



PEDECIBA

Tesis de Maestría PEDECIBA - Área Biología - Subárea Neurociencia



Rol de las hormonas esteroides en el control de la agresión territorial no reproductiva de *Gymnotus omarorum*

Cecilia Jalabert

Orientadora: Dra. Ana Silva

Co-orientadora: Dra. Laura Quintana

Laboratorio de Ejecución: Unidad Bases Neurales de la Conducta, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Montevideo, Uruguay.

Tribunal:

Dra. Denise Vizziano (Presidente)

Dra. Daniella Agrati (Vocal)

Dr. Michel Borde (Vocal)

Agradecimientos

A los miembros del tribunal, por el interés que mostraron en mi trabajo, el tiempo que le dedicaron y por los aportes que le hicieron a esta tesis.

A mis tutoras, Ana y Laura. Estoy infinitamente agradecida, por formarme como profesional y enseñarme la rigurosidad en el laboratorio con una calidez excepcional, por apoyarme en mi crecimiento y ayudarme en la etapa que viene.

A mis compañeros de la Unidad Bases Neurales de la Conducta, Roxe, Lu, Adri, Pau, Victoria, Gervasio y Fede. Por hacer del lab un lugar disfrutable para trabajar y por estar siempre dispuestos a ayudar. Agradezco en especial a Roxe, quien me enseñó a hacer los experimentos de conducta y me entrenó el ojo para el análisis. A Lu, mi compañerí de siempre, sobre todo en las mediciones hormonales. A Ger, que fue el que abrió la cancha para trabajar en este tema. A los 3 por proporcionarme los datos de archivo utilizados en esta tesis.

A los compañeros del Departamento de Neurofisiología Celular y Molecular con los que compartimos laboratorio y almuerzos.

A la gente que me acompañó en las salidas de campo y me ayudó en las colectas, Fede, Lu, Adri, Roxe, Vir, Pino, Paul, Caro y Clo.

A Ana Meikle y Paula Pessina, por la formación que me dieron en las técnicas de mediciones hormonales. A ellas y a la gente del Laboratorio de Técnicas Nucleares por haberme recibido.

A Rui Oliveira y Kiran Soma, por sus aportes y sugerencias que me ayudaron en momentos claves de la realización de la tesis. También a Rui por proporcionarme fadrozole.

A Gene y Ruta Ciontonueve, por la ayuda en la edición del manuscrito, el cual revisaron con lupa antes de su publicación.

A Alexis Gerschuni, por su asesoramiento en estadística y por dedicarle mucho pienso a mis problemas estadísticos.

A las fuentes de financiación que hicieron posible la realización de este trabajo. Beca de Maestría de ANII, Proyecto ANII FCE_3_2013_1_100495, Proyecto ANII FCE_1_2011_1_6180. PEDECIBA alícuotas y pasantía local.

A mis amigos del piso 6, en especial a Betta y Caco. A Betta porque gracias a sus acertados consejos, fue que llegué a este hermoso laboratorio.

A mis amigos: de la BAW a todos los Pinkies y a los Cerebros. A las chiquilinas, por compartir 20 años de amistad. A la gente de la barra.

A mi familia, Mamá, Aia, Ñaña, Titi, Urre, Caro, Rodo, Lu y Clo. A la nueva y más hermosa integrante de la familia, Jose. Gracias a todos por el cariño, el apoyo incondicional, por aguantarme y por la mano que me dieron siempre. A la familia de Pablo por abrirme las puertas de su casa y hacerme parte de la familia

A Pablo, mi compañero de la vida, con quien crecimos juntos. Que me acompañó en esta etapa y siempre me aguantó la cabeza. Por elegir seguir compartiendo y lanzarnos juntos en nuestro nuevo emprendimiento.

Índice

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	5
CONDUCTA AGONÍSTICA Y AGRESIÓN	5
BASES NEUROENDÓCRINAS DE LOS COMPORTAMIENTOS AGONÍSTICOS	5
CONTROL NEURAL DE LA AGRESIÓN	5
MODULACIÓN DE LA AGRESIÓN REPRODUCTIVA	6
MODULACIÓN DE LA AGRESIÓN NO REPRODUCTIVA	8
MODULACIÓN ESTEROIDEA DE LA AGRESIÓN REPRODUCTIVA EN MACHOS TELEÓSTEOS	10
<i>GYMNOTUS OMARORUM</i> COMO MODELO NEUROETOLÓGICO PARA EL ESTUDIO DE LA AGRESIÓN EN VERTEBRADOS	11
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	14
OBJETIVOS GENERALES	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN	15
MATERIALES Y MÉTODOS	17
ANIMALES	17
COMPORTAMIENTO	17
CIRUGÍA BÁSICA: INSPECCIÓN GONADAL QUIRÚRGICA	19
PROCESAMIENTO DE DATOS	20
DETERMINACIONES HORMONALES	21
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
CAPÍTULO 1: AGRESIÓN TERRITORIAL NO REPRODUCTIVA ENTRE MACHOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS ESPECÍFICOS	23
CARACTERIZACIÓN DE LA CONDUCTA AGONÍSTICA ENTRE MACHOS Y EVALUACIÓN DE POSIBLE CORRELACIÓN CON NIVELES DE 11-KT	24
RESULTADOS	25
CARACTERIZACIÓN DE LA CONDUCTA AGONÍSTICA ENTRE MACHOS	25
CORRELACIÓN DE LA CONDUCTA CON LOS NIVELES DE 11-KT	27
DISCUSIÓN	28

CUADRO 1. LA ELECCIÓN DE LA AGRESIÓN INTER-SEXUAL MASCULINA COMO MODELO ETOLÓGICO	31
<u>CAPÍTULO 2: MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD AROMATASA</u>	33
MATERIALES Y MÉTODOS ESPECÍFICOS	33
MODULACIÓN FARMACOLÓGICA	33
RESULTADOS	34
DISCUSIÓN	36
<u>CAPÍTULO 3: AGRESIÓN MACHO-MACHO Y HORMONAS GONADALES</u>	40
MATERIALES Y MÉTODOS ESPECÍFICOS	40
GONADECTOMÍA	40
RESULTADOS	41
DISCUSIÓN	43
<u>DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</u>	46
<u>CONTRIBUCIONES</u>	50
PUBLICACIONES	50
COMUNICACIONES A CONGRESOS	50
DESARROLLOS EXPERIMENTALES	51
FINANCIACIÓN	52
<u>REFERENCIAS</u>	53

Resumen

Las conductas agonísticas, ampliamente presentes en animales, surgen cuando co-específicos compiten por recursos limitados y determinan el acceso a los mismos. Las bases neuroendócrinas de estas conductas están conservadas en vertebrados. La agresión reproductiva entre machos es promovida por la testosterona (T) gonadal. Sin embargo, algunas especies exhiben intensa agresión territorial no reproductiva (ATNR), con bajos niveles de T circulantes. En aves y mamíferos la ATNR está vinculada a neurosíntesis de estrógenos; otros taxones permanecen sin ser explorados. En peces, la agresión macho-macho reproductiva es promovida por el principal esteroide sexual masculino, el andrógeno bioactivo 11-cetotestosterona (11-KT). Utilizamos un modelo teleósteo ventajoso para abordar los mecanismos de la ATNR, *Gymnotus omarorum*, pez eléctrico sexualmente monomórfico, reproductor estacional y territorial, con una dinámica de contienda bien descrita. La hipótesis de trabajo sostiene que la ATNR de *G. omarorum* es modulada por hormonas esteroides no gonadales. Encontramos que en el período no reproductivo la conducta agonística entre machos de *G. omarorum* es indistinguible de la reportada en díadas intra e inter-sexuales, y que altos niveles de ATNR se producen pese a los bajos niveles circulantes de andrógenos, ya que la 11-KT plasmática no correlaciona con la dominancia ni con los niveles de agresión. Por otra parte evidenciamos que la ATNR en díadas macho-macho de *G. omarorum* depende de la conversión de andrógenos a estrógenos, dado que la inhibición de la enzima aromatasa distorsiona las contiendas y disminuye los niveles de agresión de los individuos tratados. Por último, demostramos que la ATNR de *G. omarorum* depende de hormonas esteroides extra-gonadales, ya que la conducta agonística persiste en animales castrados. Los resultados obtenidos en esta tesis constituyen la primera evidencia en teleósteos de un papel crítico de la aromatasa en la ATNR, mediando efectos de hormonas esteroides no gonadales. Esta regulación puede constituir una estrategia general que ha evolucionado en vertebrados con el fin de lograr que con bajos niveles de esteroides sexuales el comportamiento agresivo sea viable.

Palabras clave: Teleósteo, conducta agonística no reproductiva, andrógenos, 11-cetotestoteron, aromatasa, estrógeno, castración.

Abstract

Agonistic behavior, displayed by virtually all organisms, arises from the competition between co-specific individuals for the access to limited resources. The neuroendocrine bases of these behaviors are conserved in vertebrates. During the breeding season, gonadal testosterone (T) stimulates male-male aggression in a broad range of species. Interestingly, some species exhibit intense non-breeding territorial aggression (NBTA), regardless low levels of plasmatic T. In mammals and birds, NBTA is modulated by neurosynthesis of estrogens; its study in other taxa remains unexplored. In teleost fish, male-male breeding aggression is positively correlated to circulating levels of androgens, particularly the bioactive teleost androgen, 11-ketotestosterone (11-KT). This work deals with the weakly electric fish *Gymnotus omarorum*, an advantageous teleost model to address the mechanisms of NBTA. *G. omarorum* is a sexually monomorphic seasonal breeder, highly aggressive, with a well-described agonistic behavior. The working hypothesis holds that NBTA of *G. omarorum* is modulated by non-gonadal steroid hormones. We found that during the non-breeding season, agonistic behavior between males of *G. omarorum* is indistinguishable from the one reported in intra and inter-sexual dyads; and high levels of NBTA occur despite low circulating levels of androgens, since 11-KT plasma does not correlate with the dominance or aggression levels. Furthermore we show that the NBTA in male-male dyads *G. omarorum* relies on the conversion of androgens to estrogens, since inhibition of the aromatase enzyme distorts contests and decreases aggression in treated animals. Finally, we show that NBTA of *G. omarorum* depends on extra-gonadal steroid hormones, since agonistic behavior persists in castrated animals. This is the first study in a teleost fish to evidence a critical role of the aromatase enzyme on non-gonadal steroid hormones. This regulation may be a general strategy developed in vertebrates to secure aggressive behavior despite low levels of sex steroids.

Keywords: Teleost fish, non-breeding agonistic behavior, androgens, 11-ketotestosterone, aromatase, estrogen, castration.

Introducción y antecedentes

Conducta agonística y agresión

Las interacciones agonísticas están ampliamente presentes en animales y surgen como respuesta a situaciones de conflicto entre individuos de una misma especie cuando compiten por el acceso a recursos limitados (tales como pareja, sitios de nidificación, alimento o refugio) (Austad, 1983; Huntingford and Turner, 1987). Estas interacciones en general siguen las mismas fases estereotipadas: a) pre-conflicto, o fase de evaluación; b) contienda, fase donde ocurren los despliegues agresivos; y c) post-resolución, a partir de la resolución del conflicto. Los comportamientos agonísticos son todos aquellos que se expresan durante un encuentro agonístico y cumplen tanto funciones de amedrentamiento (ej.: amenaza o agresión) como de sumisión (ej.: respuesta de escape) (King, 1973). Agresión se define, en este marco, como los despliegues realizados con intención de ocasionar daño físico a otro co-específico (Nelson, 2006). De esta forma, las conductas agonísticas implican el establecimiento de relaciones de dominancia y subordinación entre los contendientes que habilitan el acceso al recurso en contienda (King, 1973; Lorenz, 1966).

Bases neuroendócrinas de los comportamientos agonísticos

Control neural de la agresión

El control del comportamiento social depende de circuitos neurales que se conocen como la red de comportamiento social (RCS) (social behavior network), y sus nodos se ubican en áreas del cerebro en el prosencéfalo límbico y el mesencéfalo (Newman, 1999; O'Connell et al., 2013). En mamíferos, la RCS consta de 6 nodos: área

preóptica media, septum lateral, hipotálamo anterior y ventromedial, núcleo de la estría terminalis, sustancia gris periacueductual y amígdala medial. Estos nodos están conectados recíprocamente, tienen receptores de hormonas esteroides en una amplia gama de taxones (destacando el rol que estas hormonas pueden tener en la regulación de la actividad de esta red, y por lo tanto, en los comportamientos sociales) y cada uno de ellos está involucrado de distinta forma en los múltiples comportamientos sociales (tales como el comportamiento agresivo o reproductivo). Se ha propuesto que la RCS integra información y produce una respuesta con un patrón espacio-temporal de actividad neuronal distintivo de acuerdo a cada fenotipo, contexto social, etc. (Newman, 1999) (Goodson and Kabelik, 2009). Aunque los despliegues comportamentales (ej.: agonísticos) presentan un alto grado de variabilidad, los circuitos neurales implicados en la modulación de las conductas, los ejes endócrinos que modulan estas redes neurales (ej.: hipotálamo-hipófisis-gonadal) y las hormonas involucradas (ej.: testosterona) se encuentran altamente conservados en vertebrados (Goodson et al., 2005). En aves, se han encontrado homologías con la RCS de mamíferos: está compuesta por los mismos nodos (a diferencia de la amígdala medial que se conoce como el núcleo taeniae) e incluso presentan patrones de activación similares en contextos sociales semejantes (Goodson, 2005). Asimismo, en los peces teleosteos se reconocen la sustancia gris periacueductal central, el área pre-óptica y el hipotálamo anterior y se ha propuesto que hay núcleos homólogos a los de la RCS en mamíferos: el núcleo supra comisural del telencéfalo ventral se propone homólogo a la amígdala, el núcleo ventral del telencéfalo ventral al septum, el núcleo tuberal anterior al hipotálamo ventromedial (Goodson, 2005). La conservación de estas áreas ofrece un escenario que habilita realizar estudios que permitan establecer patrones de control del comportamiento generales en los vertebrados (Goodson and Kabelik, 2009).

Modulación de la agresión reproductiva

En vertebrados, las conductas agonísticas se observan principalmente en contexto reproductivo y en contiendas entre machos donde es ampliamente aceptado que el principal andrógeno producido por los testículos, la testosterona (T), promueve

la agresión (Wingfield, 2005). Esto se ha comprobado principalmente por dos tipos de evidencias. En primer lugar, se ha demostrado que niveles plasmáticos elevados de T son necesarios para la ocurrencia de agresión; experimentos de castración (donde se elimina la principal fuente de T circulante) y reemplazo hormonal han proporcionado fuerte evidencia en este sentido en reptiles (Moore and Marler, 1987), aves (Balthazart, 1983; Wingfield and Hahn, 1994) y mamíferos (Vandenbergh, 1971). En segundo lugar, el patrón temporal de secreción de T es plástico y varía según el contexto social; se ha visto que las interacciones agresivas inducen un aumento de los niveles plasmáticos de T en los machos entre 10 y 30 minutos luego del encuentro, favoreciendo la persistencia de la agresión frente a nuevos estímulos (Wingfield et al., 1990; Wingfield et al., 2006). Se plantea que los andrógenos (y las hormonas esteroides en general) actúan sobre el sistema nervioso central (SNC) modulando la actividad de sus blancos cuando actúan como ligandos para los factores de transcripción, lo que se conoce como efectos genómicos de las hormonas esteroides. De esta forma las hormonas esteroides modulan la actividad los distintos nodos de la RCS actuando indirectamente sobre el comportamiento pero no de forma determinista sobre la ejecución de una conducta (Adkins-Regan, 2005). Estos efectos de las hormonas esteroides sobre el SNC requieren varias horas (incluso días) para desarrollarse y producen cambios persistentes en la fisiología y el comportamiento (McCarthy et al., 2009).

Por otra parte, se ha observado que en muchos casos la modulación hormonal de la agresión reproductiva tradicionalmente atribuida a los andrógenos, se debe en realidad, a su conversión a estrógenos por parte de la enzima aromatasa. Schlinger y Callard (Schlinger and Callard, 1990) llevaron a cabo los primeros experimentos que mostraron que niveles circulantes altos de T y de estradiol (E2) promueven el comportamiento agresivo en la codorniz *Coturnix coturnix japonica*. Sin embargo, en esta especie, la agresión disminuye por la administración de inhibidores de la enzima aromatasa y bloqueantes de receptores de estrógenos (RE) pero no por antagonistas de los receptores de andrógenos (RA). Asimismo, en mamíferos, se ha demostrado que los RE nucleares que actúan como factores de transcripción tienen un rol clave la agresión reproductiva entre machos: ratones knockout del RE α muestran una

disminución de la agresión (Ogawa et al., 1997; Scordalakes and Rissman, 2003) y el número de células positivas de RE α en varias regiones del cerebro se correlaciona positivamente con la agresión (Trainor et al., 2006). Incluso, han habido algunos reportes de especies que despliegan agresión reproductiva independientemente de las hormonas esteroides circulantes (Apfelbeck et al., 2013; Landys et al. 2013).

Modulación de la agresión no reproductiva

Aunque numerosas especies de vertebrados exhiben altos niveles de agresión únicamente en el período reproductivo, se ha reportado que otras especies de vertebrados defienden agresivamente sus territorios durante todo el año. La expresión de agresión territorial no reproductiva (ATNR), cuando las gónadas están en reposo y los niveles de hormonas esteroides circulantes son bajos, impone un desafío a los paradigmas tradicionales donde la T gonadal cumple un rol fundamental en la modulación de la misma. En algunas especies de aves, se ha estudiado en profundidad la regulación de agresión territorial durante el período no reproductivo y su relación con hormonas esteroides. En estos modelos, se plantea que la territorialidad durante el período no reproductivo debería ser independiente de la T plasmática ya que en este período los machos presentan testículos pequeños y los niveles de T circulante son bajos en comparación con los del período reproductivo (Wingfield and Hahn, 1994). Esto es esperable, ya que niveles altos de T pueden acarrear dramáticos costos, como por ejemplo, aumento de la tasa metabólica basal, disminución de los depósitos de grasa, inhibición del sistema inmunológico, así como la inducción del comportamiento reproductivo en momentos inapropiados, mientras que, durante el período no reproductivo, la disponibilidad de alimentos y la temperatura son bajas (Wingfield et al., 2006). De esta forma, se postula que los mecanismos neuroendócrinos podrían haber evolucionado para favorecer el mantenimiento de la agresión en contextos no reproductivos, eludiendo los costos deletéreos de la alta T circulante (Soma, 2006). En este sentido, numerosos estudios demuestran que la ATNR en aves (Gwinner et al., 1994; Logan and Wingfield, 1990; Soma and Wingfield, 1999; Wingfield, 1994; Wingfield et al., 1997), mamíferos (Caldwell et al., 1984; Demas et al.,

2007; Jasnow et al., 2000) y reptiles (Moore and Marler, 1987) persiste incluso después de la castración, indicando que en el período no reproductivo la agresión es independiente de las hormonas gonadales.

Wingfield y colaboradores (Wingfield et al., 2001) explican el mantenimiento de la ATNR con niveles plasmáticos bajos de esteroides sexuales por al menos dos mecanismos:

1) precursores esteroideos inertes son sintetizados en los órganos periféricos y convertidos a hormonas esteroideas bioactivas en el cerebro. En aves y mamíferos se ha demostrado que los andrógenos y estrógenos pueden sintetizarse localmente en el cerebro a partir de precursores esteroideos extra gonadales, tales como dehidroepiandrosterona adrenal (DHEA) (Demas et al., 2007; Soma and Wingfield, 2001; Soma et al., 2008). Las aves *Melospiza melodia*, presentan elevadas concentraciones plasmáticas de DHEA y la capacidad de metabolizarlo a nivel central (ya que expresan las enzimas esteroideogénicas apropiadas para ello) y la administración de DHEA aumenta la agresividad (Soma et al., 2008).

2) síntesis *de novo* de esteroides sexuales en el cerebro a partir del colesterol, independientemente de las gónadas y otros tejidos periféricos, proceso reportado en mamíferos (Tsutsui et al., 2000) y aves (Tsutsui and Yamazaki, 1995; Tsutsui et al., 2003).

Al igual que en el período reproductivo, los estrógenos han sido relacionados con la regulación de la ATNR en aves aunque probablemente su origen no sea gonadal (Hau et al., 2000; Schlinger et al., 1992; Soma and Wingfield, 1999; Soma et al., 1999; Soma et al., 2000b; Soma et al., 2000a). En *M. melodia*, la actividad de la aromatasas cambia en regiones específicas del cerebro y correlaciona positivamente con la agresión (Soma et al., 2003); la inhibición de esta enzima reduce significativamente la expresión de ATNR (Soma and Wingfield, 1999; Soma et al., 1999); y los efectos de esta

inhibición son revertidos por la administración exógena de E2 (Soma et al., 2000b; Soma et al., 2000a). Además de los tradicionales efectos a largo plazo de las hormonas esteroideas sobre la modulación de la agresión, las hormonas esteroideas pueden ejercer efectos rápidos no-genómicos, que están mediados, al menos en parte, por acciones sobre receptores unidos a la membrana plasmática (Wehling and Lösel, 2006) o por la modulación alostérica de receptores para diversos neurotransmisores (Pinna et al., 2006). De esta forma, los estrógenos han demostrado ser potentes neuroesteroides con efectos rápidos en aves y mamíferos (Balthazart et al., 2006; Cornil et al., 2006; Charlier et al., 2011; Pradhan et al., 2008; Pradhan et al., 2010; Remage-Healey et al., 2010; Taziaux et al., 2007; Woolley, 2007) y pueden aumentar rápidamente el comportamiento agresivo y la señalización intracelular en las regiones del cerebro asociadas con el comportamiento social con cursos de tiempo que difieren entre los períodos reproductivo y no reproductivo (Heimovics et al., 2012; Trainor et al., 2007; Trainor et al., 2008). Las vías de señalización pasan de ser mecanismos predominantemente genómicos (con efectos en > 30 minutos) en el período reproductivo, a principalmente no-genómicos (<30 minutos) en el período no reproductivo (Heimovics et al., 2012; Heimovics et al., 2015; Trainor et al., 2007; Trainor et al., 2008). En conjunto, estos resultados incentivan a explorar en otros taxones si la regulación estrogénica de la agresión no reproductiva es una característica general en vertebrados.

Modulación esteroidea de la agresión reproductiva en machos teleósteos

En los peces teleósteos, al igual que en otros taxones, los estudios de la modulación neuroendócrina de la agresión se han limitado a machos y al período reproductivo donde se observa que las hormonas esteroideas juegan un rol preponderante en la modulación de la agresión. En particular, el principal esteroide sexual vinculado a la agresión reproductiva en machos de teleósteos es el andrógeno bioactivo (no aromatizable) 11-cetotestosterona (11-KT) (Borg, 1994). La adquisición de un territorio en *Sparisoma viride* produce un incremento en los niveles de T así como los de 11-KT (Cardwell and Liley, 1991). En varias especies de cíclidos los niveles

de 11-KT plasmáticos en machos aumentan en respuesta a un intruso (Hirschenhauser et al., 2004) y son mayores en dominantes que en subordinados (Morandini et al., 2014; Oliveira et al., 1996; Ramallo et al., 2014), así como la administración exógena de andrógenos produce un aumento en los niveles de agresión desplegada en encuentros macho-macho (revisado en (Gonçalves and Oliveira, 2010)). En la agresión reproductiva entre machos de *Astatotilapia burtoni*, los individuos dominantes tienen mayores niveles plasmáticos de andrógenos que los subordinados (Parikh et al., 2006); la castración disminuye los niveles de T y 11-KT, provocando un descenso en los niveles de agresión (Francis et al., 1992); y los niveles de agresión se correlacionan positivamente con los niveles de transcritos de receptores de andrógenos en el cerebro (Maruska and Fernald, 2010). En *Amatitlana nigrofasciata* el bloqueo de los receptores de andrógenos disminuye la agresión (Sessa et al., 2013).

Por otra parte, existen muy pocos reportes de estudios sobre ATNR en teleósteos (Batista et al., 2012; Vulllioud et al., 2013) y no se han explorado aún sus mecanismos neuroendócrinos subyacentes.

***Gymnotus omarorum* como modelo neuroetológico para el estudio de la agresión en vertebrados**

Los peces eléctricos tienen la capacidad de generar y detectar campos eléctricos para la electrolocalización así como para la comunicación social. La Descarga del Órgano Eléctrico (DOE) posee información que los individuos emplean en distintos contextos sociales (Stoddard, 2006). Durante las interacciones sociales, estos animales despliegan conductas con componentes locomotores y eléctricos conspicuos y fácilmente cuantificables, lo que los hace modelos ventajosos para el estudio de las bases neuroendócrinas de la conducta. *Gymnotus omarorum* (Richer-de-Forges et al., 2009) es un pez eléctrico autóctono de descarga débil que habita en zonas litorales de cuerpos de agua dulce (fig. 1). Es una especie territorial, solitaria, con alta fidelidad al sitio e intolerancia a la presencia cercana de co-específicos (L. Zubizarreta,

comunicación personal), sin dimorfismo sexual morfológico ni electrofisiológico y que presenta reproducción estacional (Batista, 2011).



Fig. 1- Ejemplar de la especie *G. omarorum*. Foto: Pablo Vaz.

La presente tesis se desarrolló en el marco de una línea de trabajo neuroetológica que ha descrito el comportamiento social de esta especie y su neuromodulación. La descripción de la conducta agonística de *G. omarorum*, permitió identificar que es la única especie conocida de teleósteos que presenta agresión intra e inter-sexual, tanto en período reproductivo como no reproductivo. Las observaciones previas del grupo establecieron que en período no reproductivo, la resolución del conflicto está determinada por asimetrías de tamaño y es independiente del sexo de los individuos. Es decir, en esta especie la diferencia de peso es un buen predictor de la dominancia, el contendiente de mayor tamaño sería el vencedor de una diada cuando la diferencia de peso es mayor al 5% (Batista et al., 2012). Esta especie exhibe una dinámica de contienda bien descrita donde se pueden distinguir las 3 fases características del encuentro agonístico delimitadas por parámetros locomotores conspicuos (fig. 2). Como resultado del combate, se establecen marcadas relaciones de dominancia y subordinación. La sumisión en *G. omarorum* se manifiesta por la retirada del subordinado y por la emisión de señales eléctricas distintivas que constituyen despliegues de subordinación de fácil cuantificación (Batista et al., 2012; Perrone, 2012; Silva et al., 2013). Las señales eléctricas sociales transitorias (SES) emitidas por subordinados se basan en modificaciones de la amplitud y frecuencia de la DOE.

Durante las contiendas, comúnmente se producen SES de dos tipos, interrupciones de la DOE llamados offs, y aumentos abruptos y breves en la frecuencia de la DOE llamados chirps (fig.2) (Batista et al., 2012). Una vez que se establece la dominancia en la post-resolución, el subordinado también señala su estatus produciendo un descenso de la frecuencia basal de la DOE respecto a si mismo en el pre-conflicto y respecto a su contendiente en la post-resolución (Perrone, 2012; Silva et al., 2013).

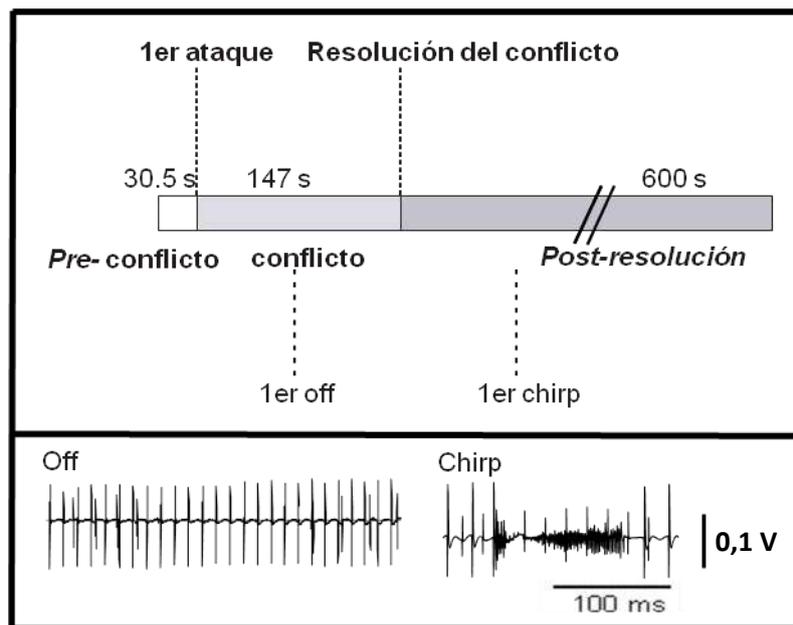


Fig. 2- Dinámica de la contienda (arriba). SES (abajo). Modificado de Batista et al., 2012.

En suma, *G. omarorum* es un excelente modelo para el estudio de los mecanismos neuroendócrinos de la ATNR en vertebrados.

Hipótesis y objetivos

Las bases neurales de la conducta agonística están conservadas en vertebrados; el estudio de sus mecanismos neuroendócrinos subyacentes se ha enfocado mayormente en el período reproductivo donde se ha relacionado a hormonas esteroides de origen gonadal, particularmente a andrógenos. La agresión que ocurre disociada del período reproductivo desafía el paradigma tradicional e impone explorar mecanismos alternativos. En aves y mamíferos se describe agresión fuera del período reproductivo vinculada a estrógenos y a la neurosíntesis de esteroides (Soma and Wingfield, 2001; Soma et al., 2008; Soma et al., 2008), mientras que el estudio en otros taxones permanece aún sin explorarse. En peces, los estudios de la modulación de la agresión están limitados al período reproductivo, donde numerosos antecedentes evidencian un control de la agresión mediado por el andrógeno bioactivo 11-KT (Francis et al., 1992; Morandini et al., 2014; Oliveira et al., 1996; Oliveira et al., 2001). Sin embargo, esto no ha sido estudiado aún en contexto no reproductivo. *G. omarorum* ofrece una oportunidad única para examinar la regulación neuroendócrina de la agresión territorial no reproductiva e identificar estrategias comunes que pueden haber surgido tempranamente en la evolución de los vertebrados.

Este trabajo se propone explorar las bases endócrinas de la agresión territorial no reproductiva en peces teleósteos. En este marco nos planteamos la siguiente hipótesis:

La agresión territorial no reproductiva de *Gymnotus omarorum* es modulada por hormonas esteroides no gonadales

Objetivos generales:

- Explorar los posibles mediadores hormonales esteroideos de la agresión territorial no reproductiva en teleósteos.
- Evaluar si las hormonas esteroides gonadales son necesarias para la expresión de agresión territorial no reproductiva en teleósteos.

Objetivos Específicos:

- i) Evaluar la conducta agonística no reproductiva entre machos de *G. omarorum* y su correlación con la 11-KT circulante.
- ii) Evaluar la acción de un inhibidor de la enzima aromatasa sobre contiendas diádicas no reproductivas entre machos de *G. omarorum*.
- iii) Evaluar la persistencia de la agresión territorial no reproductiva luego de la resección quirúrgica de los testículos.

Estrategia de investigación

El hecho de que la influencia de las hormonas en la agresión suele presentar dimorfismo sexual, impone restringir el estudio de los mecanismos a un sexo (Nelson, 2006). Dado que los antecedentes en teleósteos son mayormente en machos, en esta tesis se trabajó únicamente con machos para favorecer comparaciones.

Como punto de partida, fue necesario el desarrollo de un protocolo de cirugía que permitiera identificar el sexo de los individuos y la realización de la gonadectomía previo al desarrollo de los experimentos conductuales. De la misma forma, fue necesario poner a punto metodologías de cuantificación de hormonas esteroides en la especie, para poder determinar los niveles plasmáticos de 11-KT en machos dominantes y aislados así como en individuos castrados para confirmar la correcta realización de la gonadectomía. Todos los experimentos se realizaron fuera del período reproductivo evaluando la conducta agonística en diadas de machos (sexo

previamente confirmado por inspección gonadal) con una diferencia de peso entre 5 y 20%.

Los resultados de esta tesis se organizaron en tres capítulos que abordan, respectivamente, los tres objetivos específicos de este trabajo:

1- Caracterización de la conducta agonística macho-macho de *G. omarorum*. En primer lugar se describió la conducta agonística macho-macho (eléctrica y locomotora). En segundo lugar, con el fin de evaluar si el sexado afecta el comportamiento, se compararon las contiendas macho-macho de individuos sexados antes del encuentro frente a las contiendas macho-macho en individuos intactos previamente realizadas por el grupo de trabajo. Debido a la importancia de la 11-KT en peces, inicialmente se evaluó la existencia de una correlación entre los niveles de 11-KT y la dominancia, la tasa de ataques del dominante y el peso de los individuos. Por último, con el fin de evaluar los efectos de la composición por sexo de la díada sobre la conducta agonística, se realizó un análisis en díadas intra e inter-sexuales (con datos disponibles en un banco de archivos).

2- Para evaluar el tipo de hormona esteroide involucrada en el control de la ATNR, se realizaron contiendas donde los individuos de mayor tamaño (dominante esperado) fueron pre-tratados con un inhibidor de la enzima aromatasa, fadrozole (FAD) o vehiculo, mientras que los de menor tamaño recibieron vehículo.

3- Para evaluar si las hormonas esteroides gonadales son necesarias para la expresión de ATNR, se enfrentaron díadas de machos adultos gonadectomizados y se evaluó su conducta agonística en comparación con la observada en díadas control (en las que se realiza el acto quirúrgico sin resección de gónada).

Materiales y métodos

Animales

Utilizamos un total de 54 machos adultos de *G. omarorum* (Richer-de-Forges et al., 2009) (longitud de 15 a 25 cm y peso de 8,9 a 44,5 g). Debido a que esta especie es sexualmente monomórfica, el sexo fue identificado por inspección gonadal. Todos los experimentos se llevaron a cabo durante el período no reproductivo (mayo-agosto) (Silva et al., 2003).

Los peces fueron colectados en la Laguna del Cisne (34°51'S, 55°07'W), Maldonado, Uruguay, utilizando un detector eléctrico compuesto por dos electrodos de registro conectados a un parlante que transforma la señal eléctrica emitida por el pez en un sonido (Silva et al., 2003). Para evitar la experiencia de interacciones agonísticas recientes (Hsu et al., 2006), los animales fueron alojados en compartimentos individuales dentro de grandes piscinas al aire libre (500 L). Estas piscinas estaban bajo fotoperiodo natural (de LD 10:14 a 11:13 LD), temperatura (10,4 ± 3,5 °C), y conductividad (<200 mS/cm) según las características ambientales naturales descritas por (Silva et al., 2003), y cubiertas por plantas acuáticas traídas de la laguna. En cada compartimento individual se proporcionó un refugio. Los peces fueron alimentados *ad libitum* con *Tubifex tubifex*.

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con el reglamento de uso de animales en la investigación y el protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) (Resolución 10/05/2012).

Comportamiento

Se evaluó el comportamiento agonístico de *G. omarorum* en encuentros diádicos entre machos durante el período no reproductivo en los diferentes grupos experimentales. Cincuenta y cuatro machos (identificados mediante inspección

gonadal quirúrgica) fueron asignados aleatoriamente a una díada respetando una diferencia de peso del 5-20% entre los contendientes. Como el resultado de la contienda en *G. omarorum* depende de las asimetrías de tamaño entre los contendientes (Batista et al., 2012), podemos identificar el dominante esperado (pez grande) y el subordinado esperado (pez pequeño) de la díada. Las díadas fueron asignadas aleatoriamente a uno de los siguientes grupos experimentales: díadas tratadas con fadrozole (díadas FAD, n=8), díadas tratadas con solución salina (díadas salino, n=8), díadas gonadectomizados (díadas GDX, n=5) y díadas control con cirugía sin resección de gónada (díadas SHAM, n=6). Realizamos los encuentros diádicos entre individuos de estos grupos experimentales, evaluamos el comportamiento agonístico (resultado de la contienda, la dinámica de la contienda, la agresión, y los niveles de subordinación), y comparamos entre los grupos experimentales: díadas FAD frente díadas salino y díadas GDX frente díadas SHAM. Este diseño experimental aseguró que: a) todos los grupos experimentales se compusieran de peces abarcando el mismo rango de tamaño; b) los peces fueran asignados aleatoriamente a una díada en la que la diferencia de peso entre los contendientes nos permitiera predecir el resultado esperado; y c) cada pez fuera utilizado sólo una vez para evitar los efectos de la experiencia anterior.

Las díadas fueron colocadas en la estación de registro conductual como se describe en Silva et al., (2007) que permitió el registro simultáneo de video y eléctrico, control de fotoperiodo, temperatura del agua, conductividad y pH. La estación conductual consta de 4 tanques experimentales (55 x 40 x 25 cm), cada uno dividido al medio por una compuerta de vidrio removible (fig. 3). En este diseño, los individuos están imposibilitados de atacarse pero no se encuentran aislados eléctricamente. Todos los experimentos fueron llevados a cabo durante la noche, en oscuridad, con iluminación de LED infrarrojos (Kingbright L-53F3BT; 940 nm) por encima de los tanques. Los experimentos fueron filmados con una cámara de vídeo sensible al infrarrojo (SONY CCDIris, Montevideo, Uruguay) a través del fondo de vidrio del tanque. El registro de la DOE de los peces en libre movimiento es detectada por dos pares de electrodos de alambre de cobre fijos a las paredes de los tanques que se conectan a dos amplificadores de alta impedancia de entrada (1 M Ω) (FLA-01; Cygnus

Technologies Inc., Delaware Water Gap, PA, EE.UU.). Las imágenes y señales eléctricas son capturadas por una tarjeta de video (Pinnacle Systems, PCTV-HD pro stick) y almacenadas en la computadora para su posterior análisis.

Los encuentros agonísticos se realizaron bajo protocolo de compuerta (fig. 3), donde se utilizó una arena simple (sin comida ni refugio). Los peces se colocaron al mismo tiempo en cada uno de los compartimentos de igual tamaño 2 h antes del experimento, lo que proporciona los mismos recursos (territorio y residencia) para cada individuo (Batista et al., 2012). La compuerta de vidrio se retiró 10 minutos después del anochecer, y los peces se separaron 10 minutos después de la resolución del conflicto. Los peces dominantes y subordinados se retiraron del tanque.

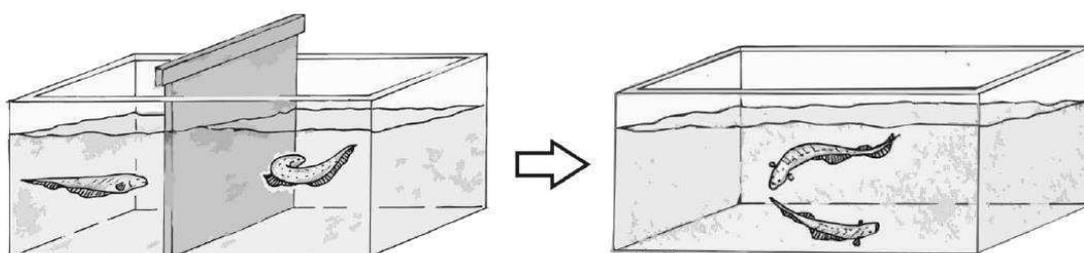


Figura 3. Protocolo de compuerta. Los individuos se encuentran en la misma pecera separados por una compuerta quedando imposibilitados de atacarse (izquierda). Luego de la remoción de la misma los peces quedan expuestos y comienza la pelea (derecha). Tomado de Batista 2011.

Cirugía básica: inspección gonadal quirúrgica

Todos los peces utilizados se sometieron a una cirugía básica para la identificación del sexo por inspección gonadal. Los peces se alojaron individualmente en tanques interiores de 20x30x20 cm al menos 24 h antes de la cirugía para la aclimatación al nuevo entorno. Los individuos fueron anestesiados por inmersión con 2-fenoxietanol 0,075%, y durante la intervención se les proporcionó ventilación a través de las branquias con la misma dosis de anestesia. Mediante una pequeña incisión lateral se realizó la identificación visual del sexo gonadal (bajo lupa). Luego de la sutura quirúrgica, los peces recibieron tratamiento antiséptico tópico con solución de nitrato de plata, 1%, y antibiótico al agua con amoxidal, 250µl/L. Después de la cicatrización completa y la estabilización de peso corporal, los peces fueron devueltos a los alojamientos exteriores.

Procesamiento de datos

Los despliegues locomotores y eléctricos fueron analizados sin conocimiento de los grupos experimentales y tratamientos. Siguiendo a Batista et al, (2012), identificamos las tres fases características de los encuentros agonísticos: (1) Fase de pre-conflicto: desde el tiempo 0 (remoción de la compuerta) a la ocurrencia del primer ataque (latencia al primer ataque); (2) Fase de contienda: desde la aparición del primer ataque a la resolución del conflicto (duración del conflicto); y (3) la fase post-resolución: 10 minutos después de la resolución del conflicto. La resolución del conflicto se define como el momento en que observamos tres retiradas consecutivas sin respuesta por parte de uno de los peces. Este criterio define inequívocamente el estatus de subordinado; en los peces que se consideraron subordinados (de acuerdo a este criterio) no mostraron cambios de su estado en los siguientes 10 min. de interacción. Se consideran ataques los empujes y mordidas. Se calculó la tasa de ataques, dividiendo el número de ataques por la duración de la fase en segundos, como un indicador de los niveles de agresión (Black-Cleworth, 1970).

Identificamos las señales eléctricas transitorias emitidas por los subordinados: offs (interrupciones DOE), chirps (aumentos bruscos en la frecuencia basal de la DOE) (Batista et al, 2012), y el estatus de jerarquía de la DOE (disminución de la frecuencia basal de la DOE después de la resolución del conflicto exhibida por el subordinado) (Silva et al., 2013). Se estimó la latencia al primer off y primer chirp, el tiempo hasta el primer off o chirp después de la aparición del primer ataque, y se calculó la tasa de off y chirp (por separado para la contienda y la post-resolución) dividiendo el número de offs y chirps producidos en cada fase por la duración de la fase correspondiente en segundos. Para la medición del estatus de jerarquía de la DOE se calculó la media de la frecuencia de la DOE en dominantes y subordinados durante las fases de pre-conflicto y post-resolución. Para ello, se tomaron grabaciones del registro eléctrico (10-60s) de ambas fases, y se determinó el intervalo medio de la DOE en cada muestra utilizando el software Clampfit (AXON, 10.0.0.61). Con estos valores se calculó la frecuencia basal de la DOE (frecuencia = $1/\text{intervalo}$) en el pre-conflicto y la post-resolución. Para comparar entre grupos experimentales, se calculó la magnitud de cambio de la

frecuencia basal de la DOE entre las fases (índice post-resolución de la DOE), obtenido como la diferencia entre la frecuencia de la DOE post-resolución y la frecuencia de la DOE pre-conflicto normalizado a la frecuencia de la DOE pre-conflicto.

Determinaciones hormonales

Se midieron los niveles circulantes de 11-KT utilizando un kit de inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) (Cayman Chemical Co.) con métodos previamente validados en una especie emparentada de peces eléctricos (Dunlap et al., 2011; Gavassa et al., 2011; Gavassa et al., 2012; Salazar and Stoddard, 2009). Los peces se anestesiaron por inmersión con 2-fenoxietanol en el agua (0,075%) y luego se tomaron muestras de sangre de la vena caudal utilizando jeringas y agujas heparinizadas (25G) en un tiempo menor a 3 min. para evitar los cambios hormonales por efecto de la manipulación (Fox et al., 1997; Pottinger and Moran, 1993). Posteriormente, cada muestra se centrifugó a 7000 rpm durante 10 min., y el plasma fue almacenado a -20 °C hasta el momento del ensayo. Las hormonas esteroides fueron triplemente extraídas del plasma (110 µl por muestra) utilizando hexano:acetato de etilo (90:10) (440 µl por muestra), se evaporaron en un baño de agua a 40 °C y se reconstituyeron con el buffer proporcionado por el kit. Se utilizaron muestras estándar de concentraciones conocidas que se procesaron utilizando el mismo protocolo de extracción aplicada a muestras de plasma de los peces para calcular el porcentaje de recuperación (95%). Las concentraciones hormonales de las muestras se ajustaron teniendo en cuenta el porcentaje de recuperación calculado en el ensayo. Todas las muestras se analizaron por duplicado utilizando una placa de 96 pocillos (siguiendo las instrucciones del fabricante) y leídas en un espectrofotómetro a 412 nm (Varioskan Flash, Thermo Scientific). La especificidad del kit está descrita por el fabricante en el manual de instrucciones del kit. Los límites de detección para el ensayo fueron 1,4 pg / ml, y la variación intra-ensayo fue de 10%.

La cuantificación de 11-KT se realizó en machos dominantes y aislados para evaluar el rol del 11-KT en la ATNR y en machos GDX para evaluar la eficacia de la castración.

Análisis estadístico

Todos los datos comportamentales, eléctricos y hormonales se analizaron con pruebas no paramétricas: prueba pareada de Wilcoxon para muestras pareadas (para variables del mismo pez o de contendientes en una día), prueba U de Mann-Whitney (para grupos independientes), y análisis de varianza de Kruskal Wallis (para el análisis de datos provenientes de 3 grupos independientes o más). Por esta razón, los datos se expresan como mediana \pm desviación absoluta de la media (MAD). Utilizamos pruebas de Fisher para evaluar cambios en el resultado de la contienda en los grupos experimentales. En la prueba de Fisher, la hipótesis nula es que los peces grandes ganan la contienda, mientras que la hipótesis alternativa es que los peces grandes no ganan la contienda (incluyendo no sólo las contiendas ganadas por los peces chicos, sino también a las contiendas sin resolver). Para estudiar la relación entre el peso corporal y los niveles de 11-KT se realizó una regresión lineal.

Capítulo 1: Agresión territorial no reproductiva entre machos

Objetivos generales:

- Explorar los posibles mediadores hormonales esteroideos de la ATNR entre machos de *G. omarorum*.
- Evaluar si las hormonas esteroides gonadales son necesarias para la ATNR entre machos de *G. omarorum*.

Objetivos Específicos:

- i) Evaluar la conducta agonística no reproductiva entre machos de *G. omarorum* y su correlación con la 11-KT.
- ii) Evaluar la acción de inhibidores de la enzima aromatasa sobre contiendas diádicas entre machos de *G. omarorum*.
- iii) Evaluar la persistencia de la ATNR luego de la resección quirúrgica de los testículos.

Materiales y métodos específicos

Los resultados presentados en este capítulo provienen de tres cuerpos de datos: a) experimentos conductuales; b) mediciones hormonales, ambos realizados *ad hoc* para poner a prueba la hipótesis de esta tesis; y c) datos conductuales de archivo previamente publicados (Batista et al 2012) que se utilizaron para realizar un análisis de la influencia del sexo en los diferentes parámetros de la contienda y para contrastar con los resultados obtenidos en a).

Caracterización de la conducta agonística entre machos y evaluación de posible correlación con niveles de 11-KT

Para caracterizar la conducta agonística no reproductiva macho-macho de la especie se realizaron experimentos conductuales con machos previamente sexados. Para ello, las díadas macho-macho ($n = 6$) fueron sometidas a enfrentamientos agonísticos utilizando el protocolo de compuerta y se procedió al análisis de los despliegues locomotores y eléctricos de acuerdo con los detalles metodológicos presentados en el capítulo de materiales y métodos generales. Posteriormente, para evaluar si el sexado afecta el comportamiento agonístico, se compararon las contiendas macho-macho de individuos sexados antes del encuentro frente a las contiendas macho-macho en individuos intactos previamente realizadas por el grupo de trabajo.

Por último, para estudiar la existencia de una correlación entre los niveles de 11-KT y la dominancia, la tasa de ataques del dominante y el peso de los individuos, se realizaron mediciones hormonales de 11-KT plasmática en machos dominantes (muestras obtenidas 1 hora después de la interacción agonística) y en machos aislados (muestras obtenidas luego de 2 semanas sin interacción). Las muestras fueron procesadas de acuerdo con los detalles metodológicos presentados en el capítulo de materiales y métodos generales. Los marcos temporales en los que se realizaron las mediciones hormonales fueron diseñados tomando en cuenta a lo reportado en otras especies de teleósteos. Debido a que los dominantes de una interacción presentan un pico de aumento en los niveles de 11-KT entre 30 min. y 2 h. después del encuentro agonístico (Oliveira et al., 2001) y que frente al aislamiento social los individuos manifiestan un descenso en los niveles de andrógenos (T y 11-KT) (Oliveira et al., 1996), consideramos estos extremos con el fin de hacer más posible encontrar diferencias entre los grupos.

Resultados

Caracterización de la conducta agonística entre machos

Todas las díadas macho-macho (sexadas previamente al encuentro) exhibieron interacciones agonísticas que resultaron en el establecimiento de relaciones de dominancia y subordinación estables: los peces más grandes resultaron dominantes en 5 de 6 contiendas. Los conflictos registrados exhibieron las tres fases características del encuentro agonístico (fig. 4): (1) una fase de pre-conflicto (latencia al primer ataque = $25 \pm 21,5$ s); (2) una fase de contienda (duración del conflicto = 113 ± 52 s), caracterizado por el despliegue de comportamientos agresivos por ambos contendientes, y la emisión de la primera señal eléctrica de sumisión (off); y (3) una fase de post-resolución, que se caracteriza por comportamientos agresivos desplegados únicamente por dominantes y la emisión de los dos tipos de SES (chirps y offs) por los subordinados.

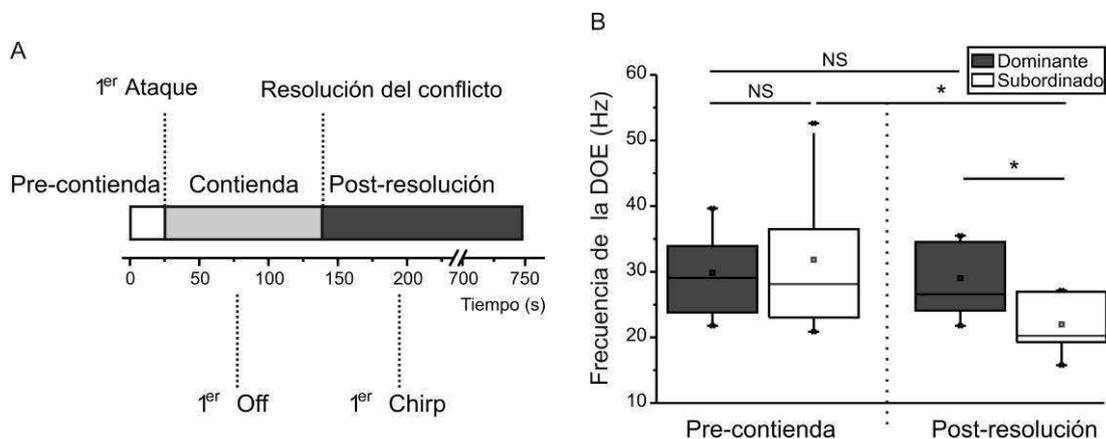


Figura 4: Conducta agonística macho-macho. A. Estructura temporal de encuentros agonísticos en *G. omarorum*. Se muestran las medianas de las duraciones de las fases (expresadas en segundos) relacionadas con la aparición de las señales eléctricas de subordinación. B. Diagrama de caja de la frecuencia de la DOE para dominantes y subordinados (en las fases del conflicto). En la post-resolución los subordinados (blanco) disminuyen significativamente la frecuencia de la DOE respecto a sí mismos en la pre-contienda y respecto a los dominantes (gris) en la post-resolución. * $p < 0,05$, NS = no significativo, test pareado de Wilcoxon, $n = 6$.

Después de la resolución, no se observó una reversión de la relación de dominancia, y se estableció el estatus de jerarquía de la DOE entre dominantes y subordinados. Como se muestra en la fig. 4, en la fase de pre-conflicto la frecuencia basal de la DOE de ambos contendientes no eran significativamente distintas (test pareado de Wilcoxon, $n = 6$, $p = 0,3$), mientras que en la post-resolución la frecuencia basal de la DOE de los subordinados fue significativamente menor que la de los dominantes (test pareado de Wilcoxon, $n = 6$, $p = 0,03$). Los peces subordinados disminuyeron significativamente su frecuencia basal de la DOE después de la contienda (test pareado de Wilcoxon, $n = 6$, $p = 0,046$), mientras que los dominantes no mostraron diferencias significativas en la frecuencia basal de la DOE entre la pre y post contienda (test pareado de Wilcoxon, $n = 6$, $p = 0,56$). Por otra parte, se realizó la comparación de las contiendas macho-macho intacto frente a macho-macho previamente sexados. Como se muestra en la fig. 5, en las contiendas macho-macho de individuos previamente sexados al igual que en las contiendas macho-macho de individuos intactos, el pez de mayor tamaño fue el individuo que resultó dominante de la contienda en el 83,3% de los encuentros (prueba Fisher, $p = 0,77$). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en la latencia al primer ataque (test de Mann-Whitney U, $n = 6$, $p = 0,94$) y la duración del conflicto (test de Mann-Whitney U, $n = 6$, $p = 0,94$) (fig. 5), ni en la tasa de ataques de dominantes (test de Mann-Whitney U, $n = 6$, $p = 0,94$) y subordinados (test de Mann-Whitney U, $n = 6$, $p = 0,48$) (fig. 5).

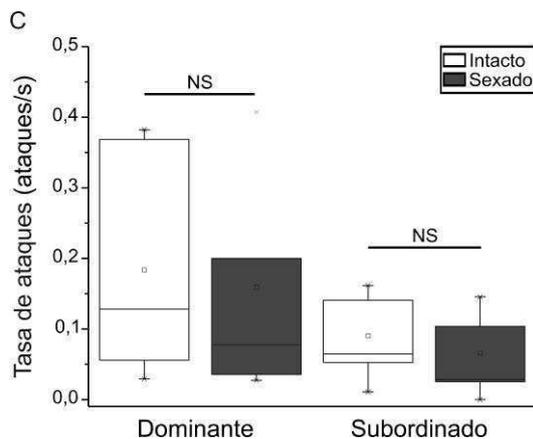
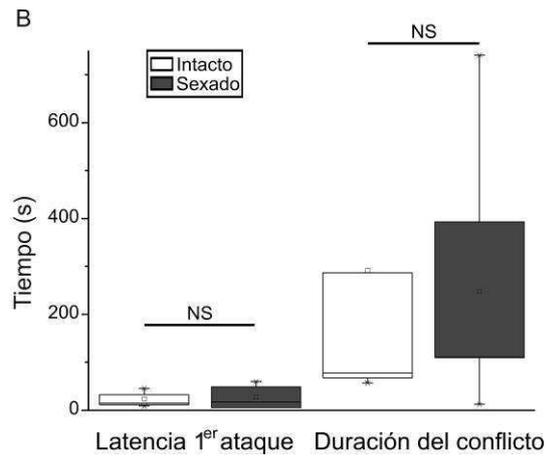
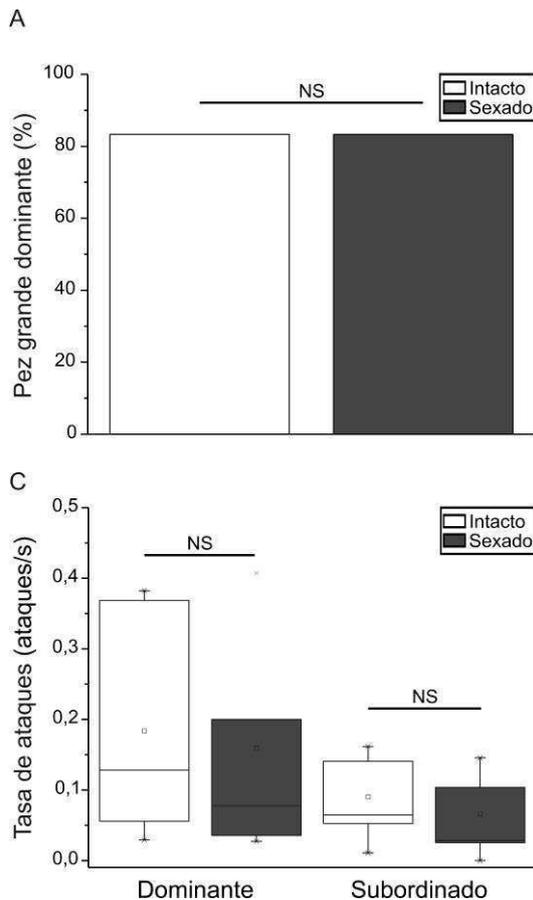


Figura 5: La conducta agonística de machos intactos no es distinta de la de sexados. A. Resultado de la contienda: porcentaje de contiendas en las que el pez grande resulta dominante de la día en ambos grupos, machos intactos (blanco), machos sexados (gris) NS=no significativo, prueba de Fisher, $n = 6$. B. Representación en diagrama de caja de la duración del conflicto y la latencia al primer ataque en ambos grupos, y C. Niveles de agresividad de las interacciones agonísticas. Representación en diagrama de caja de la tasa de ataques de dominantes y subordinados en ambos grupos. NS=no significativo, Mann-Whitney U test, $n = 6$.

Correlación de la conducta con los niveles de 11-KT

Los machos dominantes de *G. omarorum* luego del encuentro agonístico mostraron niveles plasmáticos de 11-KT bajos aunque variables y sin diferencias significativas respecto a los de machos aislados (test de Mann-Whitney U, $n = 5$, $p = 0,31$) (fig. 6). Es interesante destacar que no se observó correlación significativa entre los niveles de agresión y los de 11-KT, ya que valores muy variables de la tasa de ataques de los dominantes (de 0,036 a 0,20) exhibieron valores similares de 11-KT (de 63 a 82 pg/ml). Por otra parte, no se encontró correlación entre los niveles plasmáticos de 11-KT y el peso de los individuos ($n = 10$, $p = 0,34$, fig. 6).

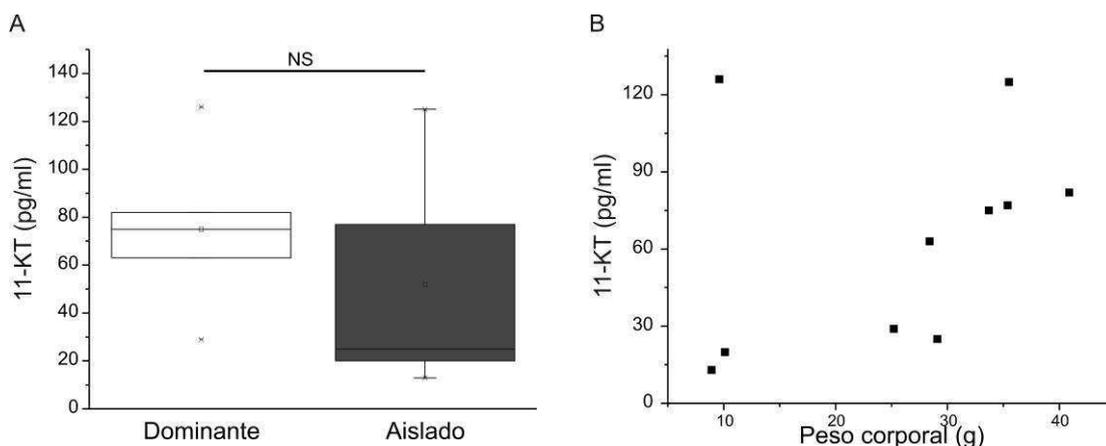


Figura 6: Niveles plasmáticos de 11-KT según el contexto social y la condición corporal. A. Representación en diagrama de caja de los niveles de 11-KT en machos sin interacción social (gris) y machos que resultan dominantes en una contienda (blanco) durante el periodo no reproductivo. NS = no significativo, test U de Mann-Whitney, $n = 5$. B. Correlación de los niveles plasmáticos de 11-KT y el peso de los individuos. Regresión lineal, $R^2 = 0,0042$, $p = 0,34$, no significativo, $n = 10$.

Discusión

Gymnotus omarorum pertenece a un género de peces eléctricos sudamericanos de descarga débil que viven en agua dulce y son altamente agresivos (Black-Cleworth, 1970). Cualquier tipo de comportamiento social en los peces eléctricos de descarga débil incluye despliegues eléctricos y locomotores distintivos. *G. omarorum* presenta intensa ATNR en diadas intra e inter-sexuales, donde podemos identificar con precisión las fases del encuentro agonístico, la emergencia de un estatus de dominancia y subordinación, niveles de agresión y una secuencia ordenada de SES de sumisión (Batista et al., 2012; Silva et al., 2013; Zubizarreta et al., 2012; Zubizarreta et al., 2015). Los resultados obtenidos en el cuadro 1 indican que la conducta agonística desplegada en las contiendas territoriales de *G. omarorum* no está sesgada por el sexo de los contendientes.

El abordaje de los mecanismos neuroendócrinos de la modulación de la conducta agonística impone restringir el estudio de sus mecanismos subyacentes de forma separada por sexo ya que está reportado que los efectos de las hormonas sobre la agresión difieren entre sexos y contextos endócrinos. De la misma forma, un mismo comportamiento puede estar modulado de forma diferencial dependiendo de la época

del año, el estadio de la vida y el escenario fisiológico de los individuos (Nelson, 2006). En este estudio nos enfocamos en la conducta agonística macho-macho y sus mecanismos neuroendócrinos, y en primer lugar caracterizamos la conducta agonística. Cuando nos enfocamos en la agresión entre machos, encontramos que todas las díadas macho-macho testeadas ($n = 6$) presentaron una dinámica de contienda (fig. 4) similar a la reportada previamente en esta especie en díadas intra e inter-sexuales (Batista et al., 2012). Los encuentros entre machos exhiben las mismas características en el comportamiento agonístico (estructura del encuentro, dinámica de contienda, niveles de agresión, sumisión eléctrica) a las descritas anteriormente por Batista et al., 2012. En las díadas macho-macho, después de la resolución del conflicto no se observó una reversión de la relación de dominancia, y se estableció estatus de jerarquía de la DOE entre dominantes y subordinados (Fig. 4), como se observó previamente en esta especie en díadas intra e inter-sexuales (Batista et al., 2012; Perrone, 2012; Silva et al., 2013). Por otra parte, las díadas que fueron sexadas previo al encuentro no presentaron diferencias significativas en la latencia al primer ataque, duración del conflicto, tasas de ataques de dominantes y subordinados en comparación con díadas de machos intactos. Asimismo, en las contiendas macho-macho de individuos sexados previamente, al igual que en las contiendas macho-macho de individuos intactos, el pez de mayor tamaño fue el individuo que resultó dominante del encuentro en la mayoría de los encuentros. De esta forma, en las díadas entre machos sexados previo al encuentro resulta posible predecir la dominancia de una díada por asimetrías de tamaño cuando los individuos tienen una diferencia de peso mayor al 5% como fue demostrado previamente por (Batista et al., 2012). El haber encontrado que no existen diferencias significativas en los parámetros conductuales entre las díadas de machos intactos y las díadas de machos sexados previo al encuentro, indica que el protocolo de sexado, que implica cirugía y recuperación, no influye sobre la conducta agonística de *G. omarorum*. Este resultado avala la utilización de cirugía de sexado previo al encuentro con el fin de identificar el sexo de los individuos y de esta forma, poder elegir el sexo de los contendientes. Esto resulta particularmente importante cuando nos encontramos ante la necesidad de trabajar con un sexo, en la búsqueda de los mecanismos neuroendócrinos, y en particular las vías esteroideas, que subyacen la conducta agonística.

El comportamiento agresivo entre machos se ha estudiado tradicionalmente durante el período reproductivo, donde ha sido ampliamente relacionado con niveles plasmáticos altos de andrógenos en todas las clases de vertebrados. La 11-KT es el principal andrógeno bioactivo en teleósteos y se ha reportado anteriormente como la principal hormona esteroidea promotora de la agresión en contextos reproductivos ya que correlaciona positivamente con el estatus de dominancia (Morandini et al., 2014; Oliveira et al., 1996; Parikh et al., 2006; Ramallo et al., 2014). Sin embargo, la ATNR en *G. omarorum* no se asoció a un aumento en los niveles de 11-KT circulantes, lo que indica que el andrógeno sexual endógeno más importante en teleósteos no parece estar involucrado en la regulación de la agresión de *G. omarorum* fuera del periodo reproductivo. Nuestros datos muestran que los niveles de andrógenos basales a posteriori de las contiendas no muestran diferencias significativas de aquellos de animales aislados, a diferencia de lo reportado en otras especies de teleósteos donde las interacciones agonísticas en el período reproductivo producen un aumento en los niveles circulantes de 11-KT (Oliveira et al., 2001), fenómeno que aumenta la probabilidad de resultar dominante en un siguiente encuentro frente a otro oponente (Oliveira et al. 2009) lo que tiene un valor adaptativo en el mantenimiento de una elevada motivación agresiva frente a un ambiente con potenciales desafíos sociales (Wingfield et al., 1990). Asimismo, ni la territorialidad (los despliegues locomotores de dominancia) ni el estatus obtenido correlacionan con los valores de los niveles hormonales. Los niveles plasmáticos de 11-KT de machos dominantes fueron variables, aunque bajos, exhibiendo valores similares a los reportados durante el período no reproductivo en estudios preliminares en esta especie (Batista 2011), en la especie simpátrica de peces eléctricos de descarga débil *Brachyhypopomus gauderio* (Dunlap et al., 2011) y en los peces de arrecife de coral, *Stegastes nigricans* (Vullioud et al., 2013). Asimismo, los resultados aquí obtenidos, son consistentes con los encontrados en aves que despliegan agresión no reproductiva con bajos niveles de andrógenos circulantes (Wingfield and Hahn, 1994) y sugieren que la agresión en *G. omarorum* es independiente de los niveles plasmáticos de 11-KT.

Cuadro 1. La elección de la agresión inter-sexual masculina como modelo etológico

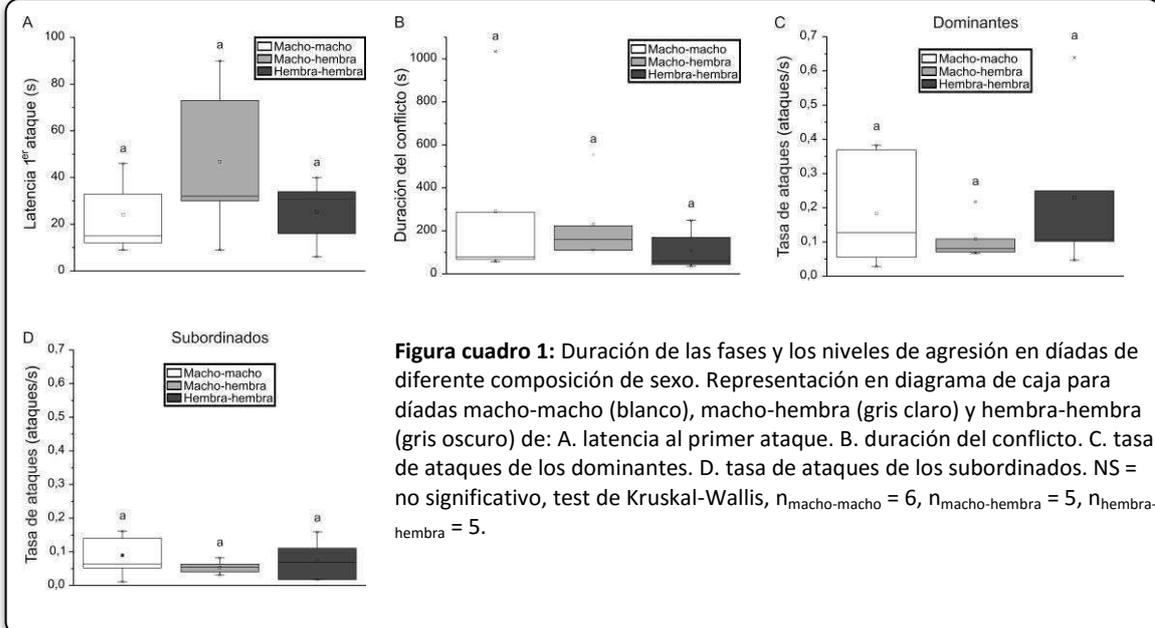
La conducta agonística surge como respuesta a situaciones de conflicto entre individuos de la misma especie mediando el acceso a un recurso en contienda. Se han utilizado modelos matemáticos adaptados de la teoría de juegos, que consideran los costos y beneficios asociados a la lucha, para entender los factores que determinan la resolución de los conflictos animales (Maynard Smith, 1974). Durante las luchas, los individuos realizan evaluaciones de la relación costo-beneficio por el recurso en contienda. De esta forma, las asimetrías en la capacidad de lucha y el valor del recurso determinan que el individuo con la menor relación entre estos parámetros se retirará y su contendiente resultará el ganador del combate (Dugatkin and Ohlsen, 1990; Dugatkin and Biederman, 1991; Parker and Rubenstein, 1981). En especies sexualmente monomórficas, la capacidad de lucha entre machos y hembras no debería ser asimétrica ya que depende directamente del tamaño corporal, de las reservas energéticas y/o tamaño del armamento (ej.: ornamentos) (Smith and Parker, 1976). Asimismo, cuando además no hay asimetrías entre sexos en el valor asignado al recurso, se predice que no habrá dimorfismo sexual en la conducta agonística (Clutton-Brock, 1989). Esto es difícil de demostrar en período reproductivo, aún en ausencia de dimorfismo sexual, dado que es imposible asumir que en ese momento las motivaciones de ambos sexos sean simétricas.

Gymnotus omarorum presenta agresión territorial durante todo el año (Silva et al 2013). Como es una especie sexualmente monomórfica, es esperable que no presente diferencias en la capacidad de lucha entre sexos. Fuera del período reproductivo, además, es predecible que el valor del recurso sea simétrico para ambos sexos. En este sentido, el protocolo experimental utilizado garantiza que no existan diferencias en el valor del recurso en contienda en cuanto a territorio y residencia, ya que los individuos son colocados simultáneamente en territorios de igual tamaño constituidos por un volumen agua sin acceso a alimento ni refugios. Este ventajoso modelo etológico permitió probar que *G. omarorum* exhibe intensa agresión en diadas macho-macho, macho-hembra y hembra-hembra; y que el resultado de la contienda no presenta diferencias entre sexos. Esto fue demostrado por Batista et al., 2012, quienes mostraron que ni el sexo de los individuos, ni la composición sexual de la diada son predictores del resultado de la contienda, siendo la asimetría en el tamaño corporal la única variable

predictora. Aun así, podría haber un sesgo por sexo en la inversión energética que realizan los individuos en la contienda, lo cual podría estar reflejado en diferencias en la motivación y dinámica de la contienda y en los niveles de agresión según la composición de la diada. En este estudio, se compararon datos de archivo de contiendas macho-macho, macho-hembra y hembra-hembra para explorar posibles diferencias en los parámetros conductuales que caracterizan la motivación y dinámica de la contienda (latencia al primer ataque, duración del conflicto, tasa de ataques del subordinado, tasa de ataques del dominante).

Con el fin de evaluar los efectos de la composición por sexo de la diada sobre la conducta agonística, se realizó un análisis en diadas intra e inter-sexuales (con datos disponibles en un banco de archivos). Se utilizaron datos conductuales de encuentros agonísticos entre individuos intactos (sexo identificado post mortem) de la base de datos del grupo de trabajo y previamente publicados con otros fines (Batista et al, 2012). Se seleccionaron 16 diadas en las que el peso individual se ubicara en el rango 8-45 gr y con diferencias de peso intra-diada en el rango 5-20%: macho-macho (n = 6), macho-hembra (n = 5), hembra-hembra (n = 5). Los encuentros agonísticos en individuos intactos fueron realizados bajo el mismo protocolo de compuerta utilizado en la presente tesis. Los parámetros conductuales analizados fueron: latencia al primer ataque, duración del conflicto, tasa de ataques del subordinado, tasa de ataques del dominante.

Como se muestra en la fig. cuadro 1, las diadas macho-macho, diadas hembra-hembra, y diadas hembra-macho no presentaron diferencias significativas en los parámetros conductuales evaluados: latencia al primer ataque (test Kruskal-Wallis, $n_{\text{macho-macho}} = 6$, $n_{\text{macho-hembra}} = 5$, $n_{\text{hembra-hembra}} = 5$, $p = 0,6$), duración del conflicto (test Kruskal-Wallis, $n_{\text{macho-macho}} = 6$, $n_{\text{macho-hembra}} = 5$, $n_{\text{hembra-hembra}} = 5$, $p = 0,36$), tasa de ataques de los dominantes (test Kruskal-Wallis, $n_{\text{macho-macho}} = 6$, $n_{\text{macho-hembra}} = 5$, $n_{\text{hembra-hembra}} = 5$, $p = 0,76$), tasa de ataques de los subordinados (test Kruskal-Wallis, $n_{\text{macho-macho}} = 6$, $n_{\text{macho-hembra}} = 5$, $n_{\text{hembra-hembra}} = 5$, $p = 0,63$).



La agresión territorial de *G. omarorum* constituye un claro ejemplo de agresión territorial no sesgada por sexo. Como fuera demostrado previamente, el sexo de los individuos no influye en el resultado de la contienda (Batista et al 2012). En este estudio se suma la confirmación de que la motivación y los niveles de agresión exhibidos por los contendientes en las luchas no dependen de la composición por sexo de las díadas. El análisis de la conducta agonística nos da información acerca de las tomas de decisión de los contendientes. La latencia al primer ataque, que refleja el tiempo de evaluación necesario y la motivación que sustenta la opción de comenzar la fase de injuria física, exhibió valores similares en díadas macho-macho, macho-hembra y hembra-hembra. Tampoco se encontraron diferencias según la composición de la díada en la duración de la contienda, parámetro que está determinado por el animal cuyos costos exceden los beneficios y decide mostrar subordinación al rendir el recurso en disputa. Finalmente, los niveles de agresión, que se ha demostrado dependen de los niveles de agresión del contendiente en la escalada de la fase de conflicto (Zubizarreta et al., 2015), no presentan diferencias significativas ni en dominantes ni en subordinados entre las díadas de diferente composición. Los resultados obtenidos en este cuadro indican que en condiciones de experiencia previa similar y fuera de contexto reproductivo, la latencia al primer ataque, la dinámica de la contienda y los niveles de agresión de las contiendas territoriales no están sesgados por el sexo de los peces.

Aunque machos y hembras pueden exhibir patrones comportamentales similares, los mecanismos (endócrinos y neurales) subyacentes al control del comportamiento son distintos entre sexos (Earley and Hsu, 2013). Esto impone restringir el estudio de los mecanismos neuroendócrinos de la conducta agonística a un solo sexo. Las contiendas territoriales inter-sexuales son frecuentes, sin embargo, el estudio de sus mecanismos neuroendócrinos resulta complejo dadas las asimetrías en la fisiología de los contendientes. Por otra parte, la agresión entre hembras, documentada en forma cada vez más frecuente, abre escenarios neuroendócrinos novedosos y el estudio de su modulación en esta especie está actualmente en curso. Por último, la agresión macho-macho ofrece un escenario tradicional en el estudio de sus mecanismos neuroendócrinos. Dado que en la agresión intrasexual masculina se encuentran la mayoría de los antecedentes en teleósteos, y luego de haber demostrado que no es comportamentalmente diferente de la agresión intersexual ni intrasexual femenina, el trabajo experimental de esta tesis se ha centrado en la agresión territorial no reproductiva macho-macho de *G. omarorum*.

Capítulo 2: Modulación de la actividad aromatasa

Objetivos generales:

- Explorar los posibles mediadores hormonales esteroideos de la ATNR entre machos de *G. omarorum*.
- Evaluar si las hormonas esteroideas gonadales son necesarias para la ATNR entre machos de *G. omarorum*.

Objetivos Específicos:

- i) Evaluar la conducta agonística no reproductiva entre machos de *G. omarorum* y su correlación con la 11-KT.
- ii) Evaluar la acción de inhibidores de la enzima aromatasa sobre contiendas diádicas entre machos de *G. omarorum*.
- iii) Evaluar la persistencia de la ATNR luego de la resección quirúrgica de los testículos.

Materiales y métodos específicos

Modulación farmacológica

Para analizar las bases neuroendócrinas de la ATNR de *G. omarorum* se evaluó la modulación de la vía estrogénica, mediante el uso de un inhibidor de la enzima aromatasa, fadrozole (FAD), en diadas macho-macho antes de someterlos al mismo protocolo de comportamiento descrito anteriormente. FAD es un inhibidor efectivo de la actividad de la aromatasa (enzima que cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos) en peces teleósteos y otros vertebrados (Gonçalves et al., 2007; Huffman et al., 2013; Wade et al., 1994). Teniendo como referencia el protocolo validado en

cilcidos por (Huffman et al., 2013), el FAD (SIGMA, código, F3806), fue preparado en una solución madre de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en etanol absoluto y posteriormente almacenada a -20 °C. El día antes del experimento, la solución de FAD se diluyó en PBS y se almacenó a 4 °C. Una hora antes del encuentro agonístico, se administró FAD por vía intraperitoneal (20 $\mu\text{g}/\text{gramos}$ de peso corporal) al potencial dominante (el macho más pesado de la díada), mientras que el potencial subordinado recibió solución salina (mismo volumen que FAD, IP). Como grupo control, se utilizaron díadas en el que ambos individuos fueron inyectados IP con solución salina. Los experimentos conductuales de FAD y control se realizaron simultáneamente.

Para evaluar si el FAD produce efectos sobre la locomoción se calculó el índice de movimiento. Para ello se midió la relación del tiempo en movimiento y el tiempo inmóvil para los individuos tratados con FAD y los inyectados con salino de una misma díada antes del encuentro. Las mediciones se tomaron 5 mín. después del anochecer durante 5 mín. (hasta la apertura de la compuerta).

Resultados

Como se muestra en la fig. 7, la administración de FAD al potencial dominante 1 h antes del encuentro alteró el resultado de la contienda. Mientras que en 6 de 8 díadas control el pez grande tratado con solución salina resultó dominante, esto sucedió en sólo en 2 de 8 díadas FAD, (prueba de Fisher, $p = 0,06$). En las restantes 6 díadas las contiendas resultaron no resueltas (3 casos) o con el animal más pequeño como dominante (3 casos) (tabla1).

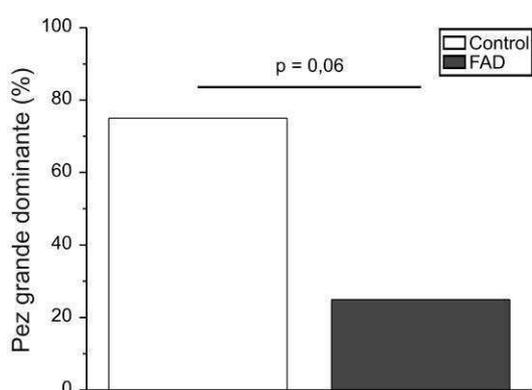


Figura 7: Efectos del FAD sobre el resultado de la contienda. El pez tratado con FAD (gris) resulta dominante en un porcentaje menor de los encuentros respecto a los controles (blanco). $p = 0,06$, prueba de Fisher, $n = 8$.

Tabla 1: Efectos del FAD sobre el resultado de la contienda.

	Total de días	Pez grande dominante	Pez chico dominante	No resuelve	Peso predice dominancia
Control	8	6	1	1	6/8
FAD	8	2	3	3	2/8

La administración de FAD también disminuyó la tasa de ataques de los peces grandes tratados en comparación a los controles (test de Mann-Whitney U, $n = 8$, $p = 0,048$, fig. 8), pero no tuvo efecto sobre la tasa de ataques del pez chico (test de Mann-Whitney U, $n = 8$, $p = 0,87$), en la latencia al primer ataque (test de Mann-Whitney U, $n = 8$, $p = 0,74$, fig. 9), o en la duración del conflicto (test de Mann-Whitney U, $n = 8$, $p = 0,39$).

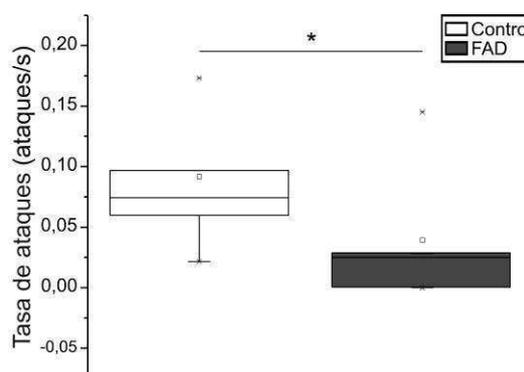


Figura 8: Efectos del FAD sobre los niveles de agresión de las interacciones agonísticas. Representación en diagrama de caja de la tasa de ataques de los animales tratados con FAD (gris) en encuentros diádicos en comparación a los tratados con salino en días de control (blanco). Los peces tratados con FAD (gris) disminuyen significativamente los ataques respecto a los controles * $p < 0,05$, Mann-Whitney U test, $n = 8$.

Por otra parte, la administración de FAD no tuvo ningún efecto sobre la locomoción (test de Mann-Whitney U, $n = 8$, $p = 0,4$, fig. 9), ni sobre la iniciativa al primer ataque (prueba de Fisher, $p = 0,64$, fig. 9)

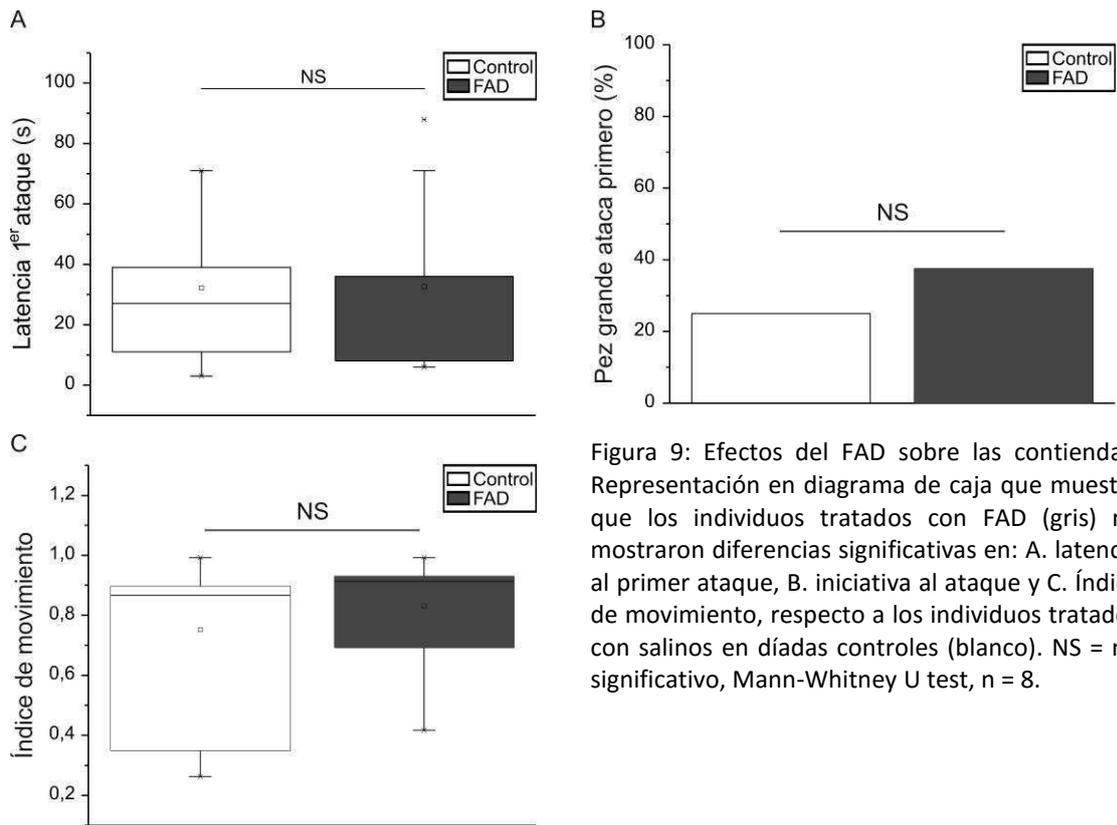


Figura 9: Efectos del FAD sobre las contiendas. Representación en diagrama de caja que muestra que los individuos tratados con FAD (gris) no mostraron diferencias significativas en: A. latencia al primer ataque, B. iniciativa al ataque y C. Índice de movimiento, respecto a los individuos tratados con salinos en días de controles (blanco). NS = no significativo, Mann-Whitney U test, n = 8.

Discusión

Los mecanismos que modulan la agresión durante el período no reproductivo se han abordado principalmente en aves y mamíferos, donde los estrógenos juegan claramente un papel modulador clave (revisado en (Heimovics et al., 2013; Soma et al., 2008; Trainor and Nelson, 2012)). La dependencia de la ATNR de los estrógenos se probó realizando tratamientos crónicos con inhibidores de la aromatasa en aves silvestres, lo cual disminuía la agresión en pocos días, efecto que era revertido por el reemplazo con E2 (Soma et al., 2000b). Estudios adicionales han sugerido que este efecto puede darse apenas transcurridas 24 del tratamiento (Soma et al., 2000a). Por otra parte, los antecedentes de la modulación estrogénica de la agresión en peces se restringen exclusivamente al período reproductivo donde encontramos algunos

antecedentes que coincidan con lo encontrado en este trabajo. En *A. burtoni*, los estrógenos regulan la agresión reproductiva entre machos (Huffman et al., 2013; O'Connell and Hofmann, 2012), mientras que en la agresión no reproductiva no se encuentran antecedentes. Los resultados obtenidos en este capítulo, mostrando que la inhibición de la aromatasa produjo importantes efectos los encuentros agonísticos diádicos en machos de *G. omarorum*, constituyen la primera evidencia de un papel crítico de la vía estrogénica en la ATNR en peces teleósteos. En este sentido, FAD produjo una distorsión del comportamiento agonístico y la dominancia ya no pudo predecirse por asimetrías en el tamaño (fig 7), a diferencia de lo reportado en la caracterización de la conducta en individuos intactos de la especie (Batista et al., 2012). La inhibición de la aromatasa también produjo una disminución significativa en los niveles de agresión en los individuos tratados (fig. 8), lo que puede estar directamente relacionado a la afectación del resultado de la contienda. Estos resultados coinciden con los encontrados en *A. burtoni*, donde los machos tratados con FAD también disminuyen los ataques contra sus contendientes, aunque en un contexto reproductivo (Huffman et al., 2013). Si bien algunos trabajos plantean que resulta improbable que los principales efectos de los andrógenos en el comportamiento agresivo de peces reproductivos dependan de la aromatización de T por la fuerte evidencia que relaciona la acción directa de la T con la agresión (Gonçalves and Oliveira, 2010) este es un tema que se encuentra en debate. Además, la acción de los andrógenos y estrógenos sobre la modulación de la agresión reproductiva entre machos de teleósteos presenta algunos resultados contradictorios en distintas especies. Por un lado, en *A. burtoni* los niveles de agresión correlacionan con la expresión de aromatasa cerebral y la inhibición de esta enzima disminuye la agresión (Huffman et al., 2013) y el bloqueo de los RA no tiene efecto en la agresión, mientras que ésta se ve disminuida por antagonistas de RE (O'Connell and Hofmann 2012). Por otra parte, en *Amatitlana Nigrofasciata* el bloqueo de los RA, pero no el de los RE, disminuye la agresión (Sessa et al., 2013) siempre en contexto reproductivo. Los resultados de esta tesis confirman una inhibición de la agresión no reproductiva producida por la disminución de la producción de estrógenos, resultado que concuerda con lo reportado en la modulación de la agresión no reproductiva en mamíferos y aves (Heimovics et al., 2013).

Es de notar que el bloqueo de la vía estrogénica no tuvo efecto sobre la locomoción o en aspectos vinculados al estado motivacional de los animales (como la iniciativa al ataque o la latencia al primer ataque). Estos resultados sugieren que el uso del inhibidor de la aromatasa no inhibe la actividad general y la motivación, sino que las vías estrogénicas están involucradas en la regulación de aspectos concretos del comportamiento agresivo, un comportamiento que sirve para múltiples funciones y que está regulado de una manera compleja (revisado en (Adkins-Regan, 2005)). Nuestros datos apoyan el supuesto de que en machos de *G. omarorum* la conversión de andrógenos a estrógenos es necesaria para la expresión completa de la conducta agresiva. Este avance hace muy interesante el estudio en hembras, que en peces normalmente tienen más E2 que en machos, abordaje que está actualmente en curso por el grupo de trabajo.

Los efectos de la inhibición de la aromatasa pueden tanto reducir la síntesis de estrógenos así como aumentar su sustrato androgénico. Aunque no podemos descartar que los efectos de la inhibición de la aromatasa sobre la conducta agresiva puedan estar dados por el aumento de los andrógenos, la literatura sugiere que es la disminución del estrógeno lo que causa la afección de la conducta agonística. Cuando la actividad de aromatasa es bloqueada con FAD en machos reproductivos de *A. burtoni*, los niveles de T aumentan y los niveles de E2 disminuyen (Huffman et al., 2013), pero manipulaciones de los RA no tienen efecto sobre la agresión mientras que el bloqueo de los RE disminuye la agresión (O'Connell y Hofmann, 2012). Los próximos estudios en *G. omarorum* estarán orientados a evaluar si los bloqueantes de RE o RA modulan la ATNR para determinar con mayor precisión la vía involucrada.

Existe clara evidencia de que las hormonas esteroides, además de su papel tradicional como ligandos para los factores de transcripción, pueden ejercer efectos rápidos no-genómicos. Estos últimos efectos están probablemente mediados, al menos en parte, por las acciones sobre los receptores unidos a la membrana plasmática (Wehling and Lösel, 2006) o por la modulación alostérica de receptores de neurotransmisores (Pinna et al., 2006). Se ha encontrado que los efectos no-genómicos del E2 sobre la conducta agresiva pueden ser más prominentes durante el período no reproductivo, mientras que los efectos genómicos del E2 sobre la agresión

pueden ser más importantes durante el período reproductivo (Heimovics et al., 2012; Heimovics et al., 2015; Trainor et al., 2007; Trainor et al., 2008). Los resultados observados en esta investigación mostraron un efecto muy significativo en el comportamiento agresivo de *G. omarorum* después de una hora de una sola administración de FAD. Esto sugiere que los mecanismos subyacentes pueden implicar mecanismos rápidos no-genómicos de señalización (Cornil and Charlier, 2010) más que una vía genómica. Los efectos rápidos no-genómicos de los estrógenos sobre la ATNR han sido reportados en mamíferos y aves (revisado en (Trainor and Nelson, 2012)). En machos de *M. melodia*, la inhibición aguda (24 h.) de la aromatasa disminuye la agresión (Soma et al., 2000b), mientras que la administración exógena de E2 la aumenta rápidamente (20 min.) (Heimovics et al., 2015). Estudios en *G. omarorum* para evaluar si E2 puede aumentar rápidamente la agresión en el período no reproductivo, y mediar la recuperación de los efectos del FAD, están actualmente en curso.

Capítulo 3: Agresión macho-macho y hormonas gonadales

Objetivos generales:

- Explorar los posibles mediadores hormonales esteroideos de la ATNR entre machos de *G. omarorum*.
- Evaluar si las hormonas esteroides gonadales son necesarias para la ATNR entre machos de *G. omarorum*.

Objetivos Específicos:

- i) Evaluar la conducta agonística no reproductiva entre machos de *G. omarorum* y su correlación con la 11-KT.
- ii) Evaluar la acción de inhibidores de la enzima aromatasa sobre contiendas diádicas entre machos de *G. omarorum*.
- iii) Evaluar la persistencia de la ATNR luego de la resección quirúrgica de los testículos.

Materiales y métodos específicos

Gonadectomía

Para identificar la fuente de hormonas esteroides involucradas en la ATNR se evaluó el comportamiento agonístico en ausencia de hormonas esteroides gonadales, en experimentos comportamentales en díadas de machos castrados. Los testículos fueron extraídos a través de una pequeña incisión lateral utilizando el procedimiento que se describe para la cirugía de sexado. El cuidado posquirúrgico también se realizó como se ha descrito más arriba. Para asegurarse de que los niveles de esteroides circulantes habían disminuido, en los encuentros diádicos se utilizaron machos

castrados al menos un mes después de la cirugía. Las contiendas diádicas en GDX (ambos contendientes castrados) se compararon con las contiendas en diádas SHAM (ambos contendientes con cirugía sin resección de gónadas). Los encuentros GDX y SHAM se realizaron simultáneamente. El éxito de la remoción de las gónadas fue confirmado mediante la cuantificación de los niveles plasmáticos de 11-KT en GDX frente a individuos SHAM mediante el procedimiento descrito en Materiales y métodos generales.

Resultados

Todas las diádas GDX exhibieron conducta agonística que resultó en el establecimiento de relaciones de dominancia-subordinación estables. Las diádas GDX no mostraron diferencias significativas en la dinámica de la contienda (locomotoras y eléctricas) (fig.10) con respecto a las diádas SHAM. La efectividad de la castración se confirmó ya que los niveles plasmáticos de 11-KT en machos GDX fueron significativamente más bajos que en los machos SHAM (test de Mann-Whitney U, $n_{GDX}=9$, $n_{SHAM}=10$, $p=0,002$), disminuyendo los niveles circulantes de 11-KT promedialmente en un 88% (fig. 11).

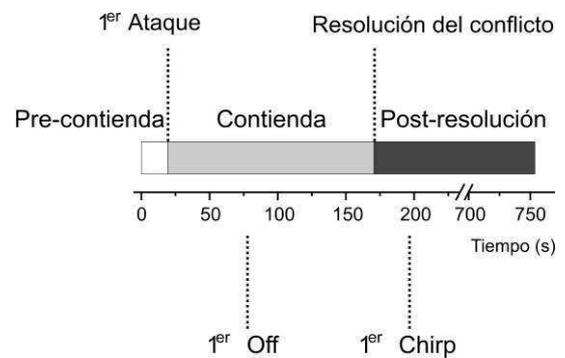


Figura 10: Se representa la sucesión de las diferentes fases en función del tiempo en segundos. La duración de cada una de las fases representa la mediana

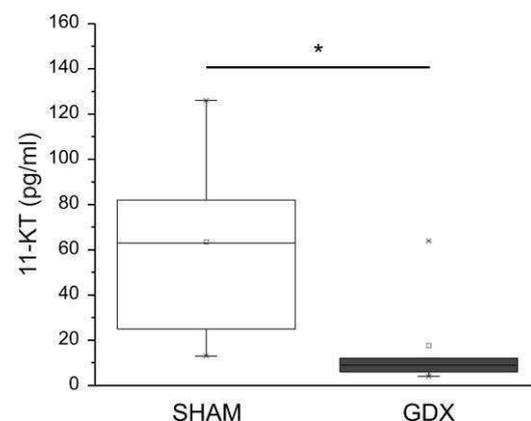


Figura 11: Efectividad de la gonadectomía evaluada por niveles androgénicos plasmáticos post quirúrgicos. Representación en diagrama de caja de los niveles de 11-KT que resultaron menores en machos gonadectomizados (GDX) respecto a los controles (SHAM). * $p < 0.05$, prueba U de Mann-Whitney, $n=5$.

Al igual que en las díadas SHAM, en las díadas GDX también se estableció estatus de jerarquía de la DOE entre dominantes y subordinados, es decir, los subordinados, pero no los dominantes disminuyeron su frecuencia basal de la DOE como una señal persistente de subordinación. Como se muestra en la fig. 12, el estatus de jerarquía de la DOE de peces dominantes y subordinados se cuantificó por el índice post-resolución de la DOE, que fue de alrededor de 0 en dominantes (lo que indica que los dominantes no cambiaron su frecuencia basal de la DOE en la post-resolución) y negativa para los subordinados (indicando que los subordinados disminuyeron su frecuencia basal de la DOE después de la resolución de la contienda). Tanto las díadas SHAM como las GDX mostraron el estatus de jerarquía de la DOE en post-resolución entre dominantes y subordinados (test de Mann-Whitney U, dominante_{SHAM} vs. subordinado_{SHAM}, n=6, p=0,041; dominante_{GDX} vs. subordinado_{GDX}, n=5, p=0,032). Por otra parte, el cambio de la frecuencia basal de la DOE en la post-resolución no fue diferente entre dominantes GDX y SHAM (test de Mann-Whitney U, n_{SHAM}=6, n_{GDX}= 5, p=0,5), o entre subordinados GDX y SHAM (test de Mann-Whitney U, n_{SHAM} = 6, n_{GDX} = 5, p = 0,18).

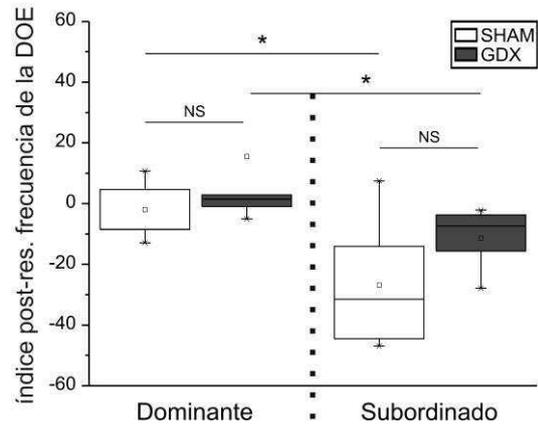


Figura 12: Establecimiento de jerarquía entre contendientes, señalizado por la frecuencia de la DOE en la post resolución. Los subordinados disminuyen la frecuencia descarga de la DOE respecto a los dominantes, * $p < 0,05$, prueba U de Mann-Whitney, n_{SHAM} = 6, n_{GDX} = 5, tanto en díadas SHAM (blanco) como gonadectomizadas (GDX, gris), NS = no significativo, test de Mann-Whitney U, n_{SHAM} = 6, n_{GDX} = 5.

Como se muestra en la fig. 13, la castración no afectó el resultado de la contienda. El pez más grande fue dominante en 5 de las 6 díadas SHAM y en 5 de las 5 díadas GDX (prueba de Fisher, $p = 0,34$). Del mismo modo, las díadas GDX no mostraron diferencias con las díadas SHAM en ninguno de los parámetros conductuales medidos: a) latencia al primer ataque (test de Mann-Whitney U, n_{SHAM}= 6, n_{GDX}= 5, p=0,79, fig. 13); b) duración del conflicto (test de Mann-Whitney U, n_{SHAM}=

6, $n_{\text{GDX}}=5$, $p=1$, fig. 13); c) tasa de ataques del pez grande (test de Mann-Whitney U, $n_{\text{SHAM}}=6$, $n_{\text{GDX}}=5$, $p=0,42$, fig. 13).; d) tasa de ataques del pez chico (test de Mann-Whitney U, $n_{\text{SHAM}}=6$, $n_{\text{GDX}}=5$, $p=0,54$, fig. 13); e) latencia al primer off (test de Mann-Whitney U, $n_{\text{SHAM}}=6$, $n_{\text{GDX}}=5$, $p=0,53$); f) tasa de offs conflicto (test de Mann-Whitney U, $n_{\text{SHAM}}=6$, $n_{\text{GDX}}=5$, $p=0,26$); y g) tasa de offs en la post-resolución (test de Mann-Whitney U, $n_{\text{SHAM}}=6$, $n_{\text{GDX}}=5$, $p=0,44$).

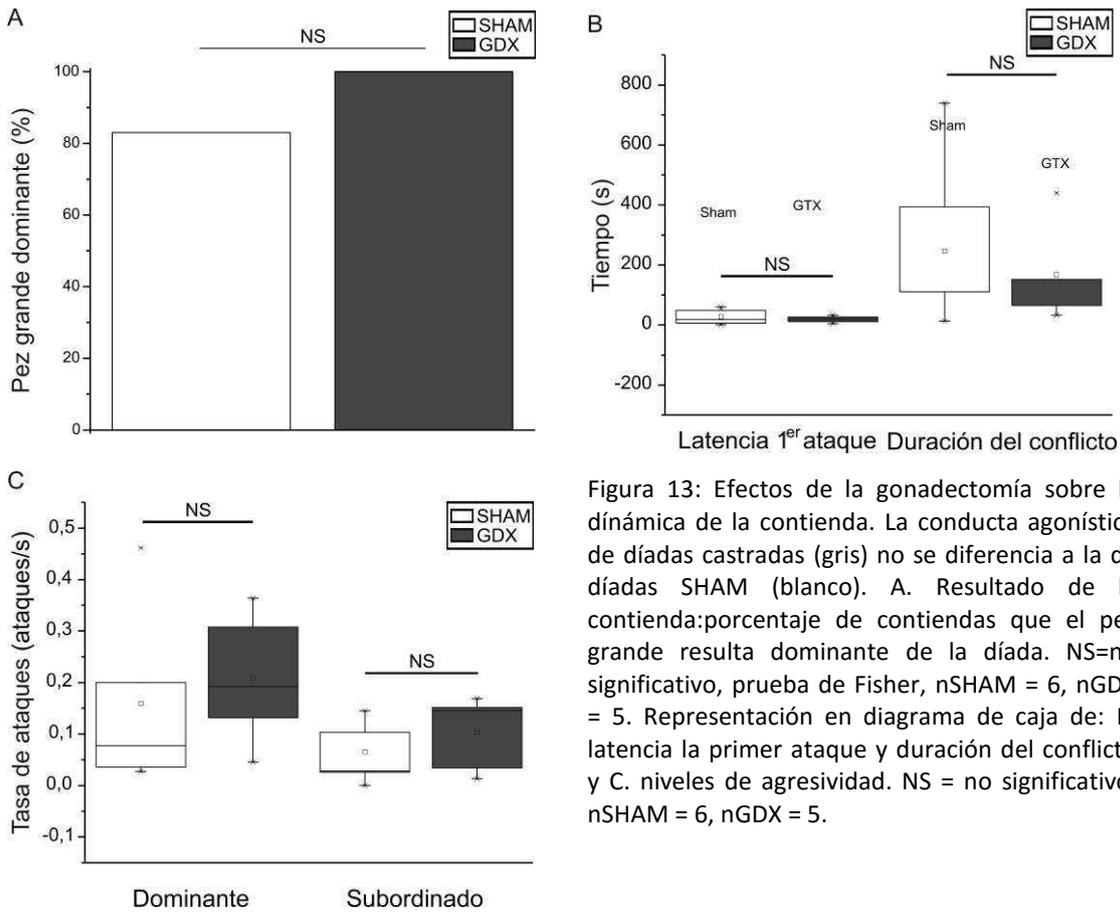


Figura 13: Efectos de la gonadectomía sobre la dinámica de la contienda. La conducta agonística de diadas castradas (gris) no se diferencia a la de diadas SHAM (blanco). A. Resultado de la contienda: porcentaje de contiendas que el pez grande resulta dominante de la diada. NS=no significativo, prueba de Fisher, $n_{\text{SHAM}}=6$, $n_{\text{GDX}}=5$. Representación en diagrama de caja de: B. latencia la primer ataque y duración del conflicto y C. niveles de agresividad. NS = no significativo, $n_{\text{SHAM}}=6$, $n_{\text{GDX}}=5$.

Discusión

El comportamiento agresivo entre machos, tradicionalmente estudiado durante el período reproductivo, ha sido relacionado con altos niveles de andrógenos de origen gonadal en todas las clases de vertebrados. En este contexto, la castración elimina la

principal fuente de T circulante, y resulta en una disminución o pérdida de la agresión, proporcionando pruebas de que las hormonas gonadales son esenciales para la agresión en vertebrados en contextos reproductivos (Balthazart, 1983; Francis et al., 1992; Nelson, 2005; Wingfield et al., 1990; Wingfield and Hahn, 1994). También se ha realizado castración en especies que muestran agresión durante el período no reproductivo, para probar si las gónadas en reposo y los bajos niveles plasmáticos de hormonas esteroides son necesarios para sostener este tipo de agresión. Se ha demostrado que en el período no reproductivo la agresión puede ocurrir después de la castración, en aves (Gwinner et al., 1994; Logan and Wingfield, 1990; Soma and Wingfield, 1999; Wingfield, 1994; Wingfield et al., 1997), mamíferos (Caldwell et al., 1984; Demas et al., 2007; Jasnow et al., 2000) y reptiles (Moore y Marler, 1987). En concordancia, nuestros resultados muestran que las díadas GDX exhiben comportamiento agonístico indistinguible de díadas SHAM, estableciendo relaciones de dominancia de acuerdo a las asimetrías de peso como se describe anteriormente para la especie (Batista et al., 2012). Las díadas GDX siguieron las fases características del encuentro agonístico y mostraron un patrón temporal de despliegues locomotores y eléctricos sin diferencias a las díadas SHAM. En un análisis exhaustivo de este comportamiento agonístico (fig. 13), no se encontraron diferencias significativas en la latencia al primer ataque, niveles de agresión ni tiempo en el que se establece la subordinación (latencia al primer ataque, duración del conflicto, tasa de ataques del pez dominante, tasa de ataques del pez subordinado). Asimismo, el repertorio de señales eléctricas sociales utilizadas en la comunicación agonística no fue diferente entre animales GDX y SH (latencia al primer off, tasa de off conflicto, tasa de off post-resolución, estatus de jerarquía de la DOE luego de la resolución). Este estudio demuestra por primera vez en un pez teleosteo la independencia de la ATNR de las hormonas esteroides gonadales.

Los experimentos de comportamiento que utilizan animales castrados son fiables únicamente si el procedimiento quirúrgico asegura la gonadectomía bilateral completa, ya que incluso pequeños remanentes de gónadas son suficientes para secretar niveles plasmáticos normales de hormonas esteroides (Almeida et al., 2014). Puesto que esto es especialmente importante en el período no reproductivo, en

nuestro estudio sólo utilizamos diadas GDx en las que los niveles plasmáticos de 11-KT luego de la contienda eran por lo menos 85% más bajos que en los individuos SHAM; y sólo se utilizaron animales GDx en encuentros agonísticos al menos un mes después de la cirugía, para evitar posibles efectos de niveles circulantes de hormonas esteroides gonadales residuales.

Discusión general, conclusiones y perspectivas

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

i) La conducta agonística entre machos de *G. omarorum* no se diferencia de la previamente reportada en díadas intra e inter-sexuales en la especie y no se asocia a los niveles plasmáticos de 11-KT.

ii) La ATNR en contiendas diádicas entre machos de *G. omarorum* depende de la conversión de andrógenos a estrógenos.

iii) La fuente esteroidea que sustenta la ATNR de *G. omarorum* no es gonadal.

La ocurrencia de la agresión no reproductiva ha desafiado el paradigma tradicional de los andrógenos gonadales como moduladores universales de la agresión. Los estudios sobre la ATNR en aves y mamíferos han proporcionado una profunda comprensión sobre los mecanismos subyacentes a la regulación de la agresión no reproductiva que se sostiene fundamentalmente por neurosíntesis de estradiol (Charlier et al., 2011; Heimovics et al., 2012; Heimovics et al., 2015; Pradhan et al., 2008; Pradhan et al., 2010; Trainor et al., 2007; Trainor et al., 2008). Para entender si este control estrogénico no gonadal de ATNR representa una estrategia general entre los vertebrados, es importante identificarlo en otras clases de vertebrados, particularmente en los teleósteos (que es el grupo más antiguo y más diverso de vertebrados). Los peces son un excelente grupo para el estudio de los mecanismos por los cuales las hormonas modulan la expresión del comportamiento agresivo en vertebrados ya que presentan un SNC más sencillo y de fácil manipulación. El sistema neuroendócrino está bien conservado entre los vertebrados y es probable que los peces compartan semejanzas en los mecanismos de la acción hormonal sobre el comportamiento con otros vertebrados.

Gymnotus omarorum constituye un excelente modelo para el estudio de los mecanismos neuroendócrinos de ATNR en vertebrados. Es importante destacar que este modelo ha sido construido sobre las características adaptativas sobresalientes de una especie silvestre autóctona y en base a más de 30 años de experiencia en el trabajo con peces eléctricos en el país. La caracterización de las propiedades morfológicas y funcionales de su capacidad electrocomunicativa (Lorenzo et al., 2001; Caputi et al., 2005; Lorenzo et al., 2006; Silva et al., 2002; Silva et al., 2008), junto con la descripción de sus comportamientos sociales (Batista et al., 2012) y de su neuromodulación (Perrone et al., 2010; Silva et al., 2013; Zubizarreta et al., 2012; Zubizarreta et al., 2015), han permitido forjar un modelo experimental excepcionalmente ventajoso y de gran potencial para el estudio de la regulación neuroendócrina de la agresión en vertebrados: el modelo de agresión territorial de *G. omarorum*, único ejemplo de agresión exclusivamente territorial no reproductiva en teleósteos.

Sobre la base de los resultados de esta tesis se puede afirmar que la ATNR de *G. omarorum* es independiente de las hormonas esteroides gonadales al demostrar que: a) los niveles plasmáticos del principal andrógeno bioactivo en teleósteos (11-KT) no correlacionan con el estatus de dominancia o con la agresión medida en las contiendas macho-macho (cap. 1); y b) la conducta agonística perdura en forma indistinguible entre machos SHAM y castrados (cap. 3). Ambas evidencias son consistentes al señalar que la producción de hormonas esteroides gonadales no es necesaria para la manifestación de ATNR en esta especie.

En forma complementaria, los resultados obtenidos en esta tesis permitieron comprobar, por primera vez en teleósteos, que se producen altos niveles de agresión en el período no reproductivo a pesar de los bajos niveles circulantes de hormonas sexuales gonadales (cap. 1) a la vez que aporta la primera evidencia de un papel crítico de la aromatasa en la regulación de la ATNR en peces teleósteos, mediando efectos en la síntesis de hormonas esteroides no gonadales (cap. 2). Se puede especular, entonces que la neurosíntesis de esteroides, ya sea *de novo* o a partir de precursores inactivos, puede constituir una estrategia general que ha evolucionado en varios vertebrados con el fin de hacer que el comportamiento agresivo disociado de un

contexto reproductivo sea viable, en ausencia de altos niveles de esteroides sexuales en sangre. En múltiples estudios de aves y mamíferos se ha explicado cómo puede producirse agresión de forma independiente de las gónadas, y así evitar los costos potenciales de altos niveles de andrógenos circulantes en el período no reproductivo (Wingfield et al., 2006). Dos de estos incluyen la hipótesis del neuroesteroide y la hipótesis del precursor circulante (Wingfield and Soma, 2002; Wingfield et al., 2006), ambos deben ser explorados en teleósteos. Existen extensos reportes sobre la expresión de las principales enzimas esteroidogénicas en el cerebro teleósteos, incluyendo la aromatasa, lo que permitiría la biosíntesis de las hormonas esteroides, incluso directamente a partir del colesterol (revisado en Diotel et al., 2011). En los peces cebra, *Danio rerio*, la enzima CYP17, que sintetiza la DHEA, ha sido identificada en otros sitios además de las gónadas, incluyendo el cerebro, el riñón, el hígado, las branquias y el intestino, lo que sugiere que en teleósteos la DHEA puede ser secretada por estos órganos (Wang and Ge, 2004). En este sentido, los estrógenos han demostrado ser potentes neuroesteroides con efectos rápidos en la conducta de aves y mamíferos (Balthazart et al., 2006; Cornil et al., 2006; Charlier et al., 2011; Pradhan et al., 2008; Pradhan et al., 2010; Remage-Healey et al., 2010; Taziaux et al., 2007; Woolley, 2007). Para probar esta posibilidad en *G. omarrorum*, sería interesante explorar la expresión cerebral de las enzimas necesarias para la esteroidogénesis por técnicas de hibridación *in situ*, por ejemplo, así como testear la actividad de la aromatasa cerebral y su posible correlación con la agresión.

Las fronteras en el estudio de los mecanismos neuroendócrinos de la agresión actualmente se encuentran en la exploración de la estacionalidad de la modulación de esta conducta. Los estudios más recientes pretenden entender cómo el mismo cortejo comportamental (la agresión) se produce en escenarios fisiológicos tan distintos y por lo tanto, cómo los sistemas de control del comportamiento se adaptan a contextos hormonales diferentes. Se propone que las hormonas esteroides pueden afectar el comportamiento tanto por mecanismos genómicos como no-genómicos y que el balance entre estos 2 mecanismos de acción tan distintos depende del estado endócrino. Se plantea que; a) en momentos en los que los niveles plasmáticos hormonales son elevados (período reproductivo), la neurosíntesis de esteroides es

baja y el principal mecanismo modulador de la agresión sería genómico; b) en momentos en los que los niveles circulantes de esteroides son bajos (período no reproductivo) la neurosíntesis de esteroides es alta y el principal mecanismo regulador de la agresión sería no-genómico (Heimovics et al 2015). Por otra parte, existen evidencias que señalan que la importancia relativa de andrógenos y estrógenos en la modulación de la agresión puede cambiar estacionalmente (Soma et al., 2000b). Los resultados obtenidos en esta tesis indican que la ATNR es independiente de los niveles circulantes de 11-KT, y al mismo tiempo, sugiere que es regulado por E2. Dado que ambos esteroides sexuales dependen del sustrato androgénico T en las vías esteroidogénicas, sería interesante explorar los mediadores hormonales de la agresión de *G. omarorum* durante el período reproductivo para evaluar la estacionalidad del control de la agresión.

CONTRIBUCIONES

Publicaciones

Jalabert, C., Quintana, L., Pessina P., Silva, A. 2015. Extra-gonadal steroids modulate non-breeding territorial aggression in weakly electric fish. *Hormones and Behavior*, v.: 72, p.: 60 - 67.

Jalabert, C., Quintana, L., Silva, A. The male intrasexual aggression of the weakly electric fish, *Gymnotus omarorum*, as model system for the study of non-breeding territorial aggression. (*en preparación para ser enviado a la revista Acta Ethologica*).

Comunicaciones a congresos

Jalabert, C., Quintana, L., Silva, A. 2015. Non-breeding territorial aggression is modulated by aromatase activity in the weakly electric fish *Gymnotus omarorum*. 9th World Congress of International Brain Research Organization, Rio de Janeiro, Brazil.

L. Zubizarreta; Quintana, L.; Jalabert, C.; Silva A. 2015. Modulación estrogénica de la agresión territorial no reproductiva. V Jornadas Uruguayas de Comportamiento Animal, Montevideo, Uruguay.

L. Zubizarreta; Quintana, L.; Jalabert, C.; Silva A. 2015. Control neuroendócrino de la agresión territorial no reproductiva. Jornadas de Sociedad de Neurociencias del Uruguay, Montevideo, Uruguay.

Quintana, L., Jalabert, C., Zubizarreta, L., Pessina, P., Teixeira, F., Meerhoff, M., Silva, A. 2014. The weakly electric fish *Gymnotus omarorum* as a novel model system for the study of neuroendocrine control of non-breeding territorial aggression. 8th International Conference on Hormones, Brain And Behavior, Liege, Belgium.

Jalabert, C., Quintana, L., Silva, A. 2013. Gonadectomized individuals exhibit territorial aggression in the weakly electric fish *Gymnotus omarorum*. Argentinian Society of Neuroscience. Córdoba, Argentina.

Silva, A., Quintana, L., Perrone, R., Zubizarreta, L., Batista, G., Jalabert, C. 2012. Agresión territorial no reproductiva en el pez eléctrico *Gymnotus omarorum*. Punto de partida para la exploración de los mecanismos neuroendócrinos subyacentes. XIV Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias. Maldonado, Uruguay.

Desarrollos experimentales

Técnicas de mediciones hormonales: partiendo de datos preliminares realizados por Batista 2011, en el marco de esta maestría se realizó la puesta a punto del protocolo de medición hormonal por técnicas de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y radioinmunoanálisis (RIA) en *G. omarorum*. Para ello contamos con asesoramiento de la Dra. Ana Meikle y la Msc. Paula Pessina del Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República.

Procedimiento quirúrgico: El desarrollo de la presente tesis permitió el establecimiento del protocolo de sexado necesario para la identificación del sexo en

esta especie monomórfica. La incorporación de esta técnica en la Unidad Bases Neurales de la Conducta resulta un importante aporte ya que constituye un protocolo de procedimiento básico que actualmente se realiza previo a todos los experimentos.

Financiación

La presente tesis contó con diversas fuentes de financiación que hicieron posible su realización:

- Fondo Clemente Estable Modalidad I Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) FCE_1_2011_1_6180 "Bases hormonales de la agresión territorial no reproductiva". Responsables: Ana Silva / Laura Quintana. 2013-2015.
- Fondo Clemente Estable Modalidad III ANII FCE_3_2013_1_100495 "Rol de las hormonas esteroides en el control de la agresión territorial no reproductiva de *Gymnotus omarorum*". Responsable: Cecilia Jalabert. 2014-2015.
- Beca de posgrado nacional, ANII. 2014-2015.
- PEDECIBA alícuota
- PEDECIBA, pasantías locales. Recibí financiación para la realización de una pasantía de capacitación en Técnicas Radioinmunoensayo en el Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República. Bajo la supervisión de la Dra. Ana Meikle. 2013.

Referencias

Adkins-Regan, E., 2005. Hormones and animal social behavior. Princeton University Press.

Almeida, O., Canário, A.V.M., Oliveira, R.F., 2014. Castration affects reproductive but not aggressive behavior in a cichlid fish. *General and Comparative Endocrinology* 207, 34-40.

Apfelbeck, B., Mortega, K. G., Kiefer, S., Kipper, S., & Goymann, W., 2013. Life-history and hormonal control of aggression in black redstarts: Blocking testosterone does not decrease territorial aggression, but changes the emphasis of vocal behaviours during simulated territorial intrusions. *Frontiers in Zoology* 10,8.

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

Balthazart, J., 1983. Hormonal correlates of behavior, in: Farner, D.S., King, J.R., Parkes, K.C. (Eds.), *Avian biology*. Academic Press, pp. 221-365.

Balthazart, J., Cornil, C.A., Taziaux, M., Charlier, T.D., Baillien, M., Ball, G.F., 2006. Rapid changes in production and behavioral action of estrogens. *Neuroscience* 138, 783-791.

Batista, G., 2011. Agresión territorial fuera del período reproductivo. Efecto de la experiencia social previa sobre la conducta agonística de *Gymnotus omarorum*. Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

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.

Black-Cleworth, P., 1970. The Role of Electrical Discharges in the Non-Reproductive Social Behaviour of *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Pisces). *Animal Behaviour Monographs* 3, Part 1, 1-IN1.

Borg, B., 1994. Androgens in teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 109, 219-245.

Caldwell, G.S., Glickman, S.E., Smith, E.R., 1984. Seasonal aggression independent of seasonal testosterone in wood rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81, 5255-5257.

Caputi, A., Carlson, B., Macadar, O., 2005. Electric Organs and Their Control, in: Bullock, T., Hopkins, C., Popper, A., Fay, R. (Eds.), *Electroreception*. Springer New York, pp. 410-451.

Cardwell, J.R., Liley, N.R., 1991. Androgen control of social status in males of a wild population of stoplight parrotfish, *Sparisoma viride* (Scaridae). *Hormones and Behavior* 25, 1-18.

Clutton-Brock, T.H., 1989. Review Lecture: Mammalian Mating Systems. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 236, 339-372.

Cornil, C.A., Ball, G.F., Balthazart, J., 2006. Functional significance of the rapid regulation of brain estrogens: Where do the estrogens come from? *Brain Research* 1126, 2-26.

Cornil, C.A., Charlier, T.D., 2010. Rapid Behavioural Effects of Oestrogens and Fast Regulation of Their Local Synthesis by Brain Aromatase. *Journal of Neuroendocrinology* 22, 664-673.

Charlier, T.D., Newman, A.E.M., Heimovics, S.A., Po, K.W.L., Saldanha, C.J., Soma, K.K., 2011. Rapid Effects of Aggressive Interactions on Aromatase Activity and Oestradiol in Discrete Brain Regions of Wild Male White-Crowned Sparrows. *Journal of Neuroendocrinology* 23, 742-753.

Demas, G.E., Cooper, M.A., Albers, H.E., Soma, K.K., 2007. Novel Mechanisms Underlying Neuroendocrine Regulation of Aggression: A Synthesis of Rodent, Avian, and Primate Studies, in: Lajtha, A., Blaustein, J. (Eds.), *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. Springer US, pp. 337-372.

Dugatkin, L.A., Ohlsen, S.R., 1990. Contrasting asymmetries in value expectation and resource holding power: Effects on attack behaviour and dominance in the pumpkinseed sunfish, *Lepomis gibbosus*. *Animal Behaviour* 39, 802-804.

Dugatkin, L.A., Biederman, L., 1991. Balancing asymmetries in resource holding power and resource value in the pumpkinseed sunfish. *Animal Behaviour* 42, 691-692.

Dunlap, K.D., Silva, A.C., Chung, M., 2011. Environmental complexity, seasonality and brain cell proliferation in a weakly electric fish, *Brachyhypopomus gauderio*. *The Journal of Experimental Biology* 214, 794-805.

Earley, R., Hsu, Y., 2013. Contest behaviour in fishes, in: Briffa, I.C.W.H.M. (Ed.), *Animal Contests*. Cambridge University Press, pp. 199-227.

Fox, H.E., White, S.A., Kao, M.H.F., Fernald, R.D., 1997. Stress and dominance in a social fish. *The Journal of Neuroscience* 17, 6463-6469.

Francis, R.C., Jacobson, B., Wingfield, J.C., Fernald, R.D., 1992. Castration Lowers Aggression but not Social Dominance in Male *Haplochromis burtoni* (Cichlidae). *Ethology* 90, 247-255.

Gavassa, S., Silva, A.C., Stoddard, P.K., 2011. Tight hormonal phenotypic integration ensures honesty of the electric signal of male and female *Brachyhypopomus gauderio*. *Hormones and Behavior* 60, 420-426.

Gavassa, S., Silva, A., Gonzalez, E., Molina, J., Stoddard, P., 2012. Social competition masculinizes the communication signals of female electric fish. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 66, 1057-1066.

Gonçalves, D., Alpedrinha, J., Teles, M., Oliveira, R.F., 2007. Endocrine control of sexual behavior in sneaker males of the peacock blenny *Salaria pavo*: Effects of castration, aromatase inhibition, testosterone and estradiol. *Hormones and Behavior* 51, 534-541.

Gonçalves, D., Oliveira, R.F., 2010. Hormones and sexual behavior of teleost fishes. *Hormones and reproduction of vertebrates*, 119-147.

Goodson, J. L., 2005. The vertebrate social behavior network: evolutionary themes and variations. *Hormones and Behavior*, 4,1, 11-22.

Goodson, J.L., Saldanha, C.J., Hahn, T.P., Soma, K.K., 2005. Recent advances in behavioral neuroendocrinology: Insights from studies on birds. *Hormones and Behavior* 48, 461-473.

Goodson, J.L., Kabelik, D., 2009. Dynamic limbic networks and social diversity in vertebrates: From neural context to neuromodulatory patterning. *Frontiers in Neuroendocrinology* 30, 429-441.

Gwinner, E., Rödl, T., Schwabl, H., 1994. Pair territoriality of wintering stonechats : behaviour, function and hormones. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 34, 321-327.

Hau, M., Wikelski, M., Soma, K.K., Wingfield, J.C., 2000. Testosterone and Year-Round Territorial Aggression in a Tropical Bird. *General and Comparative Endocrinology* 117, 20-33.

Heimovics, S.A., Prior, N.H., Maddison, C.J., Soma, K.K., 2012. Rapid and Widespread Effects of 17 β -Estradiol on Intracellular Signaling in the Male Songbird Brain: A Seasonal Comparison. *Endocrinology* 153, 1364-1376.

Heimovics, S.A., Fokidis, H.B., Soma, K.K., 2013. Brain aromatase and territorial aggression across the seasons in male song sparrows. *Brain Aromatase, Estrogens, and Behavior*, 199.

Heimovics, S.A., Ferris, J.K., Soma, K.K., 2015. Non-invasive administration of 17 β -estradiol rapidly increases aggressive behavior in non-breeding, but not breeding, male song sparrows. *Hormones and Behavior* 69, 31-38.

Hirschenhauser, K., Taborsky, M., Oliveira, T., Canário, A.V.M., Oliveira, R.F., 2004. A test of the 'challenge hypothesis' in cichlid fish: simulated partner and territory intruder experiments. *Animal Behaviour* 68, 741-750.

Hsu, Y., Earley, R.L., Wolf, L.L., 2006. Modulation of aggressive behaviour by fighting experience: mechanisms and contest outcomes. *Biological Reviews* 81, 33-74.

Huffman, L.S., O'Connell, L.A., Hofmann, H.A., 2013. Aromatase regulates aggression in the African cichlid fish *Astatotilapia burtoni*. *Physiology & Behavior* 112–113, 77-83.

Huntingford, F.A., Turner, A., 1987. *Animal conflict*. Animal Behavior Series. Chapman & Hall Ltd.

Jasnow, A.M., Huhman, K.L., Bartness, T.J., Demas, G.E., 2000. Short-Day Increases in Aggression Are Inversely Related to Circulating Testosterone Concentrations in Male Siberian Hamsters (*Phodopus sungorus*). *Hormones and Behavior* 38, 102-110.

King, J.A., 1973. The Ecology of Aggressive Behavior. *Annual Review of Ecology and Systematics* 4, 117-138.

Landys, M. M., Goymann, W., Soma, K. K., & Slagsvold, T., 2013. Year-round territorial aggression is independent of plasma DHEA in the European nuthatch *Sitta europaea*. *Hormones and behavior*, 63,1, 166-172.

Logan, C.A., Wingfield, J.C., 1990. Autumnal territorial aggression is independent of plasma testosterone in mockingbirds. *Hormones and Behavior* 24, 568-581.

Lorenz, K., 1966. *The role of gestalt perception in animal and human behavior. Aspects of form*. Indiana University Press: Bloomington.

Lorenzo, D., Silva, A., Caputti, A. A., Borde, M., & Macadar, O. (2001). Electrogeneration in South American weakly electric fish. *Sensory biology of jawed fishes: New insights*, 121-159.

Lorenzo, D., Silva, A., Macadar, O., 2006. Electrocommunication in Gymnotiformes: jamming avoidance and social signals during courtship. *Communication in fishes* 2, 753-779.

Maruska, K.P., Fernald, R.D., 2010. Reproductive status regulates expression of sex steroid and GnRH receptors in the olfactory bulb. *Behavioural Brain Research* 213, 208-217.

Maynard Smith, J., 1974. The theory of games and the evolution of animal conflicts. *Journal of Theoretical Biology* 47, 209-221.

McCarthy, M.M., Wright, C.L., Schwarz, J.M., 2009. New tricks by an old dogma: mechanisms of the Organizational/Activational Hypothesis of steroid-mediated sexual differentiation of brain and behavior. *Hormones and Behavior* 55, 655-665.

Moore, M.C., Marler, C.A., 1987. Effects of testosterone manipulations on nonbreeding season territorial aggression in free-living male lizards, *Sceloporus jarrovi*. *General and Comparative Endocrinology* 65, 225-232.

Morandini, L., Honji, R.M., Ramallo, M.R., Moreira, R.G., Pandolfi, M., 2014. The interrenal gland in males of the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*: Relationship with

stress and the establishment of social hierarchies. *General and Comparative Endocrinology* 195, 88-98.

Nelson, R.J., 2005. *An introduction to behavioral endocrinology*. Sinauer Associates.

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

Newman, S.W., 1999. The Medial Extended Amygdala in Male Reproductive Behavior A Node in the Mammalian Social Behavior Network. *Annals of the New York Academy of Sciences* 877, 242-257.

O'Connell, L.A., Hofmann, H.A., 2012. Social Status Predicts How Sex Steroid Receptors Regulate Complex Behavior across Levels of Biological Organization. *Endocrinology* 153, 1341-1351.

O'Connell, L.A., Fontenot, M.R., Hofmann, H.A., 2013. Neurochemical profiling of dopaminergic neurons in the forebrain of a cichlid fish, *Astatotilapia burtoni*. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 47, 106-115.

Ogawa, S., Lubahn, D.B., Korach, K.S., Pfaff, D.W., 1997. Behavioral effects of estrogen receptor gene disruption in male mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 1476-1481.

Oliveira, R.F., Almada, V.C., Canario, A.V.M., 1996. Social Modulation of Sex Steroid Concentrations in the Urine of Male Cichlid Fish *Oreochromis mossambicus*. *Hormones and Behavior* 30, 2-12.

Oliveira, R. F., Lopes, M., Carneiro, L. A., & Canário, A. V., 2001. Watching fights raises fish hormone levels. *Nature*, 409, 6819, 475-475.

Oliveira, R. F., Silva, A., & Canário, A. V. (2009). Why do winners keep winning? Androgen mediation of winner but not loser effects in cichlid fish. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 276, 1665, 2249-2256.

Parikh, V.N., Clement, T.S., Fernald, R.D., 2006. Androgen level and male social status in the African cichlid, *Astatotilapia burtoni*. *Behavioural Brain Research* 166, 291-295.

Parker, G.A., Rubenstein, D.I., 1981. Role assessment, reserve strategy, and acquisition of information in asymmetric animal conflicts. *Animal Behaviour* 29, 221-240.

Perrone, R., Batista, G., Lorenzo, D., Macadar, O., Silva, A., 2010. Vasotocin Actions on Electric Behavior: Interspecific, Seasonal, and Social Context-Dependent Differences. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 4, 52.

Perrone, R., 2012. Modulación de la vasotocina sobre el comportamiento social de dos especies de peces eléctricos con diferente socialidad. Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas.

Pinna, G., Costa, E., Guidotti, A., 2006. Fluoxetine and norfluoxetine stereospecifically and selectively increase brain neurosteroid content at doses that are inactive on 5-HT reuptake. *Psychopharmacology* 186, 362-372.

Pottinger, T.G., Moran, T.A., 1993. Differences in plasma cortisol and cortisone dynamics during stress in two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fish Biology* 43, 121-130.

Pradhan, D.S., Yu, Y., Soma, K.K., 2008. Rapid estrogen regulation of DHEA metabolism in the male and female songbird brain. *Journal of Neurochemistry* 104, 244-253.

Pradhan, D.S., Lau, L.Y.M., Schmidt, K.L., Soma, K.K., 2010. 3β -HSD in songbird brain: subcellular localization and rapid regulation by estradiol. *Journal of Neurochemistry* 115, 667-675.

Ramallo, M.R., Morandini, L., Alonso, F., Birba, A., Tubert, C., Fiszbein, A., Pandolfi, M., 2014. The endocrine regulation of cichlids social and reproductive behavior through the eyes of the chanchita, *Cichlasoma dimerus* (Percomorpha; Cichlidae). *Journal of Physiology-Paris* 108, 194-202.

Remage-Healey, L., London, S.E., Schlinger, B.A., 2010. Birdsong and the neural production of steroids. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 39, 72-81.

Richer-de-Forges, M.M., Crampton, W.G.R., Albert, J.S., 2009. A New Species of *Gymnotus* (*Gymnotiformes*, *Gymnotidae*) from Uruguay: Description of a Model Species in Neurophysiological Research. *Copeia* 2009, 538-544.

Salazar, V.L., Stoddard, P.K., 2009. Social competition affects electric signal plasticity and steroid levels in the gymnotiform fish *Brachyhypopomus gauderio*. *Hormones and Behavior* 56, 399-409.

Scordalakes, E.M., Rissman, E.F., 2003. Aggression in male mice lacking functional estrogen receptor α . *Behavioral neuroscience* 117, 38.

Schlinger, B.A., Callard, G.V., 1990. Aromatization mediates aggressive behavior in quail. *General and Comparative Endocrinology* 79, 39-53.

Schlinger, B.A., Slotow, R.H., Arnold, A.P., 1992. Plasma estrogens and brain aromatase in winter white-crowned sparrows. *Ornis Scandinavica*, 292-297.

Sessa, A.K., Harris, R.M., Hofmann, H.A., 2013. Sex steroid hormones modulate responses to social challenge and opportunity in males of the monogamous convict cichlid, *Amatitlana nigrofasciata*. *General and Comparative Endocrinology* 189, 59-65.

Silva, A., Quintana, L., Ardanaz, J.L., Macadar, O., 2002. Environmental and hormonal influences upon EOD waveform in gymnotiform pulse fish. *Journal of Physiology-Paris* 96, 473-484.

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., Perrone, R., Macadar, O., 2007. Environmental, seasonal, and social modulations of basal activity in a weakly electric fish. *Physiology & Behavior* 90, 525-536.

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.

Silva, A.C., Perrone, R., Zubizarreta, L., Batista, G., Stoddard, P.K., 2013. Neuromodulation of the agonistic behavior in two species of weakly electric fish that display different types of aggression. *The Journal of Experimental Biology* 216, 2412-2420.

Smith, J.M., Parker, G.A., 1976. The logic of asymmetric contests. *Animal Behaviour* 24, 159-175.

Soma, K.K., Wingfield, J.C., 1999. Endocrinology of aggression in the nonbreeding season, in: Adams, N., Slotow, R. (Eds.), *Twenty-Second International Ornithological Congress*, University of Natal, pp. 1606-1620.

Soma, K.K., Sullivan, K., Wingfield, J., 1999. Combined Aromatase Inhibitor and Antiandrogen Treatment Decreases Territorial Aggression in a Wild Songbird during the Nonbreeding Season. *General and Comparative Endocrinology* 115, 442-453.

Soma, K.K., Tramontin, A.D., Wingfield, J.C., 2000a. Oestrogen regulates male aggression in the non-breeding season. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 267, 1089-1096.

Soma, K.K., Sullivan, K.A., Tramontin, A.D., Saldanha, C.J., Schlinger, B.A., Wingfield, J.C., 2000b. Acute and chronic effects of an aromatase inhibitor on territorial aggression in breeding and nonbreeding male song sparrows. *Journal of Comparative Physiology A* 186, 759-769.

Soma, K.K., Wingfield, J.C., 2001. Dehydroepiandrosterone in Songbird Plasma: Seasonal Regulation and Relationship to Territorial Aggression. *General and Comparative Endocrinology* 123, 144-155.

Soma, K.K., Schlinger, B.A., Wingfield, J.C., Saldanha, C.J., 2003. Brain aromatase, 5 α -reductase, and 5 β -reductase change seasonally in wild male song sparrows: Relationship to aggressive and sexual behavior. *Journal of Neurobiology* 56, 209-221.

Soma, K.K., 2006. Testosterone and Aggression: Berthold, *Birds and Beyond*. *Journal of Neuroendocrinology* 18, 543-551.

Soma, K.K., Scotti, M.-A.L., Newman, A.E.M., Charlier, T.D., Demas, G.E., 2008. Novel mechanisms for neuroendocrine regulation of aggression. *Frontiers in Neuroendocrinology* 29, 476-489.

Stoddard, P.K., 2006. Plasticity of the electric organ discharge waveform: contexts, mechanisms, and implications for electrocommunication. *Fish Communication* 2, 623-646.

Taziaux, M., Keller, M., Bakker, J., Balthazart, J., 2007. Sexual behavior activity tracks rapid changes in brain estrogen concentrations. *The Journal of Neuroscience* 27, 6563-6572.

Trainor, B.C., Greiwe, K.M., Nelson, R.J., 2006. Individual differences in estrogen receptor α in select brain nuclei are associated with individual differences in aggression. *Hormones and Behavior* 50, 338-345.

Trainor, B.C., Lin, S., Finy*, M.S., Rowland, M.R., Nelson, R.J., 2007. Photoperiod reverses the effects of estrogens on male aggression via genomic and nongenomic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 9840-9845.

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

Trainor, B.C., Nelson, R.J., 2012. *Neuroendocrinology of Aggression*.

Tsutsui, K., Yamazaki, T., 1995. Avian neurosteroids. I. Pregnenolone biosynthesis in the quail brain. *Brain Research* 678, 1-9.

Tsutsui, K., Ukena, K., Usui, M., Sakamoto, H., Takase, M., 2000. Novel brain function: biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons. *Neuroscience Research* 36, 261-273.

Tsutsui, K., Matsunaga, M., Ukena, K., 2003. Biosynthesis and Biological Actions of Neurosteroids in the Avian Brain. *Avian and Poultry Biology Reviews* 14, 63-78.

Vandenbergh, J.G., 1971. The effects of gonadal hormones on the aggressive behaviour of adult golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Animal Behaviour* 19, 589-594.

Vullioud, P., Bshary, R., Ros, A.F.H., 2013. Intra- and interspecific aggression do not modulate androgen levels in dusky gregories, yet male aggression is reduced by an androgen blocker. *Hormones and Behavior* 64, 430-438.

Wade, J., Schlinger, B.A., Hodges, L., Arnold, A.P., 1994. Fadrozole: A Potent and Specific Inhibitor of Aromatase in the Zebra Finch Brain. *General and Comparative Endocrinology* 94, 53-61.

Wang, Y., Ge, W., 2004. Cloning of zebrafish ovarian P450c17 (CYP17, 17 α -hydroxylase/17, 20-lyase) and characterization of its expression in gonadal and extra-gonadal tissues. *General and Comparative Endocrinology* 135, 241-249.

Wehling, M., Lösel, R., 2006. Non-genomic steroid hormone effects: Membrane or intracellular receptors? *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 102, 180-183.

Wingfield, J.C., Hegner, R.E., Dufty Jr, A.M., Ball, G.F., 1990. The "challenge hypothesis": theoretical implications for patterns of testosterone secretion, mating systems, and breeding strategies. *American Naturalist*, 829-846.

Wingfield, J.C., Hahn, T.P., 1994. Testosterone and territorial behaviour in sedentary and migratory sparrows. *Animal Behaviour* 47, 77-89.

Wingfield, J.C., 1994. Regulation of Territorial Behavior in the Sedentary Song Sparrow, *Melospiza melodia morphna*. *Hormones and Behavior* 28, 1-15.

Wingfield, J.C., Jacobs, J., Hillgarth, N., 1997. Ecological Constraints and the Evolution of Hormone-Behavior Interrelationships. *Annals of the New York Academy of Sciences* 807, 22-41.

Wingfield, J.C., Lynn, S., Soma, K.K., 2001. Avoiding the 'Costs' of Testosterone: Ecological Bases of Hormone-Behavior Interactions. *Brain, Behavior and Evolution* 57, 239-251.

Wingfield, J.C., Soma, K.K., 2002. Spring and Autumn Territoriality in Song Sparrows: Same Behavior, Different Mechanisms? *Integrative and Comparative Biology* 42, 11-20.

Wingfield, J.C., 2005. A continuing saga: the role of testosterone in aggression. *Hormones and Behavior* 48, 253-255.

Wingfield, J.C., Moore, I.T., Goymann, W., Wacker, D.W., SperryTodd, 2006. Contexts and Ethology of Vertebrate Aggression: Implications for the Evolution of Hormone-Behavior Interactions, in: NELSON, R.J. (Ed.), *Biology of Aggression*. OXFORD UNIVERSITY PRESS, pp. 179 - 210.

Woolley, C.S., 2007. Acute effects of estrogen on neuronal physiology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 657-680.

Zubizarreta, L., Perrone, R., Stoddard, P.K., Costa, G., Silva, A.C., 2012. Differential serotonergic modulation of two types of aggression in weakly electric fish. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 6, 77.

Zubizarreta, L., Stoddard, P.K., Silva, A., 2015. Aggression Levels Affect Social Interaction in the Non-Breeding Territorial Aggression of the Weakly Electric Fish, *Gymnotus omarorum*. *Ethology* 121, 8-16.