = 7; *B. gauderio*, n = 6). Diez minutos luego de la resolución del conflicto los peces se separaron y se mantuvieron aislados durante una hora. Luego se decapitaron y se realizó la disección del cerebro. Para la cuantificación de monoaminas se seleccionó el telencéfalo ya que esta estructura en teleósteos posee gran parte de la RDS (O'Connell & Hofmann, 2011; 2012) así como análogos del sistema límbico (Echteler & Saidel, 1981; Wullimann & Mueller, 2004), importantes en la regulación de la agresión. El telencéfalo (excluyendo el bulbo olfatorio) se seccionó del resto del cerebro y se almacenó envuelto en papel de aluminio a -80°C. Las muestras de tejido congelado se pesaron y se homogeneizaron agregando ácido perclórico 0.1M. Luego se centrifugaron 15 min. a 15000 g a 5 °C. Se inyectaron muestras de sobrenadante en un sistema de HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Performance) con detección electroquímica. El HPLC (bomba PM-80 BAS, USA) está equipado con una columna C-18 (partículas de 5 µm, 150 x 4.6 mm; Phenomenex, USA) acoplada a un detector electroquímico (LC-4CBAS) con un potencial de oxidación de +0.75V (electrodo de trabajo de carbón vidriado versus un electrodo de referencia Ag/AgCl). La composición de la fase móvil consiste de ácido cítrico (0.15M), octil sulfato de sodio (0.6 mM), 4% acetonitrilo, 1.6 tetrahidrofurano a pH 3.2 a un flujo de 1.2 ml/min. Las muestras se cuantificaron por comparación con una solución estándar de concentraciones de 5-HT y 5-HIAA conocidas. Se calculó la relación 5-HIAA/5-HT como medida de la actividad del sistema 5-HTérgico.

Los datos locomotores, eléctricos y tisulares fueron analizados con test no-paramétricos: Test pareado de Wilcoxon (para variables pareadas del mismo pez o de contendientes en una día), test de Mann-Whitney U (para variables independientes usando set de datos de 2 peces diferentes), y test de Kruskal Wallis (para variables independientes usando set de datos de 3 peces diferentes). Por esta razón, los datos se expresan como medianas y MAD (desviación mediana absoluta).

Regresión Binomial

Para explorar cuáles factores (asimetrías de la día) influenciaban el resultado de las contiendas en *G. omarorum* se utilizó una regresión binomial con un modelo logit en el que la variable dependiente (resultado de la contienda) toma el valor = 1 para el dominante y el valor = 0 para el subordinado. Se testearon como variables independientes: a- diferencia de peso = (peso de pez focal – peso del contendiente / peso del pez focal); b- diferencia de longitud = (longitud de pez focal – longitud del contendiente / longitud del pez focal); c- sexo de cada individuo y d- combinación de sexos (intrasexual o intersexual). El modelo puede ser expresado mediante la siguiente ecuación en la que Ω adopta la función logit y ϵ representa un error $N(0, \sigma^2)$:

Resultado de la contienda = $\Omega (\beta_1 \text{ *diferencia de peso, } \beta_2 \text{ *diferencia de longitud, } \beta_3 \text{ *sexo de cada individuo, } \beta_4 \text{ *combinación de sexos} + \epsilon)$. Basados en esta ecuación, las variables independientes que influyen el resultado de la contienda con aquellas en las que β es significativamente diferente de 0 cuando se testea usando un t-test. Debido a que el modelo requiere que las observaciones sean independientes entre individuos, se seleccionaron al azar un individuo de cada día como pez focal y se corrió el modelo para esta muestra. Para evitar un posible sesgo en el muestreo, y garantizar la robustez de los resultados, el mismo procedimiento se replicó tomando un total de 10 muestras al azar y los resultados se presentan como un promedio de los coeficientes y parámetros en la Tabla 1.

Organización temporal de las SES

Para analizar la secuencia temporal en la emisión de las SES con respecto a la resolución del conflicto en *G. omarorum* se utilizó un test Chi-cuadrado (χ^2).

Modulación farmacológica con 8-OH-DPAT

Los resultados obtenidos por manipulación farmacológica con 8-OH-DPAT se contrastaron con resultados de díadas control, no manipuladas farmacológicamente con asimetrías de tamaño en el mismo rango (*G. omarorum*: n=12 seleccionadas al azar de un total de 22 díadas para la comparación interespecífica, Tabla 4; n=17 para la evaluación del efecto de 8-OH-DPAT en la interacción social, Cuadro 3.1; *B. gauderio* n=8, protocolo IIc, Tabla 4). Para evaluar el efecto de la administración 8-OH-DPAT sobre el resultado de la contienda en ambas especies se utilizó un test Chi-cuadrado (χ^2). Para estudiar la relación entre los niveles de agresión de ambos contendientes en *G. omarorum* en díadas control y con administración de 8-OH-DPAT se realizaron regresiones lineales.

Capítulo 1 Caracterización de la conducta agonística e identificación de tipos de agresión

Objetivo general:

Evaluar si existen diferencias en el control serotoninérgico entre dos tipos de agresión evidenciadas en *Gymnotus omarorum* y *Brachyhypopomus gauderio*.

Objetivos específicos:

1- Identificación de los tipos de agresión desplegados por *Gymnotus omarorum* y *Brachyhypopomus gauderio* mediante la caracterización del comportamiento agonístico en ambas especies.

2- Determinación de los niveles tisulares de 5-HT y recambio serotoninérgico en *Gymnotus omarorum* y *Brachyhypopomus gauderio*. Evaluación en dominantes, subordinados y controles. Comparar la actividad del sistema serotoninérgico entre tipos de agresión.

3- Estudiar el efecto de un agonista 5-HT_{1A} en *Gymnotus omarorum* y *Brachyhypopomus gauderio* con el fin de evaluar la modulación farmacológica diferencial entre tipos de agresión.

Resultados

A- *Gymnotus omarorum*

Estructura de los conflictos y emisión de señales eléctricas sociales

Cuando se sometieron individuos de *G. omarorum* fuera del período reproductivo en díadas inter- e intra-sexuales a un protocolo de compuerta (Fig. 4), todas las díadas testeadas (n = 33) presentaron comportamiento agonístico el cual finalizó en una relación de dominancia-subordinación. Todas las interacciones siguieron las mismas fases (Fig 5): a- una fase corta de evaluación o pre-conflicto (latencia al primer ataque = 30.5 ± 36 s), b- fase de contienda (duración del conflicto = 147 ± 82 s) caracterizada por despliegues de agresión y c- fase de post-resolución en la cual nunca se observó la reversión de la relación de dominancia.

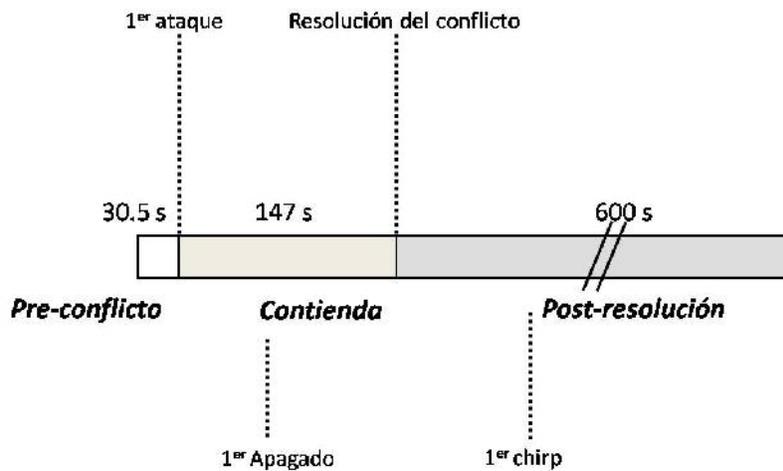


Figura 5: Estructura temporal de encuentros agonísticos en *G. omarorum*.

Se muestran las medianas de las duraciones de las fases (expresadas en segundos). Modificado de Batista et al. (2012).

El comportamiento agonístico de *G. omarorum* incluyó despliegues locomotores y eléctricos. Durante la contienda, se observaron despliegues locomotores de agresión especie-específicos; trabadas de mandíbula y despliegues laterales donde ambos peces nadan empujándose el uno al otro. En los encuentros diádicos registrados, los peces produjeron señales eléctricas fácilmente identificables de la DOE basal: SIDs (incrementos rápidos de la frecuencia de la DOE, Fig. 6a); apagados (cese completo de la descarga, Fig. 6a,b); y chirps (aumentos breves y transitorios en la frecuencia de la DOE acompañados de alteraciones en la forma de la DOE, Fig. 6c,d).

Resultado de la contienda

El efecto de las asimetrías de la díada (diferencia de peso, diferencia de longitud, sexo de cada individuo y combinación de sexos) como variables importantes para la determinación del resultado de la contienda fueron evaluadas mediante una regresión binomial. Únicamente la diferencia de peso resultó estadísticamente significativa para explicar el resultado de la contienda, siendo la diferencia de longitud, sexo de cada individuo y combinación de sexos no significativas (Tabla 1). El modelo fue consistente en su significancia para la diferencia de peso en los 10 muestreos al azar presentando un R^2 siempre por encima de 0.25 (R^2 mínimo = 0.2652, R^2 máximo = 0.3485). El poder predictivo del modelo fue validado, y fue exitoso en su predicción del resultado real en más del 70% de los casos (porcentaje correctamente clasificado mínimo = 73.29%, porcentaje correctamente clasificado máximo = 85.29%).

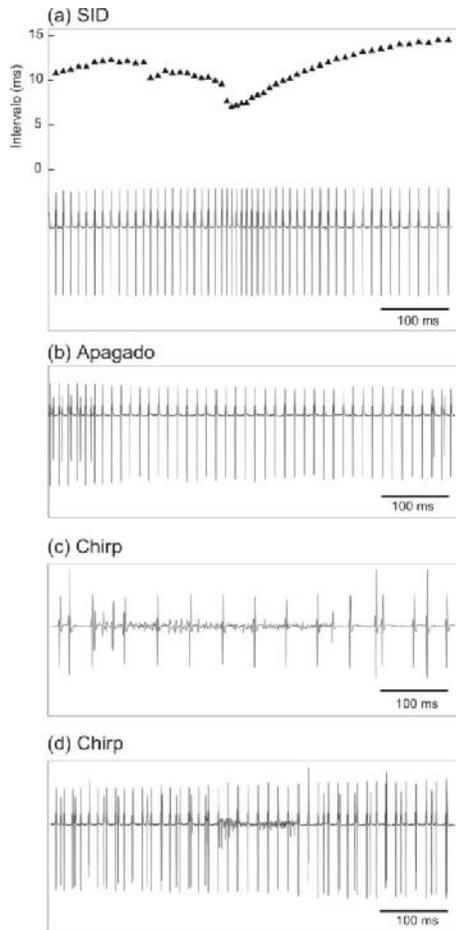


Figura 6: Señales eléctricas sociales registradas durante interacciones agonísticas en *G. omarrorum*. (a) Aumento y disminución rápida de la frecuencia de descarga (Sharp increase decrease 'SID') producido por el pez dominante durante un apagado del pez subordinado. En el registro inferior se observa solamente la DOE del individuo dominante porque el individuo subordinado interrumpió su descarga. Los triángulos muestran la gráfica de intervalos del registro eléctrico. (b) Apagado de la DOE producido por el pez subordinado. La DOE de menor amplitud cesó durante aproximadamente 500 ms. (c, d) Dos ejemplos de chirps emitidos por el pez subordinado mientras el pez dominante permanece descargando de manera regular. Modificado de Batista et al. (2012).

Tabla 1: Regresión binomial usando modelo logit para evaluar la influencia de la diferencia de peso, diferencia de longitud, sexo y sexo de la dída sobre el resultado de la contienda.

Resultado de la contienda (N=33, R²=0.2988, Poder predictivo: 0.806)				
Factores	β	p	Min	Max
Diferencia de peso	9.2911	0.019*	1.60	16.982
Diferencia de longitud	-1.5227	0.6926	-10.692	7.6464
Sexo de c/individuo	-0.1064	0.49	-1.9664	1.7535
Combinación de sexos	-0.3863	0.5177	-2.5755	1.8029
Constante	0.5882	0.3535	-1.5531	2.7296

Los valores de los coeficientes de la regresión (β) son promedios de 10 muestreos al azar (ver Métodos). * β significativamente diferente de 0. Note que el rango entre los valores mínimos y máximos adoptados por β incluyen el valor 0 para todas las variables independientes, excepto para la variable diferencia de peso. Modificado de Batista et al. (2012).

Patrón temporal de la emisión de señales eléctricas sociales

Tanto los apagados de la descarga como los chirps son señales putativas de sumisión. Durante la fase de contienda, ambos contendientes interrumpieron su descarga, incluso de manera simultánea. Luego de la resolución del conflicto solamente los subordinados produjeron chirps y apagaron la descarga (apagados_{dominante} vs apagados_{subordinado}, test pareado de Wilcoxon, $T = 3.5$, $p = 0.00035$; chirps_{dominante} vs chirps_{subordinado}, test pareado de Wilcoxon, $T = 0$, $p = 0.0004$). Los apagados se produjeron durante la contienda y post-resolución, mientras que los chirps se emitieron principalmente durante la post-resolución. Como se muestra en la Fig 7, el primer apagado se produjo durante la contienda (latencia al 1^{er} apagado = 92 ± 55.2 s), mientras que el primer chirp se emitió durante la post-resolución (latencia al 1^{er} chirp = 273 ± 165 s). La emisión de las señales eléctricas de sumisión mostró un patrón temporal consistente: el 1^{er} apagado precedió a la resolución del conflicto en 19 de las 25 interacciones que realizaron apagados ($\chi^2 = 6.76$, $p < 0.01$) y la resolución del conflicto precedió al 1^{er} chirp en 15 de las 21 interacciones ($\chi^2 = 3.86$, $p < 0.05$). Asimismo, el 1^{er} apagado precedió al 1^{er} chirp en 16 de las 21 interacciones que realizaron las 2 señales ($\chi^2 = 5.76$, $p < 0.05$). Además, el patrón temporal en la emisión de chirps y apagados fue diferente entre fases, mostrando ambas señales una frecuencia de emisión mayor en la fase de post-resolución en comparación con la contienda (Fig. 7a, frecuencia de apagados: test pareado de Wilcoxon, $T = 91$, $p = 0.05$; frecuencia de chirps: test pareado de Wilcoxon, $T = 52$, $p = 0.02$); y el tiempo en que la descarga del subordinado permanece interrumpido se incrementó desde la fase de contienda a la post-

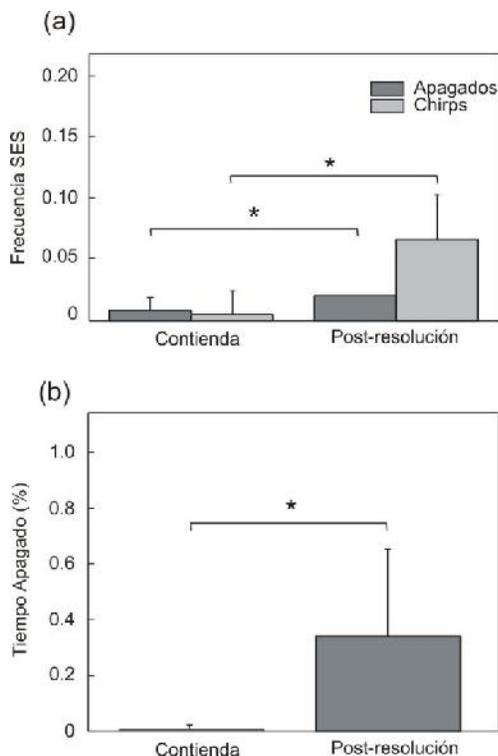


Figura 7: Distribución de señales eléctricas de sumisión con respecto a las fases del conflicto en *G. omarorum*. (a) La frecuencia de apagados y chirps se incrementa de la contienda a la post-resolución. * $p < 0.05$, test pareado de Wilcoxon, apagados $N = 25$ y chirps $N = 21$. (b) El porcentaje de tiempo interrumpido se incrementa de la contienda a la post-resolución. * $p < 0.05$, test pareado de Wilcoxon, $N = 25$. Los valores se expresan como medianas, las barras de error representan el MAD. Modificado de Batista et al. (2012).

resolución (Fig. 7b porcentaje de tiempo apagado: test pareado de Wilcoxon, T=17, p<0.01).

B- Brachyhypopomus gauderio

Estructura de los conflictos y tipo de agresión

Cuando se sometieron machos reproductivos de *B. gauderio* a un protocolo de compuerta (protocolo IIa, Fig 4), con el objetivo de evaluar si la adquisición de territorio adicional es suficiente incentivo para desencadenar agresión en esta especie, solamente 2 de 8 díadas presentaron conducta agonística, y en sólo 1 de ellas se observó resolución del conflicto (Tabla 2). Aún cuando esos machos exhibieron comportamiento de cortejo la noche anterior, cuando se los expuso a otro macho en la segunda noche se observaron escasas interacciones con agresión, desplegando mayormente comportamientos exploratorios.

Tabla 2: Resultados de los protocolos utilizados para evaluar la agresión en *B. gauderio*.

	IIa	IIb	IIc
<i>Conflicto</i>	2/8	8/8	8/8
<i>Resolución del conflicto</i>	1/8	8/8	8/8
<i>Resultado</i>	-	7/8 residente	8/8 residente

Protocolo de compuerta (IIa), protocolo Residente – Intruso (IIb), protocolo Residente – Intruso con hembra presente (IIc).

En contraste, las 16 las díadas enfrentadas bajo los protocolos residente-intruso (n = 8 en protocolo IIb, n = 8 en protocolo IIc, Tabla 2) presentaron comportamiento agresivo en todos los casos, siendo indistinto si estaba la hembra presente (IIc) o ausente (IIb) en el momento de la contienda. En todos los casos se observó resolución del conflicto y el macho residente fue el ganador en 16 de 16 conflictos (Tabla 2). Asimismo, tampoco se encontraron diferencias significativas entre el protocolo IIb y IIc en parámetros de los encuentros agonísticos: latencia al 1^{er} ataque, duración del conflicto, tasa de ataques del macho residente, tasa de ataques del macho intruso (Tabla 3). De estos resultados se concluye que ambos protocolos son adecuados para evaluar agresión en *B. gauderio*.

Tabla 3: Comparación entre los protocolos Residente – Intruso en *B. gauderio*

	Protocolo IIb		Protocolo IIc		p
	Mediana	MAD	Mediana	MAD	
<i>Latencia 1^{er} ataque (s)</i>	458.5	395.5	309	184	0.96
<i>Duración conflicto (s)</i>	681.5	329.5	379	209.5	0.19
<i>Tasa ataques Residente</i>	0.025	0.0059	0.03	0.01898	0.37
<i>Tasa ataques Intruso</i>	0.0033	0.003	9E-5	8.6E-4	0.96

Protocolo Residente – Intruso (IIb) y protocolo Residente – Intruso con hembra presente (IIc). Test Mann-Whitney U. *p < 0.05.

Como se muestra en la Fig. 8, los encuentros agonísticos de *B. gauderio* siguieron las 3 fases estándar: a- pre-conflicto (latencia al 1^{er} ataque = 309 ± 184 s), b- contienda (duración del conflicto = 379 ± 209.5 s), y c- post-resolución. Durante la contienda, se observaron despliegues locomotores de agresión especie-específicos; por ejemplo, ambos contendientes en posición antiparalela intentando morder la cola del otro. Las señales eléctricas sociales observadas durante la contienda y luego de la resolución del conflicto, chirps (en 3 de 8 días) y apagados (en 1 de 8 días), no parecen seguir un patrón temporal predecible. Se registraron varios chirps del tipo M (previamente reportado por Perrone et al. 2009 como el tipo de chirp característico de encuentros entre machos en *B. gauderio*). Los apagados fueron infrecuentes y emitidos por el pez subordinado, mientras que los chirps fueron emitidos tanto por dominantes como por subordinados.

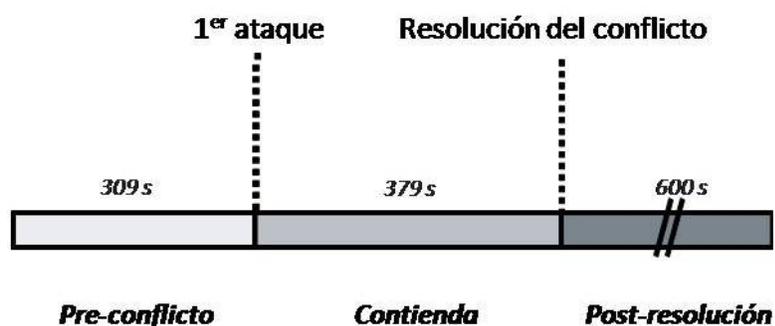


Figura 8: Estructura temporal de encuentros agonísticos en *B. gauderio*. Valores expresados en medianas.

G. omarorum despliega agresión territorial exclusiva en el período no reproductivo

El diseño experimental del protocolo de compuerta utilizado permitió demostrar que el recurso territorio fue suficiente para desencadenar la agresión en *G. omarorum*. De acuerdo con los modelos teóricos adaptados de la teoría de juegos (Maynard Smith & Parker, 1976; Parker & Rubenstein, 1981), la probabilidad de ganar una contienda depende principalmente de la capacidad de lucha y de la motivación del individuo para obtener el recurso en disputa (cuanto mayor es el valor del recurso, mayor la motivación para luchas). En muchas especies, tanto la capacidad de lucha como el valor del recurso son diferentes entre sexos y en diferentes etapas del ciclo reproductivo. Sin embargo, en especies sin dimorfismo sexual en el tamaño, en las cuales la capacidad de lucha entre machos y hembras es comparable, estos modelos predicen que el resultado de las contiendas dependerá del valor que el recurso en disputa tiene para los contendientes. En este sentido, existen ejemplos de especies que en ausencia de asimetría de capacidad de lucha, persiste una asimetría del valor del recurso entre sexos que determina un sesgo en el resultado de las contiendas inter-sexuales (Murie & Harris, 1988; Dunham, 2008). Siguiendo con el mismo razonamiento, cuando no existen asimetrías entre sexos ni en el valor del recurso ni en la habilidad de lucha, el resultado de la contienda debería ser independiente del sexo (Maynard Smith & Parker, 1976; Parker & Rubenstein, 1981). En *G. omarorum*, especie sin dimorfismo sexual, fuera del período reproductivo el valor del territorio como recurso es alto tanto para machos como para hembras por tratarse de una especie con agresión territorial. Como predicen los modelos teóricos, en encuentros diádicos de *G. omarorum* fuera del período reproductivo, la determinación de la dominancia es independiente del sexo de los individuos. El modelo binomial que se utilizó en este estudio indica que solamente el peso fue importante para determinar el ganador de la contienda, siendo las otras asimetrías no significativas para el resultado (Tabla 1). El peso corporal es el indicador más aceptado de fortaleza física, o de capacidad de lucha, por lo tanto era esperable que la asimetría de peso fuera importante para la determinación de la dominancia en *G. omarorum*. Sin embargo, a pesar de estar correlacionada con el peso, la longitud corporal no resultó significativa para predecir el resultado de las contiendas, en contraste a lo reportado para otros gymnotiformes (Triefenbach & Zakon, 2008; Fugère *et al.*, 2011). Podemos concluir que el tipo de agresión desplegada por *G. omarorum*, fuera del período reproductivo es una **agresión exclusivamente territorial**, sin sesgo por sexos.

Integración de despliegues eléctricos y locomotores en la conducta agonística de *G. omarorum*

Las conductas sociales en Gymnotiformes incluyen despliegues eléctricos además de los locomotores (Moller, 1995). En muchos gymnotiformes se han reportado señales eléctricas transitorias durante encuentros agonísticos (Black-Cleworth, 1970; Maler & Ellis, 1987; Dunlap & Larkins-Ford, 2003; Hupé *et al.*, 2008; Triefenbach & Zakon, 2008; Perrone *et al.*, 2009). En particular, en *G. carapo*, los incrementos transitorios de la frecuencia (SIDs) han sido interpretados como despliegues de amenaza, mientras que los apagados como despliegues de sumisión (Black-Cleworth, 1970; Westby, 1975). En esta tesis, se observaron 2 tipos principales de señales eléctricas en encuentros de *G. omarorum*: a) apagados (Fig. 6ab), ya descritos por Black-Cleworth, (1970) y Westby, (1975); y chirps (Fig. 6cd), una señal que no había sido previamente descrita para el género *Gymnotus*. Ambas señales son producidas por los individuos subordinados, sin importar si son machos o hembras o si participan en encuentros intra- o inter-sexuales. Sin embargo la emisión de señales eléctricas de sumisión no es esencial para la resolución del conflicto, ya que a pesar de ser ambas señales de sumisión, no todas las diadas las producen, 6 de 33 diadas no exhibieron ni apagados ni chirps, y sin embargo, los conflictos se resolvieron normalmente.

El panorama integral del perfil temporal de los encuentros agonísticos de *G. omarorum* sólo se comprende al añadir el análisis de los despliegues eléctricos a las fases de evaluación, contienda y post-resolución. Como muestra la Fig. 5, el primer apagado ocurre durante la fase de contienda, mientras que el primer chirp aparece luego de la resolución del conflicto. La primer señal eléctrica es emitida entonces por el pez que resultará subordinado antes de que el pez decida someterse. Luego de la resolución del conflicto, el pez subordinado continúa produciendo apagados más intensamente y de mayor duración, a la vez que añade una señal nueva, probablemente menos ambigua: el chirp (Fig. 7). El pez subordinado parece estar utilizando ambas señales en un patrón temporal determinado, para informar al pez dominante primero su decisión de abandonar la lucha y luego diferentes etapas de sometimiento. En suma, es el pez subordinado el que determina el final del conflicto y lo indica a través de una secuencia de señales locomotoras y eléctricas de ambigüedad decreciente: apagar, retroceder y emitir chirps.

Es interesante reflexionar sobre la necesidad de utilizar 2 señales eléctricas de sumisión diferentes y en diferentes momentos. Es probable que en encuentros agonísticos naturales, en los que el pez subordinado puede huir libremente, el apagado sea una primer señal de sumisión y los chirps nunca ocurran. La emisión de chirps, por lo tanto, podría deberse al confinamiento, donde el pez subordinado al no poder escapar, debe utilizar una señal menos

ambigua para evitar riesgos. Los apagados son ambiguos porque tienen 2 posibles interpretaciones para el contendiente. Por una parte, los apagados hacen a los subordinados menos conspicuos, y por lo tanto más difíciles de ser detectados por el dominante. Sin embargo, en la proximidad, los dominantes aún son capaces de detectar la sombra eléctrica de su rival. Así, los apagados podrían ser interpretados por los dominantes ya sea como una estrategia de ocultamiento eléctrico (Black-Cleworth, 1970), o como un intento de comunicar la intención de no escalar más en la contienda. Las interrupciones prolongadas de la DOE constituyen un riesgo importante, ya que durante ese período los peces son incapaces de electrolocar, por lo que reanudar la descarga es inevitable, y cuando la descarga es reanudada podría ser interpretada por el pez dominante como un desafío. El chirp, en cambio, podría ser una señal “amigable” utilizada en esta especie cuando, por causas reproductivas o en momentos de alta densidad poblacional los peces se ven forzados a estar cerca. El chirp comunica la subordinación y al ser emitido activamente también comunica la presencia del subordinado, por lo que no puede ser interpretado como un ocultamiento.

B. gauderio despliega agresión entre machos ligada a la reproducción en el período reproductivo

Un gran desafío metodológico de esta tesis fue obtener un protocolo experimental que desencadenara de manera confiable agresión en la especie gregaria *B. gauderio*, que determinara el umbral de la motivación de los machos para la agresión, y expusiera el tipo de agresión más probable que esta especie despliega. Entre las diferentes categorías de agresión, la agresión territorial y la agresión entre machos se solapan muchas veces. Por ejemplo, en un protocolo residente – intruso entre machos sexualmente maduros, ¿estos machos pelean por el territorio, por el estatus de dominancia o por ambas cosas? Utilizando el protocolo de compuerta (IIa) confirmamos que la agresión entre machos de *B. gauderio* durante el período reproductivo no es exclusivamente territorial ya que la defensa de recursos territoriales equitativos no fue suficiente para desencadenar agresión. Sin embargo, si se aumenta experimentalmente el valor del recurso a favor del macho residente (protocolos IIb y IIc), se observa conducta agonística en todas las díadas evaluadas (Tabla 2). En todos los protocolos utilizados (IIa, IIb y IIc), el territorio es el recurso en contienda, pero solamente se gatilla la agresión cuando el valor del recurso es experimentalmente aumentado por: residencia, presencia de la hembra y actividad de cortejo in situ (protocolos IIb and IIc).

La siguiente línea de pensamiento llevó a postular que el tipo de agresión más probable entre machos de *B. gauderio* es agresión por competencia ligada a la reproducción: (a) *B. gauderio*

es una especie gregaria, que presenta un sistema de apareamiento poligínico consistente con el tipo lek explosivo (Miranda *et al.*, 2008), por lo que se espera que los machos compitan por buenas ubicaciones dentro de la colonia densamente poblada, para llamar mejor la atención de las hembras y tener más chances de reproducirse (Schuster & Wade, 2003). (b) Al igual que en otros gymnotiformes (Hopkins, 1974; Hagedorn & Heiligenberg, 1985; Zakon *et al.*, 1991; Fugère *et al.*, 2011), *B. gauderio* establece un rango de frecuencia de la DOE, en el que el pez dominante incrementa su frecuencia de descarga luego de la resolución del conflicto (R. Perrone comunicación personal). De esta manera, el pez dominante adquiere una etiqueta eléctrica luego de ganar una contienda, evitando así enfrentamientos posteriores que serían energéticamente costosos. (c) Típicamente, en especies donde ganar una contienda es un indicador de la calidad del macho, y por lo tanto una característica importante a ser seleccionada por una hembra en la audiencia, se espera que la competencia entre machos se vea incrementada en presencia de la hembra y disminuya en su ausencia (Wong & Candolin, 2005). En esta tesis, los encuentros agonísticos en presencia (protocolo IIc) o ausencia (protocolo IIb) de hembra fueron indistinguibles (Tabla 3). La presencia de la hembra en el momento de la contienda no fue necesaria para desencadenar agresión ni tampoco provocó mayor motivación hacia la agresión o un aumento en los niveles de agresión. Por lo tanto, el tipo de agresión presentada en encuentros entre machos de *B. gauderio* no es la competencia directa por la hembra, sino competencia entre machos por un buen lugar dentro del lek. De ahora en adelante se denominará como **agresión por competencia ligada a la reproducción** al tipo de agresión desplegada por machos de *B. gauderio*.

Diferencias entre agresión territorial y agresión por competencia ligada a la reproducción

Si bien la conducta agonística puede diferir entre especies ya sea en estímulos gatilladores, como en despliegues característicos, es posible realizar comparaciones interespecíficas porque las etapas comportamentales por las que progresa, así como su control neuroendócrino son conservados entre especies Fig. 1, (Summers & Winberg, 2006). Tanto *G. omarorum* como *B. gauderio* presentan las mismas fases en sus conflictos, si bien el perfil temporal difiere entre especies. La fase de evaluación y la contienda son más cortas en *G. omarorum* (Fig. 5) que en *B. gauderio* (Fig. 8). Es más, los encuentros agonísticos difieren en sus niveles de agresión entre especies. *G. omarorum* presenta una tasa de ataques más elevada y utiliza despliegues más dañinos (trabada de mandíbula, mordidas) que *B. gauderio*. Estos resultados denotan una mayor predisposición hacia la agresión y una motivación más alta en el tipo de agresión territorial que en la agresión por competencia ligada a la reproducción. En este sentido, el

grado de asociación de estas especies estaría de acuerdo con el tipo de agresión, ya que las especies solitarias son menos propensas a mitigar los conflictos, a prevenir escaladas agresivas y a promover reconciliación que las especies gregarias con necesidad de vivir en una organización social estable (Aureli & de Waal, 2000). Por lo tanto, esperaríamos que el gregario *B. gauderio* participara de contiendas más largas y suaves, y que una vez que el conflicto sea resuelto que los dominantes toleren a los subordinados en su cercanía y los resultados de esta tesis apoyan esta predicción.

Los peces eléctricos han desarrollado un canal de comunicación novedoso, basado en la producción de despliegues especie-específicos que pueden ser modulados en términos de forma de onda, y frecuencia para comunicar diferentes estados fisiológicos, comportamientos y contextos (Bass, 1986; Stoddard, 2006; Gavassa *et al.*, 2011). Los resultados de esta tesis muestran un rol diferente de los despliegues eléctricos en la agresión territorial y la agresión por competencia ligada a la reproducción. Aunque ambas especies producen apagados y chirps durante los encuentros agonísticos estas señales adquieren un patrón temporal inteligible en *G. omarorum* (Fig. 5 y 7) pero no en *B. gauderio* (Fig 8). El rol de los apagados de la DOE como señal de sumisión es evidente, independientemente de la especie. En contraste, los chirps han sido interpretados como señales de amenaza en *Apteronotus leptorhynchus* (Triefenbach & Zakon, 2008), y en esta tesis como señales no-ambiguas de sumisión en *G. omarorum*. Los chirps en encuentros de *B. gauderio* fueron observados raramente, y producidos indistintamente por dominantes y subordinados. En lo que refiere a la diversidad de señales eléctricas de comunicación en Gymnotiformes, es interesante notar que las diferencias en su rol comunicativo no residen en la diversidad de señales sino en el diferente significado que la señal tiene para cada especie.

El rol de los despliegues eléctricos es consistente con el tipo de agresión presentado por *G. omarorum* y *B. gauderio* y coherente con el nivel de socialidad de cada una. Es esperable que una especie solitaria que no interactúa con otros miembros de su misma especie no señalice dominancia, ya que probablemente no exista ningún individuo que pueda actuar como receptor de la señal. Sin embargo, para individuos de especies territoriales es crítico la señalización de sumisión, como sucede con los individuos de *G. omarorum* que pierden las contiendas. Por otro lado, en una especie gregaria y con bajos niveles de agresión, como es el caso de *B. gauderio*, los subordinados no estarían presionados a señalizar sumisión (Matsumura & Hayden, 2006), y probablemente sí señalicen dominancia mediante un rango de frecuencia de la DOE (R. Perrone comunicación personal).

Capítulo 2 Correlación entre actividad serotoninérgica y tipos de agresión

Objetivo general:

Evaluar si existen diferencias en el control serotoninérgico entre dos tipos de agresión evidenciadas en *Gymnotus omarorum* y *Brachyhypopomus gauderio*.

Objetivos específicos:

1- Identificación de los tipos de agresión desplegados por *Gymnotus omarorum* y *Brachyhypopomus gauderio* mediante la caracterización del comportamiento agonístico en ambas especies.

2- Determinación de los niveles tisulares de 5-HT y recambio serotoninérgico en *Gymnotus omarorum* y *Brachyhypopomus gauderio*. Evaluación en dominantes, subordinados y controles. Comparar la actividad del sistema serotoninérgico entre tipos de agresión.

3- Estudiar el efecto de un agonista 5-HT_{1A} en *Gymnotus omarorum* y *Brachyhypopomus gauderio* con el fin de evaluar la modulación farmacológica diferencial entre tipos de agresión.

Resultados

Como se muestra en la Fig. 9A, los machos subordinados de *B. gauderio* presentaron significativamente más 5-HT que los controles (test Kruskal-Wallis, $p = 0.027$), mientras que no se encontraron diferencias significativas entre dominantes y controles (test Kruskal-Wallis, $p = 0.43$) ni entre dominantes y subordinados (test Kruskal-Wallis, $p = 0.25$). En *B. gauderio* la actividad 5-HTérgica (estimada como la relación 5-HIAA/5-HT) no presentó diferencias significativas entre subordinados, dominantes y controles (test Kruskal-Wallis, $p_{\text{dominantes-controles}} = 0.52$; $p_{\text{subordinados-controles}} = 0.83$; $p_{\text{dominantes-subordinados}} = 0.37$, Fig. 9B). A diferencia de *B. gauderio*, luego de la agresión territorial de *G. omarorum* se observó un patrón completamente diferente tanto en niveles de 5-HT como en actividad 5-HTérgica (Fig. 9): los niveles de 5-HT en dominantes y subordinados fueron significativamente más bajos que los controles (test Kruskal-

Wallis, $p_{\text{dominantes-contróles}} = 0.0015$ y $p_{\text{subordinados-contróles}} = 0.002$) pero no se encontraron diferencias entre ellos (test Kruskal-Wallis, $p_{\text{dominantes-subordinados}} = 0.56$). Se encontraron diferencias significativas en la actividad 5-HTérgica entre dominantes y controles (test Kruskal-Wallis, $p_{\text{dominantes-contróles}} = 0.056$) y entre subordinados y controles (test Kruskal-Wallis, $p_{\text{subordinados-contróles}} = 0.009$). No se encontraron diferencias significativas en la relación 5-HIAA/5-HT entre dominantes y subordinados (test Kruskal-Wallis, $p = 0.87$).

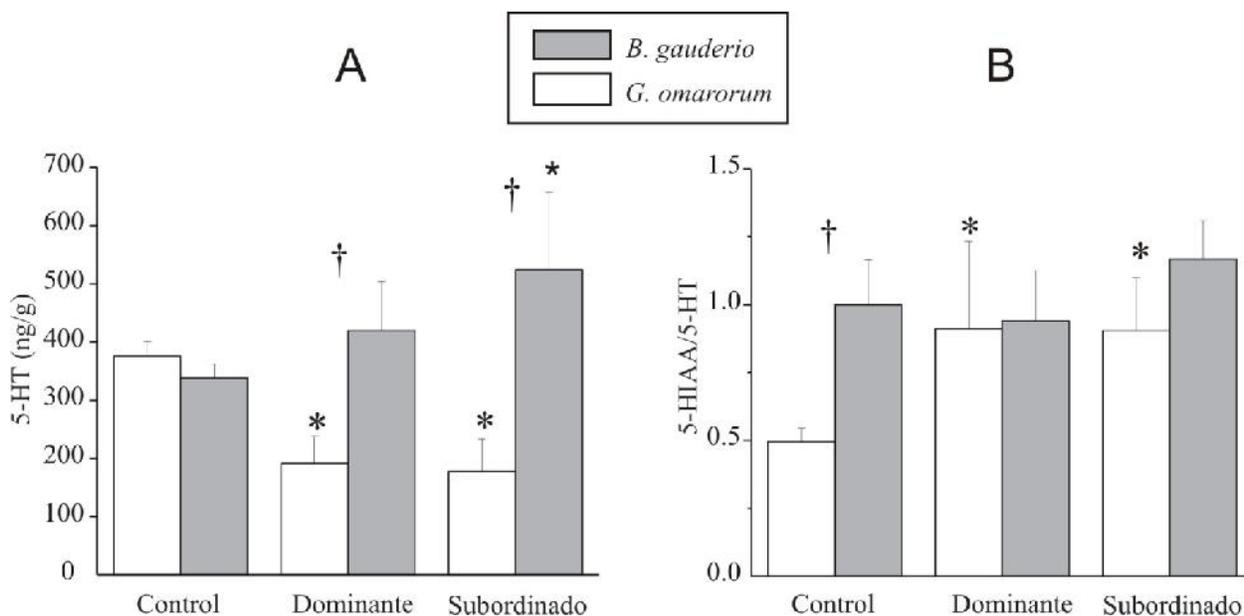


Figura 9: Niveles telencefálicos de 5-HT y actividad serotoninérgica luego de la resolución del conflicto. Niveles de 5-HT (ng/g) y relación 5-HIAA/5-HT ratio (medida de actividad 5-HTérgica) en controles, dominantes y subordinados 1 hora posterior a la resolución del conflicto en *B.gauderio* y *G. omarorum*. *B. gauderio* (protocolo IIc). *G. omarorum* (protocolo I). Análisis de la comparación intraspecífica con test Kruskal-Wallis; * $p < 0.05$ comparación con controles. Análisis de la comparación interespecífica con test Mann-Whitney U; † $p < 0.05$.

Si nos enfocamos en la comparación interespecífica, dominantes y subordinados de *B. gauderio* exhibieron niveles mayores de 5-HT que dominantes y subordinados de *G. omarorum* (test Mann-Whitney U, $p_{\text{dominantes}} = 0.024$ y $p_{\text{subordinados}} = 0.0014$, Fig. 9A). Sin embargo, los niveles basales de 5-HT no fueron diferentes entre especies (test Mann-Whitney U, $p = 0.43$, Fig. 9A). La relación 5-HIAA/5-HT basal (medida en controles) fue mayor en *B. gauderio* que en *G. omarorum* (test Mann-Whitney U, $p = 0.003$, Fig. 9B), mientras que se encontraron diferencias interespecíficas entre dominantes y subordinados (test Mann-Whitney U, $p_{\text{dominantes}} = 0.69$ y $p_{\text{subordinados}} = 0.18$, Fig. 9B).

De acuerdo con la hipótesis de deficiencia de serotonina, los niveles bajos de 5-HT y de la relación 5-HIAA/5-HT (medida convencional de actividad del sistema 5-HTérgico) han sido confirmados en fenotipos altamente agresivos en muchos taxa, incluyendo humanos (Berman *et al.*, 1997; Krakowski, 2003; Summers *et al.*, 2005b; Caramaschi *et al.*, 2008; de Boer *et al.*, 2009). Asimismo, la subordinación social lleva a un incremento en la actividad 5-HTérgica en un amplio rango de especies (Yodyingyuad *et al.*, 1985; Blanchard *et al.*, 1991; Overli *et al.*, 1999; Summers *et al.*, 2005b). Sin embargo, a pesar de la generalización hecha por el dogma de deficiencia de serotonina, es imposible establecer una relación lineal o simple entre comportamientos agresivos y niveles de 5-HT o actividad del sistema 5-HTérgico. Desde una perspectiva evolutiva, hoy entendemos que los efectos de la 5-HT sobre la agresión son dependientes del momento, contexto y del sector del SN (Summers *et al.*, 2005b). Por lo tanto, la comprensión integral del control 5-HTérgico sobre la agresión requiere el entendimiento de los cambios locales de actividad 5-HTérgica en regiones específicas del cerebro, el análisis del perfil temporal de estos cambios y el diseño de protocolos comportamentales minuciosos para limitar las observaciones a despliegues naturales especie-específicos.

Luego de la resolución del conflicto en encuentros agresivos por competencia ligada a la reproducción (*B. gauderio*), se observa un patrón esperado de activación del sistema 5-HTérgico en subordinados el cual se asociaría a la disminución de la agresión en estos individuos (Summers *et al.*, 2003; Summers *et al.*, 2005b; Summers & Winberg, 2006). Aunque no se observan diferencias significativas en la relación 5-HIAA/5-HT, que se interpreta como indicadora de la actividad del sistema serotoninérgico, el aumento de la actividad del sistema se evidencia porque los machos subordinados (pero no los dominantes) exhiben niveles telencefálicos mayores de 5-HT (Fig. 9A) y de 5-HIAA (datos no mostrados) que los machos controles.

La respuesta del sistema 5-HTérgico parece ser diferente en la interacción agresiva exclusivamente territorial (*G. omarorum*) a la respuesta en la agresión por competencia ligada a la reproducción (*B. gauderio*). En primer lugar, se confirmó el involucramiento esperado del sistema 5-HTérgico en el control de la agresión exclusivamente territorial por el aumento significativo de la relación 5-HIAA/5-HT observada en telencéfalos de individuos subordinados de *G. omarorum* luego de la contienda (Fig. 9B). El hecho de que los individuos dominantes también presenten un incremento en la relación 5-HIAA/5-HT (Fig. 9B) no debe ser interpretada como algo inusual, ya que un incremento temprano de la actividad 5-HTérgica en dominantes

ha sido previamente reportado (Overli *et al.*, 1999; Summers *et al.*, 2003, Ver Fig. 1). Es llamativo, sin embargo que los niveles de 5-HT presentados por dominantes y subordinados de *G. omarorum* fueron significativamente menores que los niveles basales (medidos en individuos control que no pelearon, Fig. 9A), lo que revela una respuesta no-canónica del sistema serotoninérgico en esta especie. Es difícil evaluar la relevancia de este hallazgo, ya que no existen reportes previos de niveles basales de 5-HT mayores que los niveles en dominantes y subordinados, y es imposible por lo tanto predecir si constituirá un patrón general de la modulación serotoninérgica de la agresión exclusivamente territorial.

Con la excepción de un estudio comparativo entre 2 especies de macacos (Westergaard *et al.*, 1999), no existen trabajos que comparen la actividad del sistema 5-HTérgico entre especies con diferentes niveles de socialidad o que desplieguen diferentes tipos de agresión. Sin embargo, sí existen intentos de asociar un involucramiento diferencial de la 5-HT con fenotipos dentro de una misma especie. En la lagartija *Anolis carolinensis*, los machos que despliegan mayor potencial agresivo exhiben menor actividad del sistema 5-HTérgico en áreas específicas que los machos no-agresivos (Summers *et al.*, 2005b). Por otro lado, la actividad 5-HTérgica es también diferente entre las líneas de ratones SAL (short attack latency, excesivamente agresivos) y LAL (long attack latency, más dóciles que los SAL). Luego de la adquisición de experiencia ganadora mediante repetidos enfrentamientos en un paradigma residente-intruso, los niveles de 5-HT son menores en la corteza pre-frontal de los SAL que en los LAL (Caramaschi *et al.*, 2008; de Boer *et al.*, 2009). Por último, en la langosta desértica *Schistocerca gregaria*, la 5-HT es responsable de la transición comportamental entre la fase solitaria (caracterizada por aversión hacia co-especímenes) y la fase gregaria (caracterizada por la agregación para formar enjambres) (Anstey *et al.*, 2009).

En esta tesis se encontraron diferencias significativas en la modulación 5-HTérgica entre dos tipos de agresión. Los niveles basales de 5-HT, cuantificados en animales que no se someten a un enfrentamiento agresivo (controles) son similares entre especies (Fig. 9A), lo que permite asumir que las diferencias interespecíficas no residen en la disponibilidad basal de 5-HT. Sin embargo, la actividad basal del sistema es menor en *G. omarorum* que en *B. gauderio*, evidenciado por una menor relación 5-HIAA/5-HT en la especie con agresión territorial (Fig. 9B). Este resultado está de acuerdo con la hipótesis de deficiencia de serotonina, la cual, aplicada a un marco interespecífico predeciría que la especie más agresiva presente menor actividad basal del sistema. Más aún, cuando efectivamente la interacción agresiva tiene lugar, ambos dominantes y subordinados de *G. omarorum* presentan niveles menores de 5-HT que *B. gauderio* (Fig. 9A).

En términos generales, las diferencias reportadas en esta tesis en la modulación 5-HTérgica entre tipos de agresión, en lugar de residir en diferencias interespecíficas de los niveles basales de 5-HT, lo hacen en el perfil dinámico de los cambios de actividad del pre-conflicto al post-conflicto. Los mecanismos que subyacen a estas diferencias podrían estar en aspectos anatómicos de la organización del sistema (por ejemplo número y actividad de receptores, número de proyecciones al telencéfalo), o en diferencias interespecíficas en las enzimas y transportador del sistema 5-HTérgico (TPH, MAOA, y 5-HTT). Es interesante especular que esas posibles diferencias constituyan estrategias neurales distintivas de la organización del sistema 5-HTérgico de acuerdo al tipo de agresión desplegada por la especie. Por ejemplo, en macacos, las especies con relaciones de dominancia laxas y altos niveles de comportamiento conciliatorio muestran diferencias en las secuencias reguladoras tanto de MAOA como de 5-HTT con respecto a especies que presentan fuertes relaciones jerárquicas y sociedades intolerantes (Wendland *et al.*, 2006). Los resultados del trabajo antes mencionado aportan evidencia a que la variación genética a diferentes niveles de la transmisión 5-HTérgica podría afectar el grado de variación interespecífica observada en los comportamientos agresivos (Canli & Lesch, 2007).

Capítulo 3 Modulación farmacológica de los tipos de agresión

Objetivo general:

Evaluar si existen diferencias en el control serotoninérgico entre dos tipos de agresión evidenciadas en *Gymnotus omarorum* y *Brachyhyopomus gauderio*.

Objetivos específicos:

1- Identificación de los tipos de agresión desplegados por *Gymnotus omarorum* y *Brachyhyopomus gauderio* mediante la caracterización del comportamiento agonístico en ambas especies.

2- Determinación de los niveles tisulares de 5-HT y recambio serotoninérgico en *Gymnotus omarorum* y *Brachyhyopomus gauderio*. Evaluación en dominantes, subordinados y controles. Comparar la actividad del sistema serotoninérgico entre tipos de agresión.

3- Estudiar el efecto de un agonista 5-HT_{1A} en *Gymnotus omarorum* y *Brachyhyopomus gauderio* con el fin de evaluar la modulación farmacológica diferencial entre tipos de agresión.

Resultados

El agonista de receptores 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT afectó significativamente la agresión territorial de *G. omarorum*, pero no tuvo efecto sobre la agresión por competencia ligada a la reproducción de *B. gauderio*, evaluada mediante el protocolo IIc (Tabla 4). La administración de 8-OH-DPAT al potencial dominante en *G. omarorum* provocó un cambio en el resultado de la contienda. Luego de la administración del agonista 5-HT_{1A} no fue posible predecir el resultado de la contienda por la diferencia de peso entre contendientes (determinante de la resolución del conflicto, Tabla 1, capítulo 1) (12 de 12 veces ganó el pez más pesado en las diadas control y 5 de 12 en las diadas con administración de 8-OH-DPAT, test X^2 , $p = 0.027$). La administración del 8-OH-DPAT en *G. omarorum* también disminuyó la tasa de ataques del individuo inyectado

en comparación con la tasa de ataques del individuo de mayor tamaño en días controles (Tabla 4). Sin embargo, 8-OH-DPAT no tuvo efecto sobre la latencia al primer ataque, ni la duración del conflicto en *G. omarorum* (Tabla 4). En *B. gauderio*, la administración de 8-OH-DPAT al macho residente no afectó el resultado de la contienda (8 de 8 veces ganó el pez más pesado en días control y 7 de 8 en días con administración de 8-OH-DPAT, test χ^2 , $p = 1$), la tasa de ataques del individuo inyectado, la latencia al primer ataque, y la duración del conflicto (Tabla 4).

Tabla 4: Efectos del agonista de receptores 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT sobre el resultado de la contienda, tasa de ataques del pez inyectado, latencia al 1^{er} ataque y duración del conflicto en ambas especies.

	<i>B. gauderio</i>	p	<i>G. omarorum</i>	p
<i>Resultado de la contienda</i>				
Control	Residente 8/8	1	Grande 11/12	*0.027
8-OH-DPAT	Residente 7/8		Grande 5/12	
<i>Tasa ataques pez inyectado</i>				
Control	0.03 (0.019)	0.75	0.12 (0.055)	*0.03
8-OH-DPAT	0.027 (0.014)		0.045 (0.026)	
<i>Latencia 1^{er} ataque (s)</i>				
Control	309 (184)	0.6	29 (18.5)	0.52
8-OH-DPAT	634 (439.5)		45 (23.5)	
<i>Duración contienda (s)</i>				
Control	379 (209.5)	0.4	136 (71.5)	0.4
8-OH-DPAT	426 (311)		109 (70)	

B. gauderio, protocolo IIc, (n = 8). *G. omarorum*, protocolo I, (n=12). Test Chi-cuadrado para evaluar el efecto de 8-OH-DPAT sobre el resultado de la contienda. Test Mann-Whitney U para evaluar el efecto de 8-OH-DPAT sobre la tasa de ataques del pez inyectado, latencia al 1^{er} ataque y duración del conflicto. * $p < 0.05$.

Cuadro3.1

Efectos de la administración de 8-OH-DPAT sobre la interacción social en *G. omarorum*

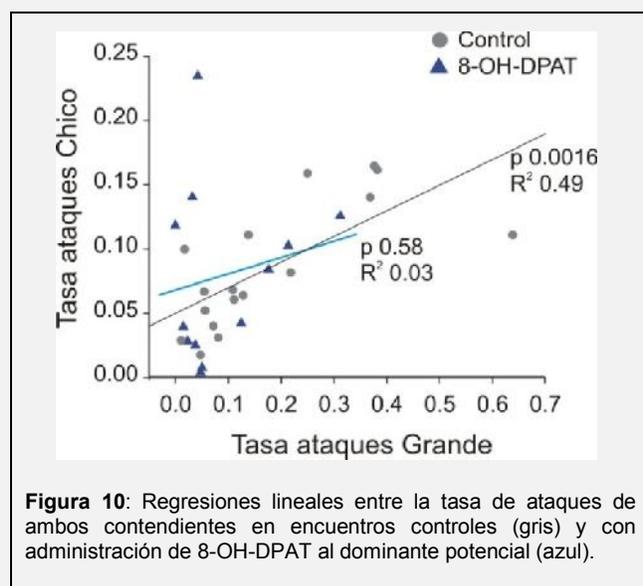
La agresión territorial de *G. omarorum* es un buen modelo para estudiar los mecanismos de evaluación utilizados por los contendientes y la forma en que se toman las decisiones durante un encuentro agonístico. Así como la mayoría de las veces el pez que resulta dominante es el que toma la iniciativa de atacar e iniciar la contienda, también es claro que el pez que resultará subordinado es el que determina su fin. El pez más chico de la díada (que es el que resultará subordinado, ver Tabla 1 Cap. 1A) toma una serie de decisiones en su camino a la sumisión: 1- Dejar de atacar y retroceder; 2- Apagar la descarga; 3- Emitir chirps.

Las decisiones que toma el subordinado son adecuadas para explorar la interacción social como un todo, donde los comportamientos de un individuo repercuten sobre los del otro. En este sentido, es interesante plantear las siguientes preguntas:

a- Estas decisiones en situaciones control, ¿dependen del nivel de agresión o desempeño del pez más grande (el que resultará dominante)?

b- Estas decisiones, ¿se ven afectadas por 8-OH-DPAT que sabemos disminuye los niveles de agresión cuando se lo administra al pez grande de la díada?

Decisión 1- Dejar de atacar y retroceder



La relación entre los ataques del pez grande y los ataques del pez chico en una díada tienen una relación lineal en encuentros control (Fig. 10). Que los niveles de agresión de los contendientes estén positivamente correlacionados en una interacción agresiva escalada (como es el caso de la agresión territorial), es lo esperable. Durante la fase de contienda, en la escalada agresiva, cuanto más ataques recibe un individuo, más responde atacando, hasta que uno de los contendientes abandona la lucha y resulta subordinado.

Cuando se testea la misma relación en díadas con administración de 8-OH-DPAT, se observa una ruptura de la linealidad (Fig. 10), ya que los ataques del pez grande ya no están correlacionados con los ataques del pez chico. En díadas control, el pez grande ataca más que el pez chico, y como consecuencia de esto resulta dominante. En cambio, en las díadas con

modulación farmacológica existe un quiebre de este patrón, probablemente debido a que el pez chico identifica algún hándicap en el grande (inyectado) y responde a la disminución de los ataques con agresión desmesurada, sin importar cuántos ataques recibe.

Decisiones 2 y 3: Apagar la descarga y emitir chirps

Existe una correlación entre el comportamiento agresivo del dominante y los despliegues eléctricos de sumisión emitidos por el subordinado en encuentros control. Cuando los niveles de agresión son mayores, la emisión de chirps es más intensa, pero los apagados son iguales sin importar los niveles de agresión a los que está sometido el pez subordinado (Fig. 11).

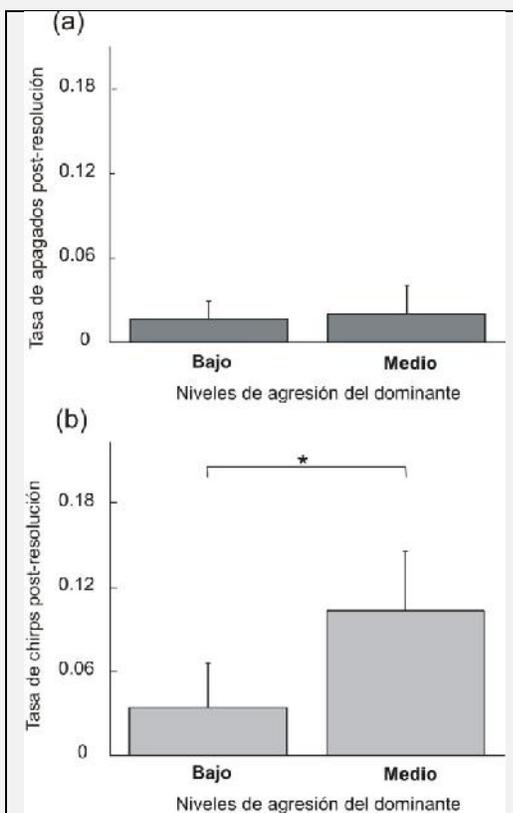


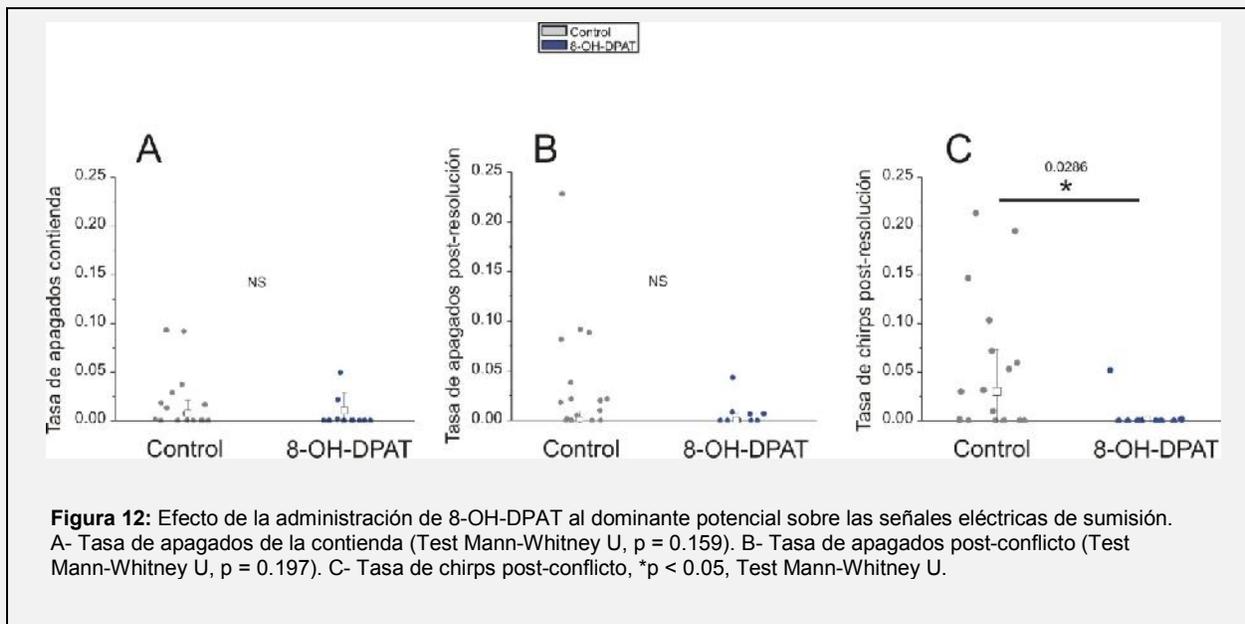
Figura 11: Señales eléctricas de sumisión emitidas por los subordinados en relación a los niveles de agresión de los dominantes. (a) Tasa de apagados post-resolución, (b) tasa de chirps post-resolución, recibiendo niveles bajos y medios de agresión. * $p=0.03$, para frecuencia de chirps post-resolución, test Mann-Whitney U, $N_{\text{Bajo}} = 14$, $N_{\text{Medio}} = 5$. Los valores están expresados como medianas, las barras de error representan el MAD.

Los chirps, en el patrón secuencial de sumisión, se postularon como una señal de comunicación menos ambigua que los apagados. La decisión de apagar, por otro lado respondería a otras claves integradas por el pez que los emite. Es adaptativo para individuos enfrentados a dominantes más agresivos, señalar su estatus de subordinado más intesamente y de una manera no-ambigua, ya que están sometidos a un riesgo de injuria más alta.

Debido a que la señalización de la sumisión juega un rol preponderante en los encuentros agonísticos de esta especie altamente territorial, es importante evaluar si la administración del agonista de receptores 5-HT_{1A} al dominante potencial, afecta las señales de sumisión. En cuanto a los apagados, el 8-OH-DPAT no afecta su tasa de emisión ni durante la contienda ni luego de la resolución del conflicto. En contraste, el efecto del agonista serotoninérgico sobre los chirps es notorio, eliminando casi completamente su producción (Fig 12). Retomando que los chirps se postularon en la discusión del capítulo 1 como una señal de sumisión menos ambigua que los apagados utilizados durante la post-resolución, el efecto del agonista serotoninérgico es interpretado como anulador de la subordinación.

Podríamos preguntarnos: ¿por qué los peces chicos reponden con menos sumisión a un pez grande (inyectado)? La emisión de chirps en díadas control depende de los niveles de agresión a los que se somete el subordinado (Fig 11), y anteriormente también se demostró que la administración de 8-OH-DPAT disminuye los niveles de agresión del pez inyectado (Tabla 4, cap. 3), por lo que es coherente que las díadas moduladas farmacológicamente presenten menos chirps al presentar niveles menores de agresión.

Para profundizar sobre esta afirmación, primero al observar la distribución de los puntos en la regresión lineal de la Fig. 10, se puede concluir que los niveles de agresión de los encuentros con modulación farmacológica están dentro del rango de los niveles presentados por controles. Luego, tomando todas las díadas control con niveles de agresión en el rango de los niveles observados con 8-OH-DPAT, se puede constatar que de 26 díadas control con los mismos niveles de agresión presentados por las díadas con 8-OH-DPAT, 20 emiten chirps. De los puntos anteriores se extrae que la eliminación de los chirps con 8-OH-DPAT no depende solamente de la disminución en los niveles de agresión, sino de un efecto más complejo sobre la interacción social. Probablemente, los efectos de la droga en el pez inyectado hacen que el contendiente más chico lo evalúe como un contendiente cuya capacidad de lucha no condice con su tamaño, y esa evaluación lo lleve a decidir que no es necesario utilizar la señal de sumisión menos ambigua.



Interacciones diádicas reales

La eliminación de una señal de comunicación mostrada en este trabajo es probablemente el ejemplo más claro de un efecto del agonista serotoninérgico 8-OH-DPAT sobre la interacción social y resalta el valor de trabajar en interacciones diádicas reales. El efecto del agonista serotoninérgico en muchos trabajos fue interpretado como anti-agresivo aún en condiciones experimentales particulares donde la interacción agonística no ocurría, o lo que se modificaba no era la agresión *per se* sino las señales de comunicación de amenaza frente a un playback o a un espejo. Pese a la dificultad de estudiar el efecto de un modulador utilizando interacciones reales (por su complejidad y variabilidad), este tipo de abordajes nos brinda la posibilidad de observar un cambio en el comportamiento de un individuo como reflejo de la acción de un modulador sobre el comportamiento del otro individuo de la díada. De esta manera estamos más cerca de entender la regulación de los comportamientos sociales, interacciones donde hay un flujo de información continuo entre miembros de una misma especie y donde las acciones o estados fisiológicos de un individuo repercuten sobre los comportamientos de otros.

Discusión

El rol de los receptores $5HT_{1A}$ en la inhibición de la agresión está ampliamente documentada en vertebrados (Nelson & Trainor, 2007). La administración del agonista 8-OH-DPAT disminuye la agresión (o algún despliegue agonístico) en virtualmente todas las especies en que fue testeado (McMillen *et al.*, 1988; Olivier & Mos, 1992; Sánchez *et al.*, 1993; Bell & Hobson, 1994; De Almeida & Lucion, 1997; Joppa *et al.*, 1997; Sánchez & Meier, 1997; Deckel & Fuqua, 1998;

Miczek *et al.*, 1998; Simon *et al.*, 1998; de Boer *et al.*, 1999; Sperry *et al.*, 2003; de Boer & Koolhaas, 2005; Clotfelter *et al.*, 2007; Allee *et al.*, 2008; Ten Eyck, 2008). Luego de confirmar que existen diferencias interespecíficas en la actividad del sistema 5-HTérgico, me propuse testear posibles diferencias en la modulación de receptores 5-HT_{1A} entre la agresión territorial y la agresión por competencia ligada a la reproducción.

En *G. omarorum*, la administración de 8-OH-DPAT al dominante potencial (pez más pesado) causa una disminución de los niveles de agresión en el pez inyectado (Tabla 4). Aún más, la manipulación farmacológica en *G. omarorum* provoca una distorsión general del encuentro agonístico normal (ver Cuadro 3.1), llegando a revertir en algunos casos el resultado esperado de la contienda (Tabla 4), fenómeno que ha sido asociado a cambios en los niveles de 5-HT en otros vertebrados (Summers *et al.*, 2005a). Los resultados de esta tesis confirman que la inhibición de la agresión previamente reportada en esta especie mediante manipulaciones farmacológicas de los niveles de 5-HT (Capurro *et al.*, 1997), estaría mediada (al menos en parte) por receptores 5HT_{1A}.

La administración de 8-OH-DPAT al dominante potencial (macho residente) en *B. gauderio* no tuvo efecto aparente sobre ningún aspecto de la interacción agonística (Tabla 4), lo que es llamativo dada la amplia y general vinculación de los receptores 5HT_{1A} en el control de la agresión en distintas clases de vertebrados (Joppa *et al.*, 1997; Deckel & Fuqua, 1998; Miczek *et al.*, 1998; Sperry *et al.*, 2003; de Boer & Koolhaas, 2005; Clotfelter *et al.*, 2007; Allee *et al.*, 2008; Ten Eyck, 2008). En esta misma especie, la administración de 8-OH-DPAT provoca una disminución de la amplitud y duración de la forma de onda de la DOE (Allee *et al.*, 2008), señal de comunicación que indica tamaño corporal y estatus endócrino en machos de *B. gauderio* (Gavassa *et al.*, 2011) y que puede ser modulada en diferentes contextos sociales (Curtis & Stoddard, 2003; Stoddard *et al.*, 2006; Gavassa *et al.*, 2011; Gavassa *et al.*, 2012). En esta tesis, el efecto del 8-OH-DPAT sobre la forma de onda de la DOE de los residentes inyectados (muy difícil de medir en animales en libre interacción) no parece afectar el comportamiento agonístico. Este resultado negativo es relevante porque: a- es el primer reporte de que la administración de un agonista de receptores 5HT_{1A} no afecta la agresión en interacciones diádicas reales; y b- hace manifiestas diferencias interespecíficas en la organización de las vías serotoninérgicas involucradas en la modulación de la agresión.

Las diferencias interespecíficas encontradas en la modulación de la agresión por el agonista de receptores 5-HT_{1A} podrían ser atribuidas a: a) diferencias en la densidad pre- y post-sináptica de receptores 5-HT_{1A}; b) diferencias interespecíficas en la sensibilidad de receptores 5-HT_{1A}; c) balance relativo entre diferencias interespecíficas en la actividad 5-HTérgica basal y la dosis fija

de 8-OH-DPAT utilizada; y d) interacción con el ambiente endócrino que puede ser diferente entre especies y tipos de agresión. Está reportado que los efectos del 8-OH-DPAT sobre la agresión difieren entre fenotipos, sexos y contextos endócrinos. Por ejemplo, la línea excesivamente agresiva de ratones SAL muestra mayor sensibilidad en los autoreceptores 5-HT_{1A} que la más dócil LAL, y los efectos del 8-OH-DPAT son más pronunciados en la línea SAL (Caramaschi *et al.*, 2007). Por otra parte, la administración intra-ventricular de 8-OH-DPAT en cobayos no afecta la agresión en hembras pero sí en machos (Joppa *et al.*, 1997). Por último, la habilidad del 8-OH-DPAT para disminuir despliegues de agresión ofensivos es modificada por el escenario hormonal esteroideo en ratones (Simon *et al.*, 1998).

Los resultados de esta tesis indican que la agresión territorial de *G. omarorum* es modulada por la administración del agonista de receptores 5-HT_{1A} en forma diferente que la agresión por competencia ligada a la reproducción de *B. gauderio*. Aún cuando no existen estudios previos diseñados para explorar el rol de la modulación 5-HT_{1A} en diferentes tipos de agresión, los pocos antecedentes que vinculan los receptores 5-HT_{1A} a la modulación de la agresión en animales silvestres en contextos agonísticos realistas, lo hacen con la agresión territorial. Por ejemplo, la administración de 8-OH-DPAT elimina la agresión territorial en machos de *Anolis carolinensis* (Deckel & Fuqua, 1998) y afecta la territorialidad (eliminando las posturas de dominancia y las vocalizaciones) en la rana *Eleutherodactylus coqui* (Ten Eyck, 2008). En este marco, es interesante resaltar que la modulación serotoninérgica de la agresión territorial de *G. omarorum* van en el mismo sentido que los datos previamente reportados (Deckel & Fuqua, 1998; Ten Eyck, 2008). Aún más, es llamativo encontrar que la modulación de receptores 5-HT_{1A} en la agresión por competencia ligada a la reproducción implica una estrategia de activación del sistema serotoninérgico bien diferente con respecto a la agresión territorial y no previamente reportada. Por lo tanto, lo encontrado en esta tesis podría constituir una tendencia general de modulación serotoninérgica distintiva de la agresión territorial.

Los principales resultados de esta tesis permitieron alcanzar los objetivos específicos planteados:

1- Dos especies de Gymnotiformes con diferente nivel de socialidad despliegan distintos tipos de agresión.

1. a- *Gymnotus omarorum*, especie solitaria, durante el período no reproductivo despliega agresión exclusivamente territorial sin sesgo por sexos.

1. b- *Brachyhypopomus gauderio*, especie gregaria, durante el período reproductivo, entre machos despliega agresión por competencia ligada a la reproducción.

1. c- Las características de los encuentros agonísticos, así como las señales de comunicación eléctricas utilizadas, son coherentes con el grado de asociación de las especies. *G. omarorum* presenta un patrón secuencial de señales eléctricas de sumisión, mientras que en *B. gauderio* no existe señalización eléctrica consistente de la sumisión.

2- Se encontraron diferencias en el patrón de actividad del sistema 5-HTérgico dependiendo del tipo de agresión desplegada.

2. a- En diadas de *G. omarorum* (agresión territorial), luego de las contiendas, tanto dominantes como subordinados exhiben menores niveles de 5-HT que los controles, lo que revela una respuesta no convencional del sistema a un encuentro agonístico.

2. b- En diadas de *B. gauderio* (agresión por competencia ligada a la reproducción), luego de las contiendas, los subordinados exhiben mayores niveles de 5-HT que los controles, mientras que los dominantes no se diferencian significativamente, indicando que el sistema de esta especie reponde de la manera convencional a un encuentro agonístico.

2. c- Existen diferencias entre tipos de agresión, tanto en los niveles de 5-HT luego de las contiendas como en la actividad del sistema. La actividad basal 5-HTérgica es menor en *G. omarorum* que en *B. gauderio*, lo que estaría de acuerdo con la hipótesis de deficiencia de 5-HT trasladada a este marco. Sin embargo, no se encontraron diferencias en los niveles basales de 5-HT. Luego de las contiendas, tanto dominantes como subordinados de *B. gauderio* (agresión por competencia ligada a la reproducción) exhiben mayores niveles de 5-HT que *G. omarorum* (agresión territorial). Las diferencias en el patrón de activación del sistema luego de las contiendas, así como las diferencias basales apoyan la idea que el sistema serotoninérgico posee una activación diferencial dependiendo del tipo de agresión.

3- Se encontraron diferencias entre tipos de agresión en la modulación por 8-OH-DPAT (agonista de receptores 5-HT_{1A}).

3. a- 8-OH-DPAT tiene un efecto anti-agresivo en *G. omarorum* (agresión territorial), lo que está de acuerdo con los efectos reportados en otros vertebrados. Es interesante que el agonista 5-HTérgico afecte la interacción social, ya que es posible observar el efecto de la modulación farmacológica tanto en el individuo inyectado como en el contendiente.

3. b- 8-OH-DPAT no tiene efecto en *B. gauderio* (agresión por competencia ligada a la reproducción), lo que constituye un hallazgo novedoso.

3. c- Las diferencias encontradas en la modulación farmacológica indican un funcionamiento u organización diferente del sistema 5-HTérgico en ambas especies.

Estos resultados aportan al objetivo general planteado y abonan a favor de la hipótesis de trabajo que recapitulo a continuación:

Existe una activación diferencial del sistema serotoninérgico distintivo de cada tipo de agresión.

Como estrategia para poner a prueba esta hipótesis, se analizó el involucramiento del sistema 5-HTérgico como principal inhibidor de la agresión (Nelson & Chiavegatto, 2001), en el control diferencial de la agresión territorial y de la agresión por competencia entre machos ligada a la reproducción. Esto se realizó mediante 2 abordajes complementarios: la cuantificación de actividad del sistema 5-HTérgico medida en telencefalo, y la modulación farmacológica de la agresión por un agonista de receptores 5-HT_{1A}. La estrategia experimental utilizada se basa en las ventajas del modelo de estudio: a- dos especies de peces eléctricos con diferente nivel de socialidad; b- un ejemplo claro de 2 tipos de agresión; c- diseños experimentales que permiten discriminar los tipos de agresión; d- el hecho que el tipo de agresión que cada especie despliega es parte del repertorio conductual natural de cada especie. Los datos del capítulo 2 y 3 apoyan la idea de que existe un patrón de activación distintivo del sistema 5-HTérgico en la agresión territorial y la competencia ligada a la reproducción y constituyen el primer estudio que demuestra una participación diferencial del sistema 5-HTérgico en la modulación de 2 tipos de agresión.

Modulación serotoninérgica distintiva según el tipo de agresión

El análisis conductual-farmacológico-neuroquímico desarrollado en esta tesis permitió integrar una visión global del patrón de activación del sistema 5-HTérgico distintivo de cada tipo de agresión analizada. La agresión territorial se caracterizó por una baja actividad basal del sistema y una inercia mayor a la recuperación de los niveles de 5-HT, lo que es consistente con una mayor sensibilidad a la administración del agonista 5-HT_{1A}, que explicaría el claro efecto anti-agresivo obtenido con esta manipulación. En cambio, la agresión por competencia ligada a la reproducción mostró una respuesta dinámica luego de los encuentros donde de los subordinados exhiben niveles mayores de 5-HT que controles (respuesta convencional del sistema a una interacción agonística). Este tipo de agresión también se asocia a una actividad basal del sistema 5-HTérgico mayor que la agresión territorial, lo que podría dar cuenta de la falta de efecto anti-agresivo del agonista 5-HT_{1A}. Como la agresión territorial presenta menor actividad basal del sistema serotoninérgico que la agresión por competencia ligada a la reproducción, es previsible que el efecto farmacológico sea más evidente en la agresión territorial porque el efecto de la adición de un agonista obviamente depende de los niveles basales de 5-HT. Es más, aunque el abordaje farmacológico no permite discriminar el sitio ni tipo de acción del agonista 5-HT_{1A}, estos datos son interpretables como una acción predominantemente postsináptica del agonista 5-HT_{1A}.

Los resultados obtenidos indican una modulación serotoninérgica diferencial entre los dos tipos de agresión estudiados y apoyan la idea de una activación espacio-temporal diferencial entre tipos, pero no dejan de ser un hallazgo puntual. Si bien no existen reportes con el mismo abordaje comparativo, hay algunos estudios previos que alientan a pensar que los patrones observados en esta tesis pudieran representar estrategias distintivas generales entre tipos de agresión en vertebrados. Por ejemplo, tanto en la trucha ártica (*Salvelinus alpinus*) como en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), especies que establecen jerarquías sociales y las mantienen activamente ya que viven en grupos, está reportado que los individuos subordinados exhiben actividad 5-HTérgica elevada, probablemente causada por el continuo estrés social de permanecer junto a los dominantes (Winberg *et al.*, 1992; Winberg & Lepage, 1998; Overli *et al.*, 1999). Por otro lado, en anuros y reptiles, se ha reportado que el agonista 5-HT_{1A} elimina la agresión territorial (Deckel & Fuqua, 1998; Ten Eyck, 2008). Es imperioso promover la evaluación de la hipótesis de esta tesis en otros modelos experimentales, así como hacer extensiva la búsqueda de patrones de activación del sistema 5-HTérgico a otros tipos de agresión, por ejemplo, a la agresión maternal que se ubica en un escenario de regulación neuroendócrina muy particular (Trainor *et al.*, 2009).

Modulación serotoninérgica de la agresión según el nivel de socialidad de las especies

El control serotoninérgico difiere entre la agresión territorial de *G. omarorum* y la agresión por competencia ligada a la reproducción de *B. gauderio*. Asimismo, cuando las diferencias encontradas en el sistema 5-HTérgico se interpretan desde el punto de vista del nivel de socialidad, resultan también coherentes y acordes al contexto ecológico en que vive cada especie. *G. omarorum*, un predador solitario y altamente agresivo, es una especie que debe estar alerta y la baja actividad basal del sistema 5-HTérgico está de acuerdo con una mayor predisposición para la agresión. El patrón observado de niveles de 5-HT luego de las contiendas tiene sentido si pensamos en conflictos que ocurren en el ambiente natural, donde los subordinados que pierden una contienda seguramente abandonen el sitio y no sería adaptativo entonces mantener los niveles de 5-HT innecesariamente elevados, lo que conlleva no sólo una inhibición de la agresión sino también una disminución asociada de la ingesta de alimento (Winberg & Nilsson, 1993). Por otro lado, en *B. gauderio*, especie gregaria organizada en leks, un macho que pierde una contienda, probablemente permanezca cerca del dominante luego de la resolución del conflicto y en este caso mantener los niveles de 5-HT elevados inhibiendo la agresión y el posible reto al dominante podría constituir una estrategia evolutivamente estable para especies gregarias.

El patrón de activación espacio-temporal de la RCS para cada tipo de agresión podría también estar correlacionado con el nivel de socialidad, ya que es intuitivo pensar que no todos los niveles de socialidad (dentro del gradiente solitario-social), presenten todos los tipos de agresión. Así, el grado de asociación de una especie podría determinar que la RCS responda de una manera determinada a un estímulo y en algunos casos desencadene agresión y en otros no. La hipótesis de que el patrón de activación de la RCS reflejará no sólo el tipo de agresión, sino también el grado de asociación podría ser testeada con un modelo donde se pueda separar la socialidad del tipo de agresión: por ejemplo, una especie que despliegue 2 tipos de agresión diferentes dependiendo del contexto. Habría que tener especial cuidado con la búsqueda de este tipo de modelos, ya que hay especies donde el grado de asociación de los individuos varía dependiendo de la época del año, o de las condiciones ambientales y fisiológicas de los individuos.

Los resultados de esta tesis sugieren la hipótesis de que el control serotoninérgico de diferentes tipos de agresión es dependiente de un patrón diferencial de activación espacio-temporal de los nodos que componen la RCS, aunque más trabajos son necesarios para su completa validación. En este sentido, surgen las siguientes perspectivas generales:

1- Evaluar la generalidad de los patrones espacio-temporales de activación de la RCS (extendiéndola no sólo al sistema serotoninérgico sino a otros mediadores, como el AVT y hormonas esteroides) en la modulación de diferentes tipos de agresión. Para esto es necesario realizar un estudio comparativo de muchas especies, y de distintos tipos de agresión. La compleja pero causal relación entre niveles de socialidad y tipos de agresión impide interpretar inequívocamente si las características distintivas del patrón espacio-temporal de activación de la RCS que se identifique refleja el tipo de agresión, el nivel de socialidad de la especie o la interacción entre ambas. Para esto es esencial la búsqueda de modelos experimentales ventajosos que permitan separar las dos condiciones, como por ejemplo una especie que despliegue 2 tipos de agresión dependiendo del contexto (ver más abajo).

2- Explorar las bases celulares y sub-celulares subyacentes a los patrones de activación del sistema 5-HTérgico en la modulación de diferentes tipos de agresión. En este sentido hay muchos aspectos que se podrían explorar utilizando diferentes abordajes. Por mencionar algunos, se podrían analizar diferencias en aspectos anatómicos de la organización del sistema 5-HTérgico (por ejemplo número de receptores 5-HT_{1A}, número de proyecciones a los nodos de la RCS). Asimismo, se podría explorar la existencia de polimorfismos en regiones reguladoras tanto de la MAOA como del 5-HTT, que es sabido repercuten en el grado de expresión de estas enzimas; o cuantificar diferencias en la cantidad de transcriptos entre tipos de agresión. Otro abordaje podría apuntar a estudiar con más detalle las variaciones temporales de la actividad del sistema 5-HTérgico asociado a diferentes tipos de agresión, y de ser posible cuantificar esta actividad en áreas acotadas. Para esto sería interesante implementar la técnica de microdiálisis durante una interacción agonística, o lograr la disección más precisa de regiones del SN.

En otro orden, sería interesante aprovechar las ventajas del modelo de agresión territorial de *Gymnotus omarorum*, único ejemplo de agresión exclusivamente territorial no reproductiva en

teleósteos. A la luz de los resultados obtenidos en esta tesis, se abren al menos dos posibilidades interesantes:

a- *Gymnotus omarorum* despliega agresión territorial fuera del período reproductivo, y durante los encuentros agonísticos evaluados no existe sesgo por sexo en la determinación de la dominancia. Es esperable que durante el período reproductivo la agresión desplegada por machos y hembras de esta especie cambie, producto de la motivación para la reproducción y las hormonas gonadales. En este sentido, la comparación de la agresión dentro y fuera del período reproductivo es ventajosa, convirtiendo a *G. omarorum* en un buen candidato para estudiar diferentes tipos de agresión desplegados por una misma especie.

b- La presencia de agresión territorial fuera del período reproductivo en *G. omarorum* hace pensar en sus mecanismos de control. Las hormonas esteroides (andrógenos y estrógenos) actúan como factores “permisivos” de la conducta agresiva dependiendo del contexto, actuando a través de otros sistemas, como el 5-HTérgico y el AVTérgico. Está bien fundamentado que la testosterona está involucrada en el control de la agresión territorial en contexto reproductivo en todas las clases de vertebrados (Wingfield, 2005). En este marco, es interesante estudiar una especie que presenta agresión fuera del período reproductivo, momento en que las gónadas regresadas sintetizan niveles muy bajos de esteroides. *Gymnotus omarorum* es el único ejemplo conocido en teleósteos que presenta agresión territorial no reproductiva comprobada en díadas intra e intersexuales por lo que constituye un modelo excepcionalmente ventajoso para el estudio de la agresión territorial no reproductiva. A partir del estudio de la agresión territorial en *G. omarorum* y del conocimiento del rol de los esteroides gonadales en la regulación de la agresión, es pertinente plantearse una serie de preguntas: ¿Son necesarias las hormonas esteroides gonadales para la agresión territorial no reproductiva? ¿Hay un rol de hormonas esteroides extragonadales (como neuroesteroides) en el control de la agresión territorial no reproductiva? ¿Cuál es la estirpe de la hormona esteroidea extragonadal involucrada en el control de la agresión territorial no reproductiva? ¿Cuál es el nivel de hormonas esteroides en plasma y cerebro en poblaciones naturales? ¿Están esos niveles asociados con el valor o tamaño del territorio individual?

Contribuciones

Artículos publicados y en preparación

1- La caracterización de la conducta agonística de *G. omarorum*, parte de la cual se presenta en esta tesis:

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.

2- La modulación serotoninérgica diferencial en dos tipos de agresión componen un segundo manuscrito Aceptado en *Frontiers in Behavioral Neuroscience*:

Differential serotonergic modulation of two types of aggression in weakly electric fish.

Zubizarreta L, Perrone R, Stoddard PK, Costa G, Silva AC

3- La integración de la modulación serotoninérgica y AVTérgica en dos tipos de agresión componen una propuesta de artículo de revisión enviada a los editores del número especial del *Journal of Experimental Biology* sobre peces eléctricos que se publicará con motivo de la reunión científica “Electric fishes: neural systems, behavior and evolution” a celebrarse en agosto 2012 en la Universidad de Maryland, USA.

Neuromodulation of the agonistic behavior in two species of weakly electric fish that display different types of aggression.

Silva A, Perrone R, **Zubizarreta L**; Batista G, Stoddard P

Posters presentados en congresos

Zubizarreta L; Stoddard P; Costa G; Silva A

Serotonin agonist modulates aggression in a solitary species of electric fish but not in a gregarious one, 2011

Society for Neuroscience annual meeting, Washington DC

Zubizarreta L.; Perrone R; Silva A

Conducta agonística y estrategia de evaluación en una especie gregaria de pez eléctrico, 2011

Terceras Jornadas Uruguayas de Comportamiento Animal, Montevideo

Zubizarreta L.; Stoddard P; Costa G; Silva A

Serotonin agonist modulates aggression in a solitary species of electric fish but not in a gregarious one, 2011

Gordon Research Conference. Neuroethology, Easton. Massachusetts

Este trabajo obtuvo el premio a mejor presentación de poster.

Zubizarreta L.; Costa G; Silva A

Diferencias interespecíficas de la conducta agonística y su modulación serotoninérgica, 2010
XII Jornadas Uruguayas de Biociencias, Piriápolis

Zubizarreta L.; Costa G; Silva A

Interspecific differences in agonistic behavior and its serotonergic modulation, 2010
9th International Congress of Neuroethology, Salamanca, España

Zubizarreta L.; Costa G; Quintana L; Silva A

Modulación serotoninérgica de la agresión en peces eléctricos: resultados preliminares, 2009
II Jornadas Uruguayas de Comportamiento Animal, Montevideo

Desarrollos experimentales y técnicos

El capítulo 1 de esta tesis constituye una plataforma necesaria para futuros estudios sobre la modulación de la conducta agonística en estas 2 especies y contribuye al desarrollo de un modelo ventajoso para estudiar las bases neurales de comportamientos sociales (en este caso de la conducta agonística). Un desafío importante fue el de lograr un protocolo confiable para estudiar agresión en la especie gregaria *B. gauderio*, la cual tiene la conducta reproductiva de cortejo también caracterizada. Asimismo, el desarrollo de un modelo de agresión exclusivamente territorial fuera del período reproductivo es ventajoso para el estudio de la agresión pura, sin influencia de hormonas sexuales gonadales.

Como desarrollo técnico aporté a la incorporación de la técnica de HPLC en la Unidad Bases Neurales de la Conducta. La colaboración con el Departamento de Neuroquímica comenzó como una pasantía orientada por Gustavo Costa, y permitió la cuantificación de 5-HT y 5-HIAA mostrada en esta tesis. Asimismo, dicha colaboración fue fortalecida por el apoyo económico

del proyecto FCE2009_2472, del que soy responsable y motivó la publicación de un artículo conjunto que se encuentra aceptado para su publicación en *Frontiers in Behavioral Neuroscience*.

El diseño experimental de la modulación farmacológica de *B. gauderio* se desarrolló durante una pasantía en el laboratorio dirigido por el Dr. Philip Stoddard, en Florida International University, Miami. Esta pasantía contó con el apoyo económico de PEDECIBA.

Referencias

- Allee SJ, Markham MR, Salazar VL & Stoddard PK (2008) Opposing actions of 5HT_{1A} and 5HT₂-like serotonin receptors on modulations of the electric signal waveform in the electric fish *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. *Horm Behav* **53**, 481-488.
- Anstey ML, Rogers SM, Ott SR, Burrows M & Simpson SJ (2009) Serotonin mediates behavioral gregarization underlying swarm formation in desert locusts. *Science* **323**, 627-630.
- Aureli F & de Waal FBM (2000) Why natural conflict resolution? In *Natural Conflict Resolution*, pp. 3-10. Berkeley, California: University of California Press.
- Bass AH (1986) Electric organs revisited: evolution of a vertebrate communication and orientation system. In *Electroreception* [TH Bullock and W Heiligenberg, editors]. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley & Sons, Inc
- 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.
- Bell R & Hobson H (1994) 5-HT_{1A} receptor influences on rodent social and agonistic behavior: A review and empirical study. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **18**, 325-338.
- Berman ME, Tracy JI & Coccaro EF (1997) The serotonin hypothesis of aggression revisited. *Clinical Psychology Review* **17**, 651-665.
- Black-Cleworth P (1970) The role of electrical discharges in the non-reproductive social behaviour of *Gymnotus carapo*. *Animal Behaviour Monographs* **3**, 1-77.
- Blanchard DC, Cholvanich P, Blanchard RJ, Clow DW, Hammer Jr RP, Rowlett JK & Bardo MT (1991) Serotonin, but not dopamine, metabolites are increased in selected brain regions of subordinate male rats in a colony environment. *Brain Research* **568**, 61-66.
- Blumstein DT, Ebensperger LA, Hayes LD, Vasquez RA, Ahern TH, Burger JR, Dolezal AG, Dosmann A, Gonzalez-Mariscal G, Harris BN, Herrera EA, Lacey EA, Mateo J, McGraw LA, Olazabal D, Ramenofsky M, Rubenstein DR, Sakhal SA, Saltzman W, Sainz-Borgo C, Soto-Gamboa M, Stewart ML, Wey TW, Wingfield JC & Young LJ (2010) Toward an integrative understanding of social behavior: new models and new opportunities. *Front Behav Neurosci* **4**, 34.
- Brain P (1979) Hormones, drugs and aggression. *Annual Research Review* **3**, 1-38.
- Bruce LL & Neary TJ (1995) The Limbic System of Tetrapods: A Comparative Analysis of Cortical and Amygdalar Populations. *Brain, Behavior and Evolution* **46**, 224-234.
- Canli T & Lesch KP (2007) Long story short: the serotonin transporter in emotion regulation and social cognition. *Nat Neurosci* **10**, 1103-1109.
- Capurro A, Reyes-Parada M, Olazabal D, Perrone R, Silveira R & Macadar O (1997) Aggressive behavior and jamming avoidance response in the weakly electric fish *Gymnotus carapo*: Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **118**, 831-840.
- Caputi AA, Silva AC & Macadar O (1998) The Electric Organ Discharge of *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. *Brain Behavior and Evolution* **52**, 148-158.
- Caramaschi D, de Boer SF, de Vries H & Koolhaas JM (2008) Development of violence in mice through repeated victory along with changes in prefrontal cortex neurochemistry. *Behav Brain Res* **189**, 263-272.
- Caramaschi D, de Boer SF & Koolhaas JM (2007) Differential role of the 5-HT_{1A} receptor in aggressive and non-aggressive mice: an across-strain comparison. *Physiol Behav* **90**, 590-601.

- Clotfelter ED, O'Hare EP, McNitt MM, Carpenter RE & Summers CH (2007) Serotonin decreases aggression via 5-HT_{1A} receptors in the fighting fish *Betta splendens*. *Pharmacol Biochem Behav* **87**, 222-231.
- Curtis CC & Stoddard PK (2003) Mate preference in female electric fish, *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. *Animal Behaviour* **66**, 329-336.
- De Almeida RMM & Lucion AB (1997) 8-OH-DPAT in the median raphe, dorsal periaqueductal gray and corticomedial amygdala nucleus decreases, but in the medial septal area it can increase maternal aggressive behavior in rats. *Psychopharmacology* **134**, 392-400.
- de Boer SF, Caramaschi D, Natarajan D & Koolhaas JM (2009) The vicious cycle towards violence: focus on the negative feedback mechanisms of brain serotonin neurotransmission. *Front Behav Neurosci* **3**, 52.
- de Boer SF & Koolhaas JM (2005) 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor agonists and aggression: a pharmacological challenge of the serotonin deficiency hypothesis. *Eur J Pharmacol* **526**, 125-139.
- de Boer SF, Lesourd M, Mocaer E & Koolhaas JM (1999) Selective Antiaggressive Effects of Alnespirone in Resident-Intruder Test Are Mediated via 5-Hydroxytryptamine_{1A} Receptors: A Comparative Pharmacological Study with 8-Hydroxy-2-Dipropylaminotetralin, Ipsapirone, Buspirone, Eltoprazine, and WAY-100635. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **288**, 1125-1133.
- Deckel AW & Fuqua L (1998) Effects of serotonergic drugs on lateralized aggression and aggressive displays in *Anolis carolinensis*. *Behavioural Brain Research* **95**, 227-232.
- Deckel AW & Jevitts E (1997) Left vs. right-hemisphere regulation of aggressive behaviors in *Anolis carolinensis*: Effects of eye-patching and fluoxetine administration. *Journal of Experimental Zoology* **278**, 9-21.
- Dunham A (2008) Battle of the sexes: cost asymmetry explains female dominance in lemurs. *Animal Behaviour* **76**, 1435-1439.
- Dunlap KD & Larkins-Ford J (2003) Diversity in the structure of electrocommunication signals within a genus of electric fish, *Apteronotus*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* **189**, 153-161.
- Echteler S & Saidel W (1981) Forebrain connections in the goldfish support telencephalic homologies with land vertebrates. *Science* **212**, 683-685.
- Fachinelli C, Sargo S, Bataller R & Rodríguez Echandía EL (1989) Effect of 5-HTP and ketanserin on the aggressive reaction induced by food competition in dominant and submissive pigeons (*Columba livia*). *Behavioural Brain Research* **35**, 265-270.
- Ferrari PF, van Erp AM, Tornatzky W & Miczek KA (2003) Accumbal dopamine and serotonin in anticipation of the next aggressive episode in rats. *Eur J Neurosci* **17**, 371-378.
- Ferris CF, Melloni RH, Jr., Koppel G, Perry KW, Fuller RW & Delville Y (1997) Vasopressin/serotonin interactions in the anterior hypothalamus control aggressive behavior in golden hamsters. *J Neurosci* **17**, 4331-4340.
- Fugère V, Ortega H & Krahe R (2011) Electrical signalling of dominance in a wild population of electric fish. *Biology Letters* **7**, 197-200.
- Gavassa S, Silva AC, Gonzalez E & Stoddard PK (2012) Signal modulation as a mechanism for handicap disposal *Animal Behaviour* **83**.
- Gavassa S, Silva AC & Stoddard PK (2011) Tight hormonal phenotypic integration ensures honesty of the electric signal of male and female *Brachyhypopomus gauderio*. *Hormones and Behavior* **60**, 420-426.
- Giora J & Malabarba LR (2009) *Brachyhypopomus gauderio*, new species, a new example of underestimated species diversity of electric fishes in the southern South America (Gymnotiformes: Hypopomidae). *Zootaxa* **2093**, 60-68.

- Goodson JL (2005) *The vertebrate social behavior network: evolutionary themes and variations*. *Horm Behav* **48**, 11-22.
- Goodson JL & Kabelik D (2009) *Dynamic limbic networks and social diversity in vertebrates: From neural context to neuromodulatory patterning*. *Frontiers in Neuroendocrinology* **30**, 429-441.
- Goodson JL & Kingsbury MA (2011) *Nonapeptides and the evolution of social group sizes in birds*. *Frontiers in Neuroanatomy* **5**, 1-12.
- Goodson JL & Wang Y (2006) *Valence-sensitive neurons exhibit divergent functional profiles in gregarious and asocial species*. *PNAS* **103**, 17013-17017.
- Hagedorn M & Heiligenberg W (1985) *Court and spark: electric signals in the courtship and mating of gymnotoid fish*. *Animal Behaviour* **33**, 254-265.
- Hopkins CD (1974) *Electric Communication in the Reproductive Behavior of Sternopygus macrurus (Gymnotoidei)*. *Zeitschrift für Tierpsychologie* **35**, 518-535.
- Hopkins CD (1991) *Hypopomus pinnicaudatus (Hypopomidae), a New Species of Gymnotiform Fish from French Guiana*. *Copeia* **1**, 151-161.
- Hopkins CD, Comfort NC, Bastian J & Bass AH (1990) *Functional analysis of sexual dimorphism in an electric fish, Hypopomus pinnicaudatus, order Gymnotiformes*. *Brain Behav Evol* **35**, 350-367.
- Hupé GJ, Lewis JE & Benda J (2008) *The effect of difference frequency on electrocommunication: chirp production and encoding in a species of weakly electric fish, Apterionotus leptorhynchus*. *Journal of Physiology, Paris* **102**, 164-172.
- Johnston SA, L M & B T (1990) *The distribution of serotonin in the brain of Apterionotus leptorhynchus: an immunohistochemical study*. *J Chem Neuroanat* **3**, 429-465.
- Joppa MA, Rowe RK & Meisel RL (1997) *Effects of Serotonin 1A or 1B Receptor Agonists on Social Aggression in Male and Female Syrian Hamsters*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **58**, 349-353.
- King JA (1973) *The Ecology of Aggressive Behavior*. *Annual Review of Ecology and Systematics* **4**, 117-138
- Krakowski M (2003) *Violence and Serotonin: Influence of Impulse Control, Affect Regulation, and Social Functioning*. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* **15**, 294-305.
- Kriegebaum C, Gutknecht L, Schmitt A, Lesch KP & Reif A (2010) *Serotonin now: Part 1. Neurobiology and developmental genetics*. *Fortschr Neurol Psychiatr* **78**, 319-331.
- Larson ET & Summers CH (2001) *Serotonin reverses dominant social status*. *Behav Brain Res* **121**, 95-102.
- Lee P (1994) *Social Structure and Evolution*. In *Behaviour and Evolution* [PJB Slater and TR Halliday, editors]. New York: Cambridge.
- Lorenz K (1963) *On aggression*. New York: Harcourt, Brace and World.
- Maler L & Ellis WG (1987) *Inter-male aggressive signals in weakly electric fish are modulated by monoamines*. *Behav Brain Res* **25**, 75-81.
- Markham MR & Stoddard PK (2005) *Adrenocorticotrophic hormone enhances the masculinity of an electric communication signal by modulating the waveform and timing of action potentials within individual cells*. *J Neurosci* **25**, 8746-8754.
- Matsumura S & Hayden TJ (2006) *When should signals of submission be given? A game theory model*. *Journal Theoretical Biology* **240**, 425-433.
- Maynard Smith J & Parker GA (1976) *The logic of asymmetric contests*. *Animal Behaviour* **24**, 159-175.
- McMillen BA, Davanzo EA, Scott SM & Song AH (1988) *N-alkyl-substituted aryl-piperazine drugs: Relationship between affinity for serotonin receptors and inhibition of aggression*. *Drug Development Research* **12**, 53-62.
- Miczek KA, Hussain S & Faccidomo S (1998) *Alcohol-heightened aggression in mice: attenuation by 5-HT1A receptor agonists*. *Psychopharmacology* **139**, 160-168.
- Miranda M (2007) *Indirect evidence for a polygynous breeding system in the gymnotiform electric fish Brachyhypopomus pinnicaudatus in Uruguay*, Florida International University.

- Miranda M, Silva A & Stoddard P (2008) Use of space as an indicator of social behavior and breeding systems in the gymnotiform electric fish & Brachyhyppopomus pinnicaudatus&. *Environmental Biology of Fishes* **83**, 379-389.
- Moller P (1995) *Electric fishes: history and behavior*. London: Chapman & Hall.
- Moyer KE (1968) Kinds of aggression and their physiological basis. *Communications in Behavioral Biology* **2**, 65-87.
- Murie JO & Harris MA (1988) Social interactions and dominance relationships between female and male Columbian ground squirrels. *Can. J. of Zool* **66**, 1414-1420.
- Nelson RJ (2006) *Biology of aggression*: Oxford University Press.
- Nelson RJ & Chiavegatto S (2001) Molecular basis of aggression. *Trends in Neurosciences* **24**, 713-719.
- Nelson RJ & Trainor BC (2007) Neural mechanisms of aggression. *Nature Reviews Neuroscience* **8**, 536-546.
- Newman SW (1999) The Medial Extended Amygdala in Male Reproductive Behavior A Node in the Mammalian Social Behavior Network. *Annals of the New York Academy of Sciences* **877**, 242-257.
- O'Connell LA & Hofmann HA (2011) The vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: a comparative synthesis. *The Journal of Comparative Neurology* **519**, 3599-3639.
- O'Connell LA & Hofmann HA (2012) Evolution of a Vertebrate Social Decision-Making Network. *Science* **336** 1154-1157.
- Olivier B & Mos J (1992) Rodent models of aggressive behavior and serotonergic drugs. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **16**, 847-870.
- Overli O, Harris CA & 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.
- Parker GA & Rubenstein DI (1981) Role assessment, reserve strategy, and acquisition of information in asymmetric animal conflicts. *Animal Behaviour* **29** 221-240.
- Perreault HAN, Semsar K & Godwin J (2003) Fluoxetine treatment decreases territorial aggression in a coral reef fish. *Physiology & Behavior* **79**, 719-724.
- Perrone R, Macadar O & Silva A (2009) Social electric signals in freely moving dyads of *Brachyhyppopomus pinnicaudatus*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* **195**, 501-514.
- Quintana L (2010) Dimorfismo sexual y plasticidad estacional de un núcleo central que controla la producción de señales sociales, PEDECIBA, Universidad de la República.
- Reist C, Nakamura K, Sagart E, Sokolski KN & Fujimoto KA (2003) Impulsive aggressive behavior: open-label treatment with citalopram. *J Clin Psychiatry* **64**, 81-85.
- Richer-de-Forges MM, Crampton WGR & Albert JS (2009) A New Species of *Gymnotus* (*Gymnotiformes*, *Gymnotidae*) from Uruguay: Description of a Model Species in Neurophysiological Research. *Copeia* **2009**, 538-544.
- Sánchez C, Arnt J, Hyttel J & Moltzen E (1993) The role of serotonergic mechanisms in inhibition of isolation-induced aggression in male mice. *Psychopharmacology* **110**, 53-59.
- Sánchez C & Meier E (1997) Behavioral profiles of SSRIs in animal models of depression, anxiety and aggression. *Psychopharmacology* **129**, 197-205.
- Schuster SM & Wade MJ (2003) *Mating systems and strategies*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press
- Silva A, Perrone R & Macadar O (2007) Environmental, seasonal, and social modulations of basal activity in a weakly electric fish. *Physiol Behav* **90**, 525-536.
- Silva A, Quintana L, Galeano M & Errandonea P (2003) Biogeography and Breeding in *Gymnotiformes* from Uruguay. *Environmental Biology of Fishes* **66**, 329-338.

- Silva A, Quintana L, Galeano M, Errandonea P & Macadar O (1999) Water temperature sensitivity of EOD waveform in *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* **185**, 187-197.
- Silva A, Quintana L, Perrone R & Sierra F (2008) Sexual and seasonal plasticity in the emission of social electric signals. Behavioral approach and neural bases. *Journal of Physiology-Paris* **102**, 272-278.
- Simon NG, Cologer-Clifford A, Lu S-f, McKenna SE & Hu S (1998) Testosterone and its metabolites modulate 5HT1A and 5HT1B agonist effects on intermale aggression. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **23**, 325-336.
- Sperry TS, Thompson CK & Wingfield JC (2003) Effects of acute treatment with 8-OH-DPAT and fluoxetine on aggressive behaviour in male song sparrows (*Melospiza melodia morphna*). *J Neuroendocrinol* **15**, 150-160.
- Stoddard PK, Markham MR & Salazar VL (2003) Serotonin modulates the electric waveform of the gymnotiform electric fish *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. *J Exp Biol* **206**, 1353-1362.
- Stoddard PK, Zakon HH, Markham MR & McAnelly L (2006) Regulation and modulation of electric waveforms in gymnotiform electric fish. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* **192**, 613-624.
- Stoddard PK, pp 623-646. , eds. , Inc., (2006) Plasticity of the electric organ discharge waveform: contexts, mechanisms, and implications for electrocommunication. In *Communication in Fishes* [F Ladich, SP Collin, P Moller and BG Kapoor, editors]. Enfield, NH, USA Science Publisher.
- Summers CH, Forster GL, Korzan WJ, Watt MJ, Larson ET, Øverli Ø, Höglund E, Ronan PJ, Summers TR, Renner KJ & Greenberg N (2005a) Dynamics and mechanics of social rank reversal. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* **191**, 241-252.
- Summers CH & Greenberg N (1995) Activation of central biogenic amines following aggressive interaction in male lizards, *Anolis carolinensis*. *Brain Behav Evol* **45**, 339-349.
- Summers CH, Korzan WJ, Lukkes JL, Watt MJ, Forster GL, Overli O, Hoglund E, Larson ET, Ronan PJ, Matter JM, Summers TR, Renner KJ & Greenberg N (2005b) Does serotonin influence aggression? comparing regional activity before and during social interaction. *Physiol Biochem Zool* **78**, 679-694.
- Summers CH, Summers TR, Moore MC, Korzan WJ, Woodley SK, Ronan PJ, Hoglund E, Watt MJ & Greenberg N (2003) Temporal patterns of limbic monoamine and plasma corticosterone response during social stress. *Neuroscience* **116**, 553-563.
- Summers CH & Winberg S (2006) Interactions between the neural regulation of stress and aggression. *J Exp Biol* **209**, 4581-4589.
- Telgkamp P, Combs N & Smith GT (2007) Serotonin in a diencephalic nucleus controlling communication in an electric fish: sexual dimorphism and relationship to indicators of dominance. *Dev Neurobiol* **67**, 339-354.
- Ten Eyck GR (2008) Serotonin modulates vocalizations and territorial behavior in an amphibian. *Behav Brain Res* **193**, 144-147.
- Tinbergen N (1953) *Social behaviour in animals: with special reference to vertebrates*. Oxford, England:: Wiley.
- Trainor BC, Sisk CL & Nelson RJ (2009) Hormones and the Development and Expression of Aggressive Behavior. In *Hormones, Brain and Behavior*, pp. 167-203 [DW Pfaff, AP Arnold, AM Etgen, SE Fahrbach and RT Rubin, editors]. San Diego: Academic Press: San Diego: Academic Press.
- Triefenbach F & Zakon H (2008) Changes in signalling during agonistic interactions between male weakly electric knifefish, *Apteronotus leptorhynchus*. *Animal Behaviour* **75**, 1263-1272.
- van Erp AM & Miczek KA (2000) Aggressive behavior, increased accumbal dopamine, and decreased cortical serotonin in rats. *J Neurosci* **20**, 9320-9325.

- Wendland JR, Lesch KP, Newman TK, Timme A, Gachot-Neveu H, Thierry B & Suomi SJ (2006) Differential Functional Variability of Serotonin Transporter and Monoamine Oxidase A Genes in Macaque Species Displaying Contrasting Levels of Aggression-Related Behavior. *Behavior genetics* **36**, 163-172.
- Westby G (1975) Further analysis of the individual discharge characteristics predicting social dominance in the electric fish. *Animal Behaviour* **23**, 249-260.
- Westergaard GC, Mehlman PT, Suomi SJ & Higley JD (1999) CSF 5-HIAA and aggression in female macaque monkeys: species and interindividual differences. *Psychopharmacology* **146**, 440-446.
- Winberg S & Lepage O (1998) Elevation of brain 5-HT activity, POMC expression, and plasma cortisol in socially subordinate rainbow trout. *Am J Physiol* **274**, 645-654.
- Winberg S & Nilsson GE (1993) Roles of brain monoamine neurotransmitters in agonistic behaviour and stress reactions, with particular reference to fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **106**, 597-614.
- Winberg S, Nilsson GE & Olsén KH (1992) Changes in brain serotonergic activity during hierarchic behavior in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) are socially induced. *Journal of Comparative Physiology A* **170**, 93-99.
- Winberg S, Overli O & Lepage O (2001) Suppression of aggression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by dietary L-tryptophan. *J Exp Biol* **204**, 3867-3876.
- Wingfield JC (2005) A continuing saga: the role of testosterone in aggression. *Horm Behav* **48**, 253-255; discussion 256-258.
- Wingfield JC, Moore IT, Goymann W, Wacker DW & Sperry T (2006) Contexts and Ethology of Vertebrate Aggression: Implications for the Evolution of Hormone-Behavior Interactions In *Biology of aggression*. London: Oxford University Press.
- Wong BBM & Candolin U (2005) How is female mate choice affected by male competition? *Biological Reviews* **80**, 559-571.
- Wullimann MF & Mueller T (2004) Teleostean and mammalian forebrains contrasted: Evidence from genes to behavior. *The Journal of Comparative Neurology* **475**, 143-162.
- Yodyingyud U, de la Riva C, Abbott DH, Herbert J & Keverne EB (1985) Relationship between dominance hierarchy, cerebrospinal fluid levels of amine transmitter metabolites (5-hydroxyindole acetic acid and homovanillic acid) and plasma cortisol in monkeys. *Neuroscience* **16**, 851-858.
- Zakon HH, Thomas P & Yan H-Y (1991) Electric organ discharge frequency and plasma sex steroid levels during gonadal recrudescence in a natural population of the weakly electric fish *Sternopygus macrurus*. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* **169**, 493-499.