Tesis de Doctorado PEDECIBA - Área Biología - 2020

BASES HORMONALES DE LA AGRESIÓN TERRITORIAL NO REPRODUCTIVA

Mag. Lucía Zubizarreta

Directora: Ana C. Silva

Co-Directora: Laura Quintana

Tribunal:

Annabel Ferreira

Javier García-Alonso

Rui Oliveira

Laboratorio de Ejecución: Unidad Bases Neurales de la Conducta, IIBCE

RESUMEN

El estudio de la modulación de la territorialidad en especies silvestres es especialmente adecuado para explorar los mecanismos que subyacen a la plasticidad comportamental, por la cual los animales responden a contextos ambientales y sociales variables. Las hormonas esteroides son clave en la integración de información social, ambiental y del estado interno para ejecutar salidas conductuales contexto específicas. Esta tesis reúne dos marcos conceptuales (ecológico y neuroendocrinológico individual) para explorar las bases hormonales de la agresión territorial de *Gymnotus omarorum*, un pez eléctrico nativo que despliega esta conducta durante todo el año. La agresión territorial que ocurre disociada del período reproductivo ofrece la oportunidad de estudiar mecanismos de modulación independientes de esteroides gonadales. La agresión territorial no reproductiva de *G. omarorum* ha sido caracterizada en detalle y constituye un comportamiento robusto y complejo, el cual media la adquisición de territorios, tanto en hembras como en machos.

En la población estudiada en el ambiente natural, en el período no reproductivo los únicos factores que influenciaron el tamaño territorial fueron el tamaño corporal y la concentración de O_2. En el período reproductivo el sexo se tornó un factor relevante para la territorialidad, dado que el tamaño del territorio se relacionó con esteroides sexuales dimórficos (17β- Estradiol en hembras y 11-cetotestosterona en machos). De manera adicional, en hembras se evidenció la importancia de la maduración gonadal sobre el tamaño territorial. Los mecanismos hormonales que subyacen a la agresión no reproductiva se exploraron en encuentros diádicos en arenas neutrales en el laboratorio. La conducta agonística no presenta diferencias entre sexos, y la dominancia depende solamente del tamaño corporal. La agresión territorial fue independiente de acciones androgénicas rápidas. Sin embargo, la síntesis rápida de estrógenos tiene un rol preponderante, ya que la inhibición de la conversión de andrógenos a estrógenos afectó la ocurrencia de los conflictos, la dinámica, intensidad y resultado de las contiendas. Con el objetivo de conocer las fuentes estrogénicas y posibles precursores de neurosíntesis, se realizó la puesta a punto

y cuantificación circulante y cerebral de perfiles esteroideos utilizando la técnica de Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa. Los individuos no reproductivos presentaron niveles circulantes y cerebrales detectables de andrógenos aromatizables (testosterona y androstenediona), no mostraron estrógenos circulantes, y presentaron estrona cerebral, lo cual constituye una evidencia inequívoca de síntesis cerebral de estrógenos. En suma, *G. omarorum* como único modelo entre los teleósteos, revela que la síntesis cerebral rápida de estrógenos tiene un rol protagónico en la modulación de la agresión no reproductiva, lo que parece ser una estrategia compartida con aves y mamíferos.

AGRADECIMIENTOS

A Annabel Ferreira, Javier García Alonso y Rui Oliveira, por aceptar formar parte del tribunal de la tesis y aportar desde sus áreas de experiencia.

Al PEDECIBA y a Uruguay, por permitirme formarme como Doctora, un privilegio que valoro todos los días. A Annabel y Javier de la CAS, que ahora están leyendo el producto terminado.

A mis directoras de tesis, Ana Silva y Laura Quintana, dos mujeres que admiro profundamente, desde el punto de vista académico y personal. Son unas genias que logran orientar sin imponer, con una solvencia académica increíble y una contraparte humana difícil de igualar. Cada una con diferente modalidad fueron la brújula de esta tesis, sin ellas esto no hubiera sido posible: gracias, gracias, gracias.

A mis compas de siempre de la UBNC: Laura Quintana, Ana Silva, Rossana Perrone, Adriana Migliaro, Paula Pouso, Wally Valiño, Fede Reyes. Salidas de campo, mesada, almuerzos, congresos, risas, enojos, amistad. Gracias por el apoyo, esta tesis también es de ustedes.

A Rossana Perrone y Adriana Migliaro, pilares que me ayudan a crecer y con las que es un gustazo compartir la actividad científica diaria. Son de esas personas incondicionales que apoyan desde los entretelones. Las dos, con paciencia infinita y mucho amor siempre están en las buenas y en las malas.

Al laboratorio NFCS: Michel Borde, Virginia Comas, Esteban Pino, Magdalena Vitar, Carolina Acordagoitia, sin ellos no hubiera sobrevivido el periplo de ser docente en FMed y hacer el doctorado en el IIBCE. Gracias por colgarse con lo que a mí me cuelga, y aportar siempre una mirada sagaz y alternativa. A Michel, por abrirme las puertas, interesarse y darme ánimo. A Vir, por estar al pie del cañón siempre. A los chacales por ser amigos de fierro, y por las charlas nocturnas delirantes que aportan mucho más de lo que pensamos.

A mis co-autores/as de papers: Mariana Meerhoff, Franco Texeira de Mello, Daniel Hernández, Renato Honji, Renata Guimarães-Moreira, Gervasio Batista, Rossana Perrone y Cecilia Jalabert.

A Bettina Tassino, por las discusiones etológicas en las que aprendo un montón y por prestar cabeza siempre que se lo pedí.

A mi ñeri Ceci, por tanto recorrido. Nos iniciamos juntas en las cuantificaciones hormonales, y en la etapa final de esta tesis ella se puso al hombro el desafío de extraer esteroides del cerebro de Gymnotus. Sin su apoyo y enseñanzas no existiría el Capítulo 3.

Al equipo gasmass: Manuel, Laura y Fede. Fue una linda y frustrante etapa de esta historia. Manuel se comprometió y metió cabeza en el desafío de cuantificar hormonas en Gymnotus por GC-MS de una manera increíble. Durante un par de años aprendí muchísimo, y el balance es positivo (aunque lloré con lágrimas más de una vez).

A la gente del Soma lab, por recibirme como una más y ayudarme durante mi estadía en Vancouver. A Kiran Soma, porque estuvo presente en todas las etapas de la puesta a punto del LC-MS, y se involucró en el desafío al 100%. Agradezco de corazón haber pasado la navidad con él y su familia. A Chunqi Ma, por comprometerse con el proyecto, ser una fiera en la cuantificación hormonal y por abrirme las puertas de su casa.

A todas las personas que me acompañaron a las salidas de campo, que pusieron sangre, sudor, hipotermia y buena onda.

A mis amigues, porque no solo de tesis vive la mujer. Agradezco especialmente a Anita y Daniel, por bancar camiones siempre.

A Isabel, por mostrar interés y preguntar siempre como van las cosas.

A Martín, por iluminar mi vida en las etapas finales de escritura y defensa. Gracias por soportar estoico a pata de bolsa, y motivarme con proyectos a futuro.

A mi familia, por acompañar en todo y más, realmente soy muy afortunada. Andrés, Vicky, Bruno, Juan, Gime, los Abente, los Zubis por el apoyo e interés. Al Negro y Manu por bancarse a la cuñada loca. A Vana, por ser uno de mis pilares. A Magdalena por ser mi dos: ella conoce cada fracaso y éxito de esta historia y apoyó desde su lugar de manera incondicional. A Hernán por participar de salida de campo e interesarse, aunque sea de otro palo. A Albert por colgarse con mis investigaciones. A Tere, por el apoyo constante.

A las dos personas que no solo me regalaron la vida, sino que sembraron y abonaron para mi crecimiento:
A mi padre, por insistir desde siempre que hay que hacer lo que a uno le gusta, y por nunca cuestionar mis elecciones. Mil gracias por acompañar este viaje.
A mi madre, infinitas gracias por estar siempre y por su fuerza arrolladora. No me alcanzan las palabras para agradecerle todo lo que hace por mí, esta tesis no existiría sin su apoyo.

ÍNDICE

Introducción 10

Antecedentes 11

Territorialidad y conducta agonística en el marco de la ecología del comportamiento. 11

Espacialidad 11

Conducta agonística 12

Determinantes del territorio 13

Bases neuroendócrinas de la territorialidad y la conducta agonística 14

Hormonas esteroides 14

Modulación hormonal de la agresión territorial 17

Gymnotus omarorum como modelo para estudiar las bases neuroendócrinas de la agresión 21

Hipótesis, estrategia de investigación y objetivos 25

Puntos de partida 25

Hipótesis de trabajo 26

Estrategia de investigación 26

Objetivos generales y específicos 28

Organización de la tesis 31

Capítulo I. Estacionalidad en los factores que impactan en el tamaño de los territorios en la naturaleza 33

Métodos 33

Resultados 39

Estudio 1: Distribución espacial y variables ambientales 40

Estudio 2: Distribución espacial basada en características individuales 42

Discusión 48

Espaciamiento en período no reproductivo: Dependencia del tamaño corporal e independencia del sexo 49

Espaciamiento en período reproductivo: la aparición de dimorfismo sexual en los determinantes del territorio 51

Comentario final 53

CAPÍTULO II. Vías esteroideas que modulan la agresión no reproductiva 55

Métodos 55

Resultados 61

Agresión territorial no reproductiva en hembras 61

Modulación hormonal de la agresión: inhibición aguda de la aromatasa 63

Modulación hormonal de la agresión: inhibición aguda del receptor de andrógenos 66

Discusión 67

La agresión territorial no reproductiva en hembras es independiente de la acción directa de andrógenos 68

La agresión territorial no reproductiva en hembras depende de la síntesis de estrógenos 69

Comentario final 70

CAPÍTULO III. Caracterización de los perfiles esteroideos circulantes y cerebrales de animales no reproductivos 72

Métodos 72

Resultados 82

Desarrollo del método de extracción de hormonas esteroides para posterior cuantificación por LC-MS/MS 82

Perfil hormonal circulante de adultos no reproductivos 89

Perfil hormonal cerebral de adultos no reproductivos 92

Comparación entre niveles circulantes y cerebrales 96

Discusión 100

Desarrollo del método de extracción de esteroides y protocolo de cuantificación 100

Niveles circulantes 101

Niveles cerebrales 104

Neurosíntesis de esteroides 106

CAPÍTULO IV. 112

Discusión general 112

La agresión territorial es sexualmente monomórfica pese al perfil esteroideo dimórfico 114

La agresión territorial no reproductiva es modulada por efectos rápidos de estrógenos neurosintetizados 116

Modelo interpretativo: territorialidad de *Gymnotus omarorum* durante el período no reproductivo 120

CAPÍTULO V. PERSPECTIVAS 122

A- neurosíntesis de esteroides asociados a la agresión y a la distribución de territorios 122

B- Estacionalidad en la regulación de la agresión persistente 123

Financiación 126

Bibliografía 127

ANEXOS

1- Artículo publicado “Seasonal and social factors associated with spacing in a wild territorial electric fish” por L. Zubizarreta, L. Quintana, D. Hernández, F. Texeira de Mello, M. Meerhoff, R. Honji, R. Guimarães, A. Silva. *PLOSone*

2- Artículo publicado “Building the case for a novel teleost model of non-breeding aggression and its neuroendocrine control” por L. Quintana, L. Zubizarreta, C. Jalabert, G. Batista, R. Perrone, A. Silva. *Journal of Physiology-Paris.*

3- Artículo publicado “The estrogenic pathway modulates non-breeding female aggression in a teleost fish” por L. Zubizarreta, A. Silva, L. Quintana. *Physiology and Behavior.*

4- Proceso de puesta a punto de Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masa (GC-MS) para la cuantificación de esteroides en la plataforma del IIBCE.

5- Artículo publicado “A Teleost Fish Model to Understand Hormonal Mechanisms of Non-breeding Territorial Behavior” por A. Silva, L. Zubizarreta y L. Quintana. *Frontiers in Endocrinology*.

INTRODUCCIÓN

Los mecanismos que subyacen a la plasticidad comportamental, por la cual los animales responden a contextos sociales y ambientales variables, aún no se comprenden cabalmente. Los comportamientos sociales, aunque complejos, ofrecen la oportunidad de abordar el estudio de la plasticidad comportamental y la riqueza de su modulación. En este sentido, la conducta territorial, como ejemplo de conducta social ampliamente extendida en el reino animal, puede aportar información sobre cómo los individuos integran claves externas a su contexto fisiológico para producir respuestas sociales adecuadas. En base a evidencias que sostienen que la conducta agonística media la adquisición y defensa de territorios, esta tesis reúne dos marcos conceptuales para explorar las bases neuroendócrinas de la agresión territorial de *Gymnotus omarorum*, un pez eléctrico nativo que despliega esta conducta durante todo el año, tanto en hembras como en machos. El primer marco conceptual es el ecológico, con la premisa de que al estudiar una especie silvestre es posible analizar en poblaciones naturales los mecanismos proximales resultantes de las presiones evolutivas que moldearon su conducta territorial. El segundo marco conceptual es individual y se centra en el control hormonal esteroideo de la conducta agonística de *G. omarorum*, debido a que las hormonas esteroides son clave en la integración de información social, ambiental y del estado interno para ejecutar la salida conductual adecuada. Dentro de este marco, es mucho lo que se sabe de la modulación hormonal androgénica de la agresión reproductiva entre machos, mientras que la agresión no reproductiva está mucho menos explorada. Aunar estos estos dos marcos conceptuales en un solo estudio es de por sí novedoso, y solo posible por las características especialmente ventajosas del modelo utilizado. Intentar que dialoguen y se complementen en sus hallazgos es aún más ambicioso y es uno de los principales propósitos de esta tesis.

ANTECEDENTES

TERRITORIALIDAD Y CONDUCTA AGONÍSTICA EN EL MARCO DE LA ECOLOGÍA DEL COMPORTAMIENTO.

ESPACIALIDAD

La distribución espacial de los animales en la naturaleza resulta de la interacción de los individuos con el ambiente y está fuertemente influenciada por la presencia o ausencia de alimento, predadores y coespecímenes. En una población, los individuos pueden estar agregados espacialmente o mostrar un patrón disperso (Brown y Orians 1970). Un patrón disperso no uniforme (irregular) puede deberse a la heterogeneidad en las variables ambientales o distribución de recursos relevantes para los individuos (Eason et al. 1999; Moorcroft et al. 2006; Thomas y Kunin 1999). Asimismo, una distribución irregular puede explicarse por la existencia de conducta territorial (Maher y Lott 2000; Morales et al. 2010). La territorialidad garantiza el acceso exclusivo a un determinado recurso, lo cual ofrece una ventaja competitiva y puede redundar en un aumento de la eficacia reproductiva (Davies y Hartley 1996; Grant 1997; Rubenstein y Alcock 2018).

Está ampliamente documentado en muchos vertebrados que los machos durante el período reproductivo defienden territorios y evitan la intrusión de otros machos mediante despliegues de advertencia, amenaza o agresión física (Armitage 1977; Brown 1964; Clarke 1970; Davies 1976; Pröhl 2005; Huang et al. 2011). Aunque es menos frecuente, en algunas especies la defensa territorial puede darse durante todo el año tanto en machos como en hembras (Caldwell et al. 1984; Chiver et al. 2014; Wingfield y Hahn 1994). En estos casos la defensa de un territorio puede asegurar el acceso a áreas de forrajeo durante todo el año (Davies et al. 2012).

CONDUCTA AGONÍSTICA

La conducta agonística es un comportamiento social ampliamente extendido que participa en la resolución de conflictos entre individuos de una misma especie (King 1973; Archer 1988). Un conflicto puede aparecer por defensa de crías o competencia por un recurso limitado como, por ejemplo, espacio, alimento, pareja o sitios de apareamiento, cuyo control incrementa el fitness individual (Hardy y Briffa 2013; Huntingford y Turner 1987; King 1973). Las interacciones agonísticas en general siguen las mismas fases estereotipadas, evaluación, contienda y post-resolución, e incluyen 3 tipos principales de comportamientos: despliegues de amenaza, agresión física y despliegues de sumisión (Nelson 2006; Summers y Winberg 2006). Durante las interacciones agonísticas diádicas los conflictos se resuelven cuando el individuo dominante obtiene el acceso al recurso en disputa y el subordinado es excluido del mismo (Briffa y Sneddon 2010; Nelson 2006). Cuando el recurso en disputa es el espacio, el territorio es el área de la cual los intrusos son excluidos mediante despliegues de advertencia, amenaza o ataques (Brown 1975). La evaluación de factores ambientales y sociales que determinan la calidad de un territorio se integra con los requerimientos individuales para llegar a la decisión de si competir o no por un área. Una vez iniciada la contienda, los individuos continúan evaluando los costos y beneficios de continuar compitiendo o rendirse, para lo cual integran la información de su propia capacidad de lucha (que depende del tamaño corporal y armamento, entre otras cosas), con el valor del recurso, que es variable entre individuos dependiendo de su estado reproductivo, sexo, residencia, o disponibilidad de recurso. Los factores que influencian la capacidad de lucha y la estimación del valor del recurso generalmente presentan diferencias sexuales. Incluso en especies con monomorfismo en la capacidad de lucha (por ejemplo, por no presentar diferencias en el tamaño corporal entre sexos) muchas veces se evidencia que el resultado de las contiendas es sesgado hacia uno de los sexos por valorar el recurso de manera asimétrica (por ejemplo, en lemures donde las hembras tienen más probabilidad de ser dominantes, Dunham 2008).

La diversidad y complejidad de los despliegues agonísticos en vertebrados han generado dificultades para establecer patrones claros que unifiquen los mecanismos y causas evolutivas subyacentes (Goodson y Kabelik, 2009). Por esta razón, el uso de modelos animales no tradicionales y la exploración multidisciplinaria de su comportamiento marcan el rumbo de las investigaciones actuales que intentan comprender las bases neuroendócrinas de esta conducta tan extendida en vertebrados (Blumstein et al. 2010). La agresión en machos es un comportamiento más conspicuo que en hembras, cuya interpretación desde el punto de vista de la selección natural es más simple: un aumento de la eficacia reproductiva (Emlen y Oring 1977; Shuster y Wade 2003; Trivers 1996). La agresión entre hembras es muy extendida, y se ha demostrado en contextos en los cuales las hembras compiten por rango, territorios y acceso a pareja, sin embargo, ha sido relegada de las investigaciones y es mucho menos lo que se sabe de sus mecanismos proximales de control (Rosvall 2011; Cain y Rosvall 2014).

DETERMINANTES DEL TERRITORIO

El estudio de la modulación de la conducta territorial en especies silvestres es especialmente adecuado para explorar los mecanismos que subyacen a la plasticidad comportamental. En la conducta territorial, los animales primero detectan las claves ambientales y sociales que determinan el valor del territorio, luego integran esta información con sus requerimientos individuales y capacidad de lucha, y finalmente evalúan si competir por un área o no. Por lo tanto, la distribución espacial de individuos de una especie territorial aporta información sobre cómo los animales integran sus características individuales con factores ambientales y sociales. La variación en la habilidad para la obtención y defensa de un territorio puede generar diferencias en el tamaño del mismo, ya que características como el tamaño corporal, el sexo, y el estado reproductivo determinan la capacidad de lucha e influyen sobre la estimación del valor del recurso (Smith y Parker 1976; Hurd 2006; Piper et al. 2015; Metcalfe et al. 2016; Nolen et al. 2017). El tamaño corporal se

asocia con el tamaño territorial en muchas especies, posiblemente por determinar directamente los requerimientos metabólicos. Asimismo, el tamaño corporal influencia el resultado de las contiendas agonísticas, y el tamaño territorial (Adams 2001; Butchart et al. 1999; Elliott 1990; Keeley 2000). En especies que despliegan defensa territorial en ambos sexos, las asimetrías en la capacidad de lucha y factores motivacionales pueden provocar diferencias sexuales en el tamaño territorial. Durante el período reproductivo las asimetrías en el valor del recurso son lo más esperable, incluso para las especies con monomorfismo en la capacidad de lucha (Alexander 1974). Por ejemplo, en ardillas (*Sciurus vulgaris*), los machos poseen territorios de mayor tamaño que las hembras, a pesar de presentar monomorfismo en el tamaño corporal (Wauters y Dhondt 1992). En lagartijas (*Sceloporus virgatus*), las hembras son a menudo más territoriales que los machos debido a razones motivacionales (Smith 1985).

BASES NEUROENDÓCRINAS DE LA TERRITORIALIDAD Y LA CONDUCTA AGONÍSTICA

HORMONAS ESTEROIDES

Las hormonas esteroides son actores fundamentales en la regulación de todos los comportamientos sociales, incluida la agresión. Las hormonas esteroides coordinan respuestas conductuales integradas a claves fisiológicas, sociales y ambientales (Hirschenhauser y Oliveira 2006; McEwen y Wingfield 2003). La estructura básica compartida por los esteroides consta de 3 anillos hexagonales y un pentágono, la cual está conservada y es utilizada para señalización interna en todos los metazoarios (Pfaff y Joëls 2017). Las variaciones en estructuras asociadas a los anillos, o dobles enlaces dentro de ellos dan como resultado diferentes hormonas esteroides, que son idénticas entre especies, a diferencia de las hormonas peptídicas que tienen variaciones estructurales interespecíficas. Las categorías de esteroides pueden ser clasificadas de acuerdo con la estructura química, fuente de producción, y funciones fisiológicas. En vertebrados, una categoría son los

esteroides sexuales, producidos principalmente por los ovarios y testículos en vertebrados. Estos esteroides son los andrógenos, estrógenos y progestágenos. Otra categoría son los corticosteroides, producidos principalmente por la corteza adrenal o tejido interrenal (en peces y anfibios). Independientemente de la clasificación de acuerdo con la fuente, los esteroides pueden producirse en células localizadas fuera de las gónadas y adrenales, como el tejido adiposo y el cerebro. Algunos esteroides presentan variaciones entre especies; por ejemplo, en peces y primates el principal corticosteroide es el cortisol, mientras que en roedores es la corticosterona (Adkins-Regan 2005). Otro ejemplo puede ser el caso de la 11-Cetotestosterona, un andrógeno presente en grandes concentraciones en peces teleósteos, y ausente en muchos taxa (Borg 1994). Lo que determina las diferencias de producción entre tejidos y diferencias interespecíficas es la variación en la expresión de enzimas esteroidogénicas. Las vías de producción y metabolismo esteroideo están bien descriptas y se ilustran esquemáticamente en la Figura 1. Las vías de síntesis comienzan con el colesterol, que proviene de lipoproteínas plasmáticas, y la enzima que sintetiza los esteroides a partir del colesterol es la citocromo p450scc. La secreción y concentración de los esteroides se regula principalmente por la tasa de síntesis, y metabolismo, ya que el almacenamiento es casi nulo. En las vías sintéticas hay reacciones reversibles, y otras irreversibles. Una reacción irreversible, foco principal de esta tesis, es la aromatización de andrógenos (como la testosterona y androstenediona) por la citocromo p450arom, también llamada aromatasa, para producir estrógenos (17β- Estradiol o estrona, abreviados como E2 y E respectivamente). Estas hormonas se consideran productos terminales en la vía biosintética de hormonas esteroides, así como también algunos andrógenos no aromatizables, como la 11-cetotestosterona (Fig. 1).

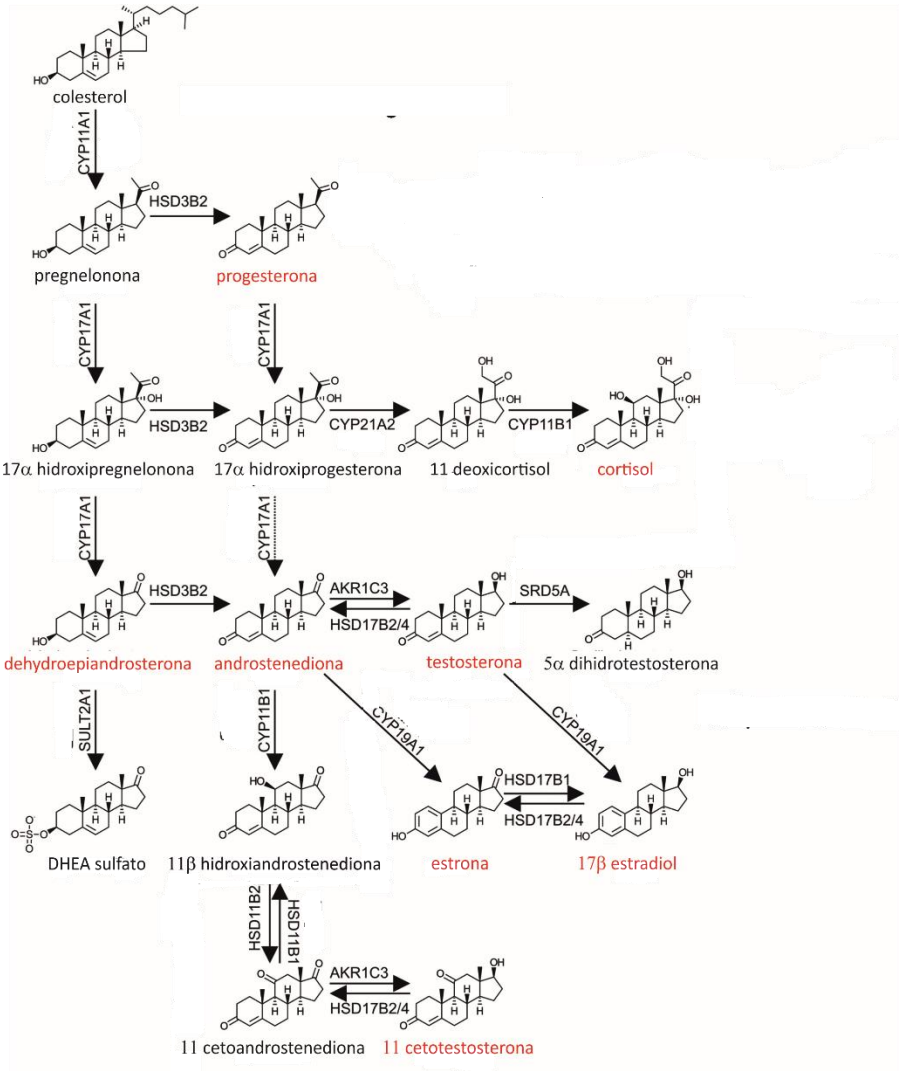

Figura 1: Esquema simplificado de vías de síntesis de esteroides. En rojo se ilustran los esteroides cuantificados en el Capítulo III de esta tesis.

Las hormonas esteroides modulan la conducta a través de dos mecanismos de acción. El primero es mediado por receptores intracelulares que actúan como factores de transcripción (Fowler et al. 2003; Harding 1992; Micevych et al. 2005). En este modo de acción los esteroides actúan como factores “permisivos” pero no son por lo general el gatillo de la conducta, y deben estar presentes en altas concentraciones y de manera sostenida. Por ejemplo, las hormonas esteroides pueden cambiar los umbrales para que otros factores modulen la salida comportamental, y así afectar por ejemplo el umbral de respuesta frente al estímulo de un co-especimen. El concepto de las hormonas como factores “permisivos” de una conducta dependiendo del contexto, se vuelve especialmente importante en la consideración de las conductas sociales. A pesar de que el rol de las hormonas

esteroides como factores permisivos es el más estudiado, estudios recientes han demostrado que existe síntesis local de hormonas esteroides en el cerebro y se ha descubierto que también ejercen acciones rápidas mediadas por receptores de membrana, similares a las de los neuromoduladores (Remage-Healey 2014).

MODULACIÓN HORMONAL DE LA AGRESIÓN TERRITORIAL

A pesar de que los despliegues de los comportamientos agonísticos presentan un alto grado de variabilidad, los circuitos neurales subyacentes a estas conductas, los ejes endócrinos que los regulan (ej.: hipotálamo-hipófisis-gonadal) y las hormonas involucradas (ej.: andrógenos, estrógenos, neuropéptidos hipotalámicos) se encuentran altamente conservados en vertebrados (Goodson 2005). Las áreas del cerebro asociadas al control de los comportamientos sociales son un conjunto de núcleos interconectados conocido como Red del Comportamiento Social (Social Behavior Network, SBN; (Goodson y Kabelik 2009). Más recientemente esta red se ha ampliado con la inclusión de áreas del sistema de recompensa, a lo que se conoce como la Red de Toma de Decisiones Sociales (Social decision making network, (O' Connell y Hofmann 2011; O' Connell y Hofmann 2012). Los nodos de la SBN incluyen la amígdala, el área preóptica (APO) y ventro-medial del hipotálamo, el septum lateral, y los núcleos mesencefálicos. Una característica común a los nodos de la SBN es poseer receptores de hormonas esteroides y neuropéptidos hipotalámicos, lo que señala la relevancia de estas hormonas en la regulación de la actividad de esta red (Goodson y Kabelik 2009). Se postula que el patrón de activación espacio temporal de los núcleos que componen el SBN difiere según la situación conductual en la que se encuentra el animal. De esta manera, por ejemplo, los circuitos neurales que gobiernan conductas tan diferentes como la agresión y la reproducción poseen elementos neurales compartidos, aunque activados en forma diferente dependiendo del contexto.

A mediados del siglo XIX los experimentos pioneros de Berthold (revisado en Soma 2006) establecieron que un factor testicular (luego descripto como testosterona)

promovía las características sexuales secundarias y la agresión en gallos, sentando las bases de la endocrinología conductual. El estudio de la regulación endócrina de la agresión territorial ha sido mayormente abordado en machos reproductivos, en los cuales se ha establecido como principio general que los niveles elevados de andrógenos gonadales promueven la agresión (Fig. 2A; revisado en Cunningham et al. 2012; Fuxjager et al. 2017). Aunque la testosterona es una hormona fundamental en la regulación de la agresión en machos, muchos estudios que hilaron más fino demostraron que la relación entre los andrógenos circulantes y la agresión es más compleja. Otros factores como la expresión diferencial de receptores, síntesis cerebral de esteroides, o el contexto social juegan un papel fundamental en los efectos de los andrógenos circulantes en la agresión. En 1990 se demostró por primera vez que la aromatización de andrógenos a estrógenos es necesaria para el despliegue de agresión en machos de codorniz *Coturnix coturnix japonica* (Schlinger y Callard 1990). Luego se mostró en otras especies que las acciones androgénicas sobre la agresión en machos están mediadas en parte por la aromatasa (Fig. 2B; revisado en Trainor et al. 2006). Más adelante, dos modelos alternativos ofrecieron nuevas miradas sobre la regulación hormonal de la agresión: la agresión en hembras (Renn et al. 2012; Rosvall et al. 2012; Rubenstein y Wikelski 2005; Scaia et al. 2018), revisado en (Rosvall 2011; Duque-Wilckens y Trainor 2017; Rosvall et al. 2019); y la agresión fuera del período reproductivo (revisado en Soma et al., 2008, 2015).

La agresión en hembras es prevalente en muchas especies, y, además de la bien documentada agresión maternal (Mayer y Rosenblatt 1987; Smiley et al. 2019), las hembras pueden competir por rango jerárquico, territorios o acceso a pareja (revisado en Rosvall 2013). En particular la agresión territorial en hembras ha sido reportada en peces, reptiles, aves y mamíferos (revisado en Duque-Wilckens y Trainor 2017). Tanto la testosterona como los estrógenos pueden incrementar la agresión en hembras (Rubenstein y Wikelski 2005; Scaia et al. 2018; Woodley y Moore 1999), revisado en (Rosvall et al. 2019), aunque el efecto de los estrógenos

sobre la agresión puede variar, dependiendo del subtipo de receptor involucrado (Clipperton-Allen et al. 2010; Clipperton-Allen et al. 2011).

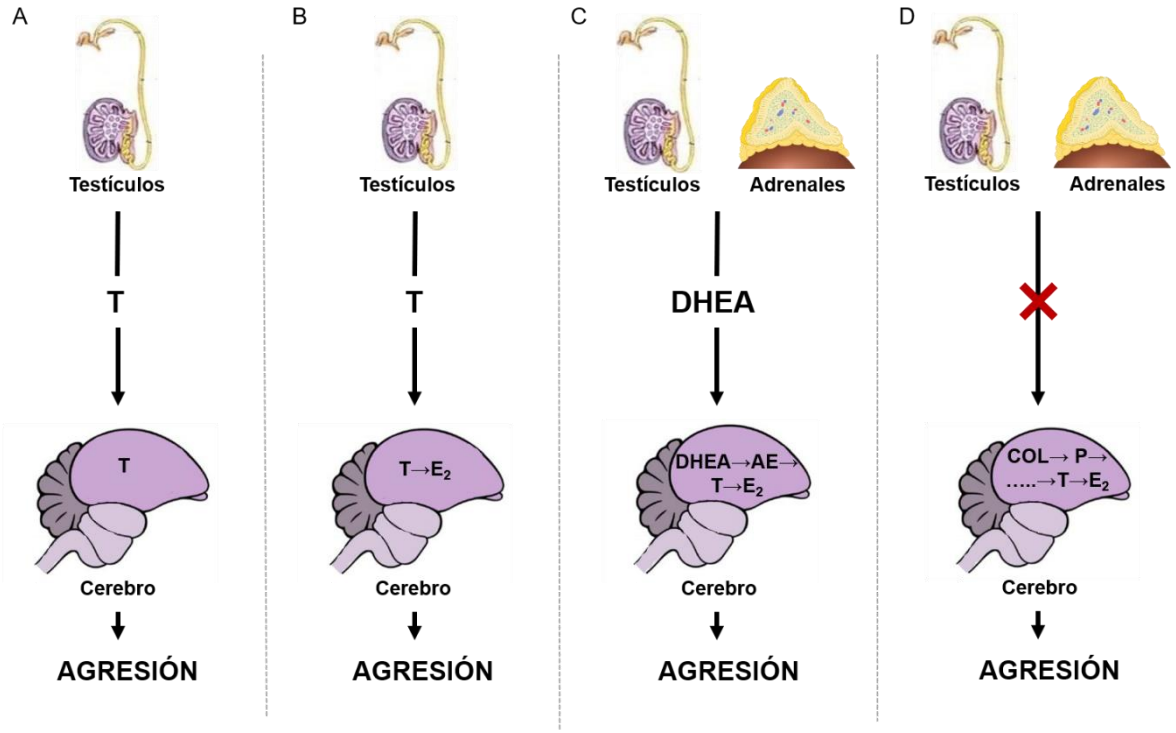

Figura 2: Vías por las cuales los esteroides sexuales pueden modular la conducta agonística en machos. A- La testosterona gonadal actúa directamente en el cerebro. B- La testosterona gonadal se aromatiza a 17β-estradiol en el cerebro. C- La DHEA adrenal se convierte en testosterona y 17β-estradiol en el cerebro. D- La testosterona y el 17β-estradiol se producen *de novo* en el cerebro a partir del colesterol.
El cambio de una señalización circulante (A y B), a una producción cerebral local (C y D) usualmente se acompaña de un cambio en los mecanismos de acción esteroideos; es decir, de acciones lentas genómicas en A y B, a acciones rápidas no genómicas en C y D. Modificado de (Jalabert et al., 2018)**.**
CHOL=colesterol; PREG=pregnenolona; DHEA=dehidroepiandrosterona; AE=androstenediona; T=testosterona; E2=17β-estradiol.

La agresión territorial fuera del período reproductivo ha sido reportada en diversas especies y constituye un paradigma ideal para estudiar la neuromodulación de la agresión con independencia del factor gonadal (Logan y Wingfield 1990; Jasnow et al. 2000; Hau et al. 2004). La agresión territorial en este período (en el que las gónadas regresadas sintetizan niveles muy bajos de esteroides) es independiente de la T circulante (Logan y Wingfield 1990; Hau et al. 2004; Soma et al. 2008a). De

hecho, la castración no disminuye la conducta agresiva territorial en varias especies (Wingfield 1994; Pinxten et al. 2000). Se ha observado incluso que los machos de estas especies no aumentan los niveles de T en interacciones agresivas cuando se le presenta un intruso dentro de su territorio fuera del período reproductivo (Wingfield y Monk 1994; Wingfield et al. 2006). El mantenimiento de la agresividad en el período no reproductivo, con bajos niveles plasmáticos de esteroides sexuales, puede ser explicado por al menos dos mecanismos que involucran igualmente a las hormonas esteroides (Wingfield et al. 2001). a- Precursores inertes de esteroides son sintetizados en los órganos periféricos y convertidos a hormonas esteroides bioactivas en el cerebro. En aves se encontraron elevadas concentraciones plasmáticas de dehidroepiandrosterona (DHEA, un precursor adrenal de hormonas esteroides) y la capacidad de metabolizarlo a nivel central (Fig. 2C). El tratamiento con DHEA aumenta la agresividad (Soma et al. 2008b) y sus niveles plasmáticos correlacionan con la agresividad en machos (Hau et al. 2004). b- Síntesis *de novo* de esteroides sexuales en el cerebro a partir del colesterol, independientemente de las gónadas y otros tejidos periféricos (Fig. 2D). Este proceso fue reportado en mamíferos (Tsutsui et al. 2000) y aves (Soma et al. 2008b; Pradhan et al. 2010).

Los estrógenos sintetizados en el cerebro tienen un rol preponderante en la regulación de la agresión no reproductiva en machos, actuando mayormente a través de mecanismos rápidos (Demas et al. 2007; Tsutsui y Yamazaki 1995; Soma et al. 2000). En machos de aves y mamíferos que despliegan agresión no reproductiva, el tratamiento con E2 promueve rápidamente la agresión (Trainor et al. 2007; Trainor et al. 2008; Heimovics et al. 2015; Laredo et al. 2013; Merritt et al. 2018), revisado en (Heimovics et al. 2015), mientras que la inhibición aguda de la aromatasa disminuye los niveles de agresión no reproductiva en machos de aves y peces (Soma et al. 2000; Jalabert et al. 2015). La regulación de la agresión no reproductiva en hembras ha sido abordada en pocas especies. En modelos de aves hay evidencia que apoya el involucramiento de la DHEA y testosterona circulantes (Gill et al. 2007; Hau et al. 2004), mientras que en el hámster dorado la agresión no reproductiva es independiente de las hormonas ováricas (Fleming et al. 1988). En el hámster siberiano, las hembras no reproductivas a pesar de exhibir bajos niveles

de hormonas gonadales, despliegan agresión de manera robusta asociada a un aumento de la sensibilidad cerebral al E2 (Rendon et al. 2017; Scotti et al. 2007). Por lo tanto, mientras que los efectos rápidos de los estrógenos han sido documentados en la agresión no reproductiva de machos, actualmente no está claro si este tipo de modulación ocurre en hembras no reproductivas.

GYMNOTUS OMARORUM COMO MODELO PARA ESTUDIAR LAS BASES NEUROENDÓCRINAS DE LA AGRESIÓN

La agresión territorial disociada del período reproductivo se ha reportado en diversos taxa, incluyendo aves (Logan y Wingfield 1990; Gwinner et al. 1994; Wingfield y Monk 1994; Soma et al. 1999), mamíferos (Caldwell et al. , 1984; Jasnow et al. 2000; Demas et al. 2007), reptiles (Moore y Marler, 1987), y peces (Batista et al. 2012; Vullioud et al. 2013). Estas especies ofrecen la oportunidad de estudiar cómo las variables ambientales y características individuales se relacionan con el tamaño territorial, aún en ausencia de hormonas gonadales. El pez eléctrico *Gymnotus omarorum* despliega el único ejemplo conocido hasta el momento en teleósteos de agresión territorial intra- e inter-sexual durante todo el año. Se caracteriza por no presentar dimorfismo sexual morfológico ni electrofisiológico y por ser un reproductor estacional (Richer-de-Forges et al. 2009). Es una especie autóctona abundante, por lo que es posible implementar estudios de la ecología del comportamiento directamente en poblaciones naturales. Es una especie ampliamente utilizada como modelo neuroetológico, cuyo nombre homenajea a Omar Trujillo-Cenoz y Omar Macadar, los dos pioneros que iniciaron el estudio de los peces eléctricos en Uruguay, quienes lideraron investigaciones sobre la anatomía fisiología y biofísica de la electrogeneración. Al igual que todos los peces eléctricos sudamericanos, *G. omarorum* emite una descarga eléctrica (DOE) de manera continua, que forma parte de un sistema sensorial activo (electrogeneración/electrorrecepción). Asimismo, modificaciones en la frecuencia y la forma de onda de la DOE constituyen señales de comunicación, utilizadas en los comportamientos sociales.

La agresión territorial no reproductiva de *G. omarorum* es un comportamiento robusto que se desencadena en una arena neutral por la presencia de un coespecimen tanto en machos como en hembras (Batista et al. 2012). La conducta agonística no reproductiva de *G. omarorum* ha sido descripta en detalle, e incluye un florido repertorio de despliegues locomotores y eléctricos (Fig. 3). Los conflictos presentan una fase de evaluación muy corta, luego de la cual los individuos muestran una escalada agresiva que termina cuando el subordinado deja de atacar y huye (Batista et al. 2012; Zubizarreta et al. 2015). Los subordinados señalizan su sumisión eléctricamente utilizando tres tipos de señales de manera secuencial: interrupciones de la DOE, aumentos transitorios de la frecuencia de la DOE con distorsión de la forma de onda (chirps), y por último una disminución sostenida de la frecuencia basal de la DOE luego de la resolución del conflicto (Batista et al. 2012; Perrone y Silva 2018; Silva et al. 2013). Una vez que el estatus de dominancia/subordinación se establece, no se revierte y el pez dominante excluye al subordinado del territorio de manera mantenida (Perrone et al. 2019), constituyendo un claro ejemplo en que la conducta agonística media la adquisición y defensa del territorio.

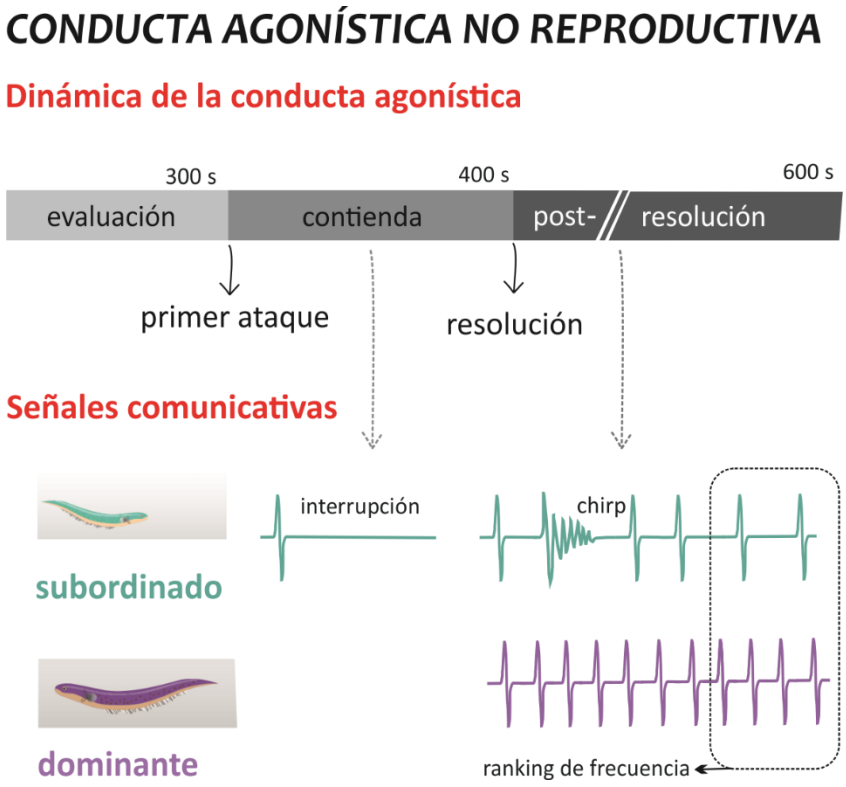

Figura 3: Esquema representativo de la conducta agonística no reproductiva en *Gymnotus omarorum*. Dinámica de los encuentros agonísticos territoriales. Los conflictos presentan tres fases; 1- Evaluación: desde la apertura de la compuerta a la ocurrencia del primer ataque; 2- Contienda: desde la ocurrencia del primer ataque hasta la resolución (el subordinado se retira y no vuelve a atacar); C- Post-resolución: se analizan 10 minutos luego de la resolución del conflicto. Se ilustran las señales eléctricas de comunicación: Interrupción de la descarga del órgano eléctrico (DOE), chirp, y ranking de frecuencia de la DOE (el dominante mantiene una frecuencia mayor que el subordinado luego de la resolución del conflicto).

En esta inusual conducta agonística territorial no reproductiva, el resultado de una contienda depende del tamaño corporal, y el sexo no impacta en la probabilidad de ser dominante (Batista et al. 2012). La agresión territorial no reproductiva de *G. omarorum* es independiente de hormonas gonadales, ya que la gonadectomía no afecta la conducta agonística no reproductiva en machos (Jalabert et al. 2015). Esto demuestra que los bajos niveles de andrógenos gonadales circulantes que presentan estos animales no reproductivos no son necesarios para la ocurrencia de esta conducta. El rol de los estrógenos extra-gonadales se confirmó en machos, donde la inhibición a corto plazo de la aromatasa provoca una distorsión de la dinámica de las contiendas, una disminución de los niveles de agresión/sumisión y una dificultad para la resolución del conflicto (Jalabert et al. 2015).

Figura 3: *Gymnotus omarorum* como modelo para estudiar las bases neuroendócrinas de la agresión territorial no reproductiva.

HIPÓTESIS, ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN Y OBJETIVOS

PUNTOS DE PARTIDA

Gymnotus omarorum es una especie especialmente ventajosa con la que hemos construido un modelo para analizar las bases neuroendócrinas de la agresión territorial. La agresión de *G. omarorum* es desplegada en hembras y machos todo el año, y su estudio es abordable tanto en poblaciones naturales como en el laboratorio.

La territorialidad en vertebrados se ha estudiado mayormente durante el período reproductivo y se acepta que el espaciamiento de los individuos resultante es influenciado por características sexualmente dimórficas como son el tamaño corporal y las hormonas gonadales. En la especie sexualmente monomórfica *G. omarorum* sabemos que la conducta agonística media la adquisición de territorios en el laboratorio en el período no reproductivo, cuando el tamaño corporal es el único predictor del resultado de las contiendas. Asumiendo que la distribución y tamaño de territorios de *G. omarorum* en la naturaleza también se establecen y mantienen por interacciones agonísticas, este modelo ofrece la oportunidad de estudiar el espaciamiento en el hábitat natural y de analizar factores individuales determinantes del tamaño territorial y sus variaciones estacionales.

La aromatización de andrógenos a estrógenos ha sido reportada como moduladora de la agresión entre machos reproductivos en muchas especies, mientras que el rol de los estrógenos en la regulación de la agresión en hembras reproductivas es variable. La neurosíntesis de estrógenos ha sido reportada como un elemento fundamental en la expresión de agresión no reproductiva en aves y mamíferos. Para avanzar en la comprensión del control neuroendócrino de la agresión, y dado que los estrógenos son hormonas clave en las hembras, *G. omarorum* surge como un modelo ideal para evaluar el rol de los neuroestrógenos en la subestimada agresión intrasexual femenina, particularmente no reproductiva, en la que se minimiza el

factor gonadal. En machos no reproductivos de esta misma especie, la dominancia y los niveles de agresión son dependientes de la aromatasa. Es relevante evaluar si la dependencia estrogénica es generalizable a hembras no reproductivas, así como analizar en los dos sexos las fuentes esteroideas que mantienen la territorialidad no reproductiva.

En base a los puntos de partida se proponen las siguientes hipótesis:

HIPÓTESIS DE TRABAJO

1. En poblaciones naturales la territorialidad en *Gymnotus omarorum* es expresada todo el año. En período no reproductivo el tamaño territorial es sexualmente monomórfico y depende del tamaño corporal. En período reproductivo el tamaño territorial depende de variables sexualmente dimórficas.

2. En el período no reproductivo la agresión territorial es mantenida por neurosíntesis de estrógenos en ambos sexos.

ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

Las hipótesis se pusieron a prueba de manera multidisciplinaria, analizando la territorialidad en el hábitat natural, utilizando abordajes conductuales-farmacológicos, y de cuantificación hormonal.

La hipótesis de trabajo #1 fue plausible de ser abordada porque *Gymotus omarorum* es una especie silvestre que ofrece la oportunidad de estudios en su ambiente natural. La elección de la aproximación en el campo respondió a la necesidad de aumentar el número de trabajos de plasticidad comportamental en la naturaleza debido al valor de estos modelos. La complejidad del abordaje de campo implica a su vez ventajas y desventajas. Por un lado, es la opción óptima ya que en el ambiente natural están presentes las presiones evolutivas y el contexto ecológico

completo donde se desarrolla la defensa territorial. La mayor desventaja del abordaje de campo en el caso de *G. omarorum* es la imposibilidad de la observación directa de los individuos debido a las características del hábitat, que en este trabajo se sustituye por la estimación de los tamaños territoriales mediante la detección eléctrica individual.

Al ser el primer estudio de estas características en *G. omarorum*, inicialmente se buscó caracterizar la población y las variables ambientales relacionadas a la distribución de los individuos. Luego, se pusieron a prueba predicciones derivadas de estudios previos de laboratorio durante el período no reproductivo. Las características de la agresión territorial no reproductiva en el laboratorio generaron la predicción que los territorios fueran sexualmente monomórficos y que el tamaño corporal correlacionara con el tamaño territorial. En contraposición, en el período reproductivo se predijo la aparición de dimorfismo sexual en los factores que impactan en el tamaño territorial. En el estudio de campo se evidenció la estacionalidad en los determinantes de los territorios, que podría resumirse como el dimorfismo sexual en el período reproductivo y el monomorfismo en el período no reproductivo.

La hipótesis de trabajo #2 se abordó con farmacología conductual y cuantificación hormonal. Testear la necesidad de la vía estrogénica o androgénica en la expresión de agresión territorial se justificó en dos conjuntos de evidencias: a- existen cambios rápidos de esteroides asociados a las conductas sociales, y b- la aromatasa está involucrada en la regulación de la agresión no reproductiva. Si un pico de andrógenos o estrógenos es necesario para el despliegue de la conducta, la predicción es que antagonizar la vía responsable provocará una distorsión de la agresión. Un pico de andrógenos puede actuar directamente sobre receptores de andrógeno (acción directa), o provocar concomitantemente un pico de estrógenos (acción indirecta). Por otro lado, un pico de estrógenos se puede generar también por la activación de la aromatasa a partir de andrógenos presentes en condiciones basales. Para disecar la acción rápida androgénica directa se utilizó un bloqueante competitivo de los receptores de andrógeno (CYP, acetato de ciproterona), y la vía estrogénica se disecó mediante un inhibidor de la aromatasa (FAD, fadrozole). Para

poner a prueba las predicciones se realizaron encuentros diádicos entre hembras no reproductivas en la estación experimental del IIBCE. Los grupos tratados consistieron en la inyección de CYP o FAD a los dos individuos de la díada una hora previa a la contienda, y se compararon con contiendas control inyectadas con vehículo.

Una vez probado que la síntesis de estrógenos estaba involucrada en el despliegue de agresión no reproductiva el paso siguiente fue a- determinar el posible precursor circulante; b- buscar estrógenos cerebrales o esteroides que pudieran oficiar de sustrato de neuroestrógenos; y c- evaluar si existía evidencia de neurosíntesis en condiciones basales. Para esto era fundamental desarrollar un método de cuantificación que permitiera medir múltiples hormonas en una misma muestra a nivel individual, y que permitiera la cuantificación simultánea de los niveles circulantes y cerebrales. Con este objetivo, se comenzó el desarrollo de la técnica de Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masa (GC-MS) en el equipo institucional del IIBCE, pero no se alcanzó la sensibilidad y repetibilidad necesaria para la cuantificación en muestras problema de animales no reproductivos. Como segunda aproximación, realicé una pasantía en el laboratorio de Kiran Soma en la University of British Columbia, donde concreté la puesta a punto de un método de extracción para muestras de cerebro de *Gymnotus*, con posterior cuantificación por Cromatografía Líquida asociada a Espectrometría en tándem Masa/Masa (LC-MS/MS). Mediante este método se realizaron las cuantificaciones de los niveles basales de plasma y cerebro anterior de hembras y machos no reproductivos colectados en el ambiente natural.

OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

De la hipótesis de trabajo #1 se desprende el siguiente objetivo general y los siguientes objetivos específicos a abordar de acuerdo con la estrategia:

I. Analizar en la naturaleza en período reproductivo y no reproductivo el tamaño territorial individual de *Gymnotus omarorum*, la distribución de los individuos en la población y los factores determinantes.

I.A. Caracterizar el hábitat de *G. omarorum,* el patrón de distribución de la especie y las características poblacionales.
I.B. Evaluar los factores ambientales que impactan en la distribución de los individuos.
I.C. Evaluar las variables individuales que influyen en el tamaño de los territorios.
I.D. Evaluar las diferencias estacionales en el tamaño de los territorios y sus determinantes.

De la hipótesis de trabajo #2 se desprenden los siguientes objetivos generales y específicos a abordar de acuerdo con la estrategia:

II. Estudiar la relevancia de la vía estrogénica y androgénica rápida en la regulación de la agresión territorial no reproductiva en hembras de *Gymnotus omarorum*.

II.A. Caracterizar la agresión territorial no reproductiva entre hembras de *Gymnotus omarorum*.
II.B. Evaluar el rol de la vía estrogénica en la agresión territorial no reproductiva en la agresión intrasexual de hembras no reproductivas.
II.C. Evaluar el rol de la vía androgénica en la agresión territorial no reproductiva en la agresión intrasexual de hembras no reproductivas.

III. Estudiar los perfiles esteroideos cerebrales y circulantes basales de adultos no reproductivos

III.A. Poner a punto un método de cuantificación de esteroides que permita la cuantificación simultánea de múltiples hormonas en plasma y cerebro a nivel individual en animales no reproductivos

III.B. Caracterizar el perfil esteroideo plasmático de hembras y machos no reproductivos. Realizar la comparación sexual.

III.C. Caracterizar el perfil esteroideo cerebral de hembras y machos no reproductivos. Realizar la comparación sexual.

III.D. Comparar los niveles hormonales plasmáticos entre plasma y cerebro.

ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

La introducción y antecedentes de esta tesis dieron lugar a un Ensayo en el Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay (*Aceptado*).

Los resultados organizan en los siguientes capítulos. El Capítulo I, que corresponde al Objetivo general I, se centra en el estudio de la estacionalidad en los determinantes de los tamaños territoriales en una población natural de *Gymnotus omarorum*. Este capítulo ha dado lugar a un artículo publicado en PLOSone titulado "Seasonal and social factors associated with spacing in a wild territorial electric fish" por L. Zubizarreta, L. Quintana, D. Hernández, F. Texeira de Mello, M. Meerhoff, R. Honji, R. Guimarães, A. Silva (*Anexo 1*). El Capítulo II, que corresponde al Objetivo general II, tiene como piedra fundamental la descripción exhaustiva de la agresión territorial no reproductiva en hembras, y luego sobre la conducta abona a la hipótesis de la neurosíntesis de estrógenos en el mantenimiento de la agresión femenina. La primera parte del Capítulo II compone un artículo publicado en Journal of Physiology-Paris que presenta el modelo de agresión territorial no reproductiva de *G. omarorum* titulado "Building the case for a novel teleost model of non-breeding aggression and its neuroendocrine control" por L. Quintana, L. Zubizarreta, C. Jalabert, G. Batista, R. Perrone, A. Silva (*Anexo 2*). La segunda parte del Capítulo II dio lugar al artículo publicado en Physiology and Behavior titulado "The estrogenic pathway modulates non-breeding female aggression in a teleost fish" por L. Zubizarreta, A. Silva, L. Quintana (*Anexo 3*). El Capítulo III, que corresponde al Objetivo general III, presenta el proceso de puesta a punto de un método de extracción para realizar un perfil hormonal en cerebro y plasma de animales no reproductivos primero por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (realizado en el IIBCE, Uruguay, *Anexo 4*), y luego por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (realizado en el laboratorio de Kiran Soma en la University of British Columbia, Canadá). Una vez descripta la puesta a punto la técnica, los resultados de la cuantificación de cerebro y plasma por LC-MS/MS en hembras y machos colectados en la naturaleza se presentan en la segunda parte del Capítulo III. Estos resultados han sido presentados en un seminario del grupo

de Behavioral Neuroscience en la UBC y en el II Congreso Nacional de Biociencias, y componen un manuscrito en preparación cuyos autores son L. Zubizarreta, C. Jalabert, C. Ma, A. Silva, KK. Soma, y L. Quintana. En el Capítulo IV se presenta la discusión general, parte de la cual ha dado lugar a una revisión publicada en Frontiers in Endocrinology, “A Teleost Fish Model to Understand Hormonal Mechanisms of Non-breeding Territorial Behavior” por L. Quintana, L. Zubizarreta y A. Silva (*Anexo 5*). Por último, en el Capítulo V se describen las perspectivas derivadas de esta tesis, que componen 2 líneas de investigación de proyección postdoctoral.

CAPÍTULO I. ESTACIONALIDAD EN LOS FACTORES QUE IMPACTAN EN EL TAMAÑO DE LOS TERRITORIOS EN LA NATURALEZA

I. Analizar en la naturaleza en período reproductivo y no reproductivo el tamaño territorial individual, la distribución de los individuos en la población y los factores determinantes.

I.A. Caracterizar el hábitat de *G. omarorum,* el patrón de distribución de la especie y las características poblacionales.

I.B. Evaluar los factores ambientales que impactan en la distribución de los individuos.

I.C. Evaluar las variables individuales que influyen en el tamaño de los territorios.

I.D. Evaluar las diferencias estacionales en el tamaño de los territorios y sus determinantes.

MÉTODOS

Área de estudio y estaciones de muestreo

El trabajo de campo se realizó en la Laguna de los Cisnes, Uruguay (205 ha, 34° 48′ S, 55° 18′ W), que consiste en un sistema dulceacuícola de tres partes interconectado (profundidad máxima 5 m) (Fig. I.1A, (Marroni et al. 2014)). *Gymnotus omarorum* es la única especie de pez eléctrico presente en el área de estudio. La zona litoral de la laguna está cubierta por una franja de macrófitas (5-40 m ancho) que cubren el área de muestreo (Fig. I.1B). Entre las raíces de las plantas acuáticas se encuentran típicamente los individuos de *G. omarorum* en su fase de reposo (Richer-de-Forges et al. 2009).

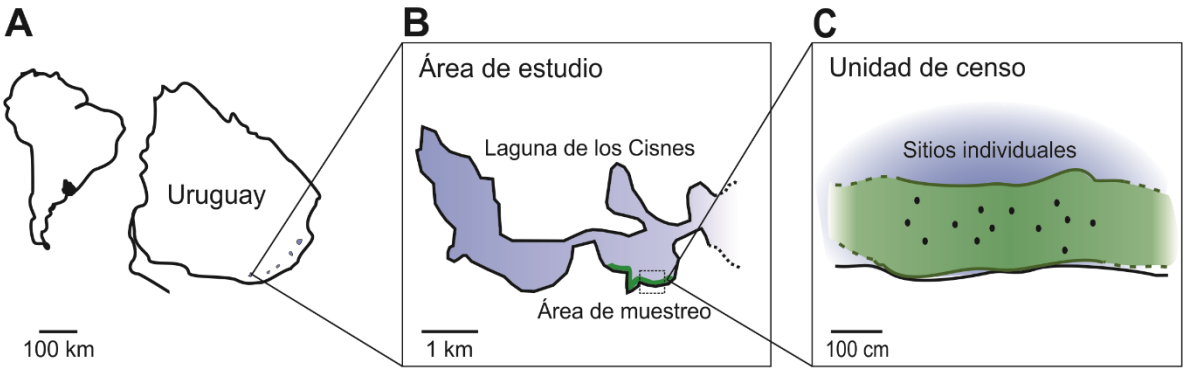

Figura I.1: Área de estudio y método de muestreo. A. El sitio de estudio se localiza en Maldonado, Uruguay, en la Laguna de los Cisnes. B. La zona litoral de la laguna está cubierta por vegetación acuática que crean una mata extensa que constituye el área de muestreo. C. Unidad de censo ilustrando los sitios individuales. La localización de los peces en los sitios individuales se llevó a cabo mediante un censo eléctrico (Estudio 1). Una vez que se localiza un individuo, en el sitio se toman medidas de la concentración de O_2 disuelto en agua, temperatura y la frecuencia de la DOE. En el Estudio 2, los sitios individuales se volvieron a visitar siguiendo la misma secuencia, se colectaron los peces y se tomaron las características individuales.

Siguiendo a Quintana et al. (2004), quien describió el período reproductivo de los peces eléctricos en esta región de diciembre a febrero (verano), los datos se colectaron en diciembre, correspondiendo al período reproductivo temprano antes de la aparición de los alevines (Quintana et al. 2004), y de junio a agosto (invierno, período no reproductivo).

Muestreo

El área de muestreo fue homogénea en cuanto a profundidad, distancia a la orilla y composición de vegetación. El área de muestreo se dividió en transectas adyacentes denominadas unidades de muestreo (Fig. I.1B, C; definidas más adelante), las cuales fueron estudiadas en diferentes días sin repetir sitios. El muestreo se realizó durante el día, que corresponde a la fase de reposo de la especie (Migliaro et al. 2018), y se llevó a cabo en dos etapas: la primera (Estudio 1) durante la mañana (0800-1200h), y la segunda (Estudio 2) durante la tarde (1300-1800h).

Estudio 1: Censo eléctrico y variables ambientales.

Con el objetivo de obtener la distribución espacial de los individuos, realizamos un censo eléctrico durante la fase de reposo de los animales. Se midió la distancia de cada individuo con su vecino más cercano (DNN por su significado en inglés distance to the nearest neighbor) tanto en el período reproductivo como en el no reproductivo. La DNN se utilizó como una estimación del tamaño de territorio. Si bien este es un abordaje simplificado, los animales que presentan agresión territorial despliegan una disminución en la defensa territorial a medida que la distancia al centro del territorio aumenta (Adams 2001; Brown y Orians 1970). Este estudio se realizó durante la fase de reposo de *G. omarorum*, y la especie muestra fidelidad al sitio, lo que hace pensar que probablemente se encuentren en el centro de sus territorios en el momento que se realiza el censo eléctrico. El censo eléctrico se llevó a cabo localizando los individuos con un amplificador de audio conectado a un par de electrodos, como fue descripto previamente (Silva et al. 2003) y los individuos se localizaron por sus DOEs cuando el sonido alcanza su mayor amplitud (el rango de detección es 60 cm). Debido a que la frecuencia de la DOE se incrementa frente a un estímulo novedoso (respuesta de novedad, revisado en (Moller 1995)), se realizó el monitoreo de la frecuencia para asegurarse que el pez permanece sin perturbarse mientras se miden los parámetros en el Estudio 1. Para realizar el censo eléctrico, se vadeó en zigzag dentro de la vegetación, hasta 1.2 m de profundidad, y se detectaron cuidadosamente los individuos uno por uno, procurando no acercarse. Una vez que un pez fue localizado en un sitio individual, se marcó el camalote que está encima de él (Fig. I.1C). En cada sitio, a 30 cm de profundidad, se midió la conductividad del agua, la concentración de Oxígeno disuelto en agua (O_2, mg/l) y la temperatura (T, ºC), utilizando un TDSu Testr 3, Cole Parmer para la conductividad, y OxyWard, Handy Polaris para O_2 y T. Una vez colectadas las medidas fisicoquímicas, se registró la frecuencia de la DOE *in situ* durante 10 s, mediante dos electrodos localizados cerca el pez, y conectados a un amplificador en la orilla de la laguna (World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL. DAM-50, AC-coupled). Luego de la amplificación, la señal se capturó utilizando la tarjeta de audio de una laptop, y se almacenó para ser analizada más adelante. Para corregir

el efecto de la temperatura sobre la frecuencia de la DOE se corrigieron los valores a una temperatura de 20°C utilizando el valor 1.5 de Q10 calculado para peces eléctricos = Q10 = DOE_{freq} x T / DOE_{freq} x (T + 10) (Dunlap et al. 2000; Silva et al. 2007).

La medida de parámetros fisicoquímicos y frecuencia de la DOE se llevó a cabo en todos los sitios individuales en un mismo día de muestreo, lo que constituye una unidad de censo. Una unidad de censo se definió como el área que comprende a todos los individuos detectados antes de las 12 AM, o el área donde se detectó un grupo de peces rodeado por al menos 6 m de agua no habitada por individuos de la especie (Fig. I.1C). El Estudio 1 se realizó tanto en el período reproductivo como en el período no reproductivo.

Estudio 2: Cuantificación de variables individuales.

No solamente los factores ambientales, también las características individuales como las morfométricas y fisiológicas pueden influenciar la distribución espacial y tener variaciones estacionales. Por lo tanto, basados en el Estudio 1, caracterizamos las variables individuales de los peces colectados en los dos períodos y analizamos su relación con la distribución espacial. Los sitios individuales se visitaron por segunda vez, y se colectó cada pez localizado bajo el camalote marcado utilizando una red, sin perturbar los sitios cercanos. Debido a que la calderineada perturba mucho la vegetación en el sitio, si el primer intento no es exitoso luego se reporta el sitio como no-recuperado. Una vez pescados, los individuos se pesaron, se midieron, se sacrificaron por decapitación rápida y las gónadas se inspeccionaron visualmente para determinar el sexo. En el período reproductivo los peces se anestesiaron inmediatamente luego de la captura por inmersión en una solución de eugenol (1.2 mg/l, disuelto previamente en alcohol 70%) y se realizó la extracción de sangre de la vena caudal con una jeringa heparinizada antes de los 3 min de captura, que es el rango de tiempo usualmente utilizado para evitar la respuesta de estrés por manipulación (Dunlap et al. 2000b; Fox et al. 1997; Salazar y Stoddard 2008). La sangre se colocó en tubos que se mantuvieron en hielo en el campo, más tarde se centrifugaron en el laboratorio

(3000rpm, 10 min), y el plasma se almacenó a -80 ºC. Las gónadas fueron disecadas, almacenadas en hielo seco y pesadas en el laboratorio para calcular el índice gonadosomático (GSI = [peso gónada / peso corporal] x 100 (Anderson et al. 1983).

Cuantificación hormonal

En hembras reproductivas se cuantificaron los niveles de 17-β Estradiol (E2) y en machos reproductivos los niveles de 11-Cetotestosterona (11-KT) mediante inmunoensayos (ELISA) utilizando kits comerciales (IBL International, Hamburgo, Alemania para E_2 y Cayman Chemical Company, MI, USA para 11-KT). Los análisis se realizaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante y en cada ensayo se corrió una curva estándar. En todos los casos las muestras se corrieron en duplicado y el análisis se llevó a cabo en las muestras que presentaron coeficientes de variación menores a 20% (Sink et al., 2008). La variación intraensayo fue 3.95 % para el E_2 (límite de detección: 25 pg/ml) y 6.2 % para la 11-KT (límite de detección: 1.56 pg/ml). Para establecer las diluciones de trabajo adecuadas (1:2 para el E_2 de hembras reproductivas y 1:30 para la 11-KT de machos reproductivos) se realizaron tres diluciones piloto (4 muestras por sexo). Los ensayos se validaron con estándares aportados por el kit.

Análisis de datos y estadística

Todos los datos fueron sometidos a la prueba de normalidad D'Agostino y Pearson. Si los datos se ajustan a una distribución gaussiana, se analizaron con pruebas paramétricas; de lo contrario se utilizaron pruebas no paramétricas. Los análisis paramétricos, no-paramétricos y las regresiones lineales simples se realizaron con PAST (Hammer et al. 2001), y los modelos lineales generalizados (GLM) y pruebas binomiales se realizaron con el R (R Core Team 2012) usando la interfaz RStudio.

El análisis de datos se realizó en tres etapas. En una primera etapa se exploró la heterogeneidad ambiental utilizando datos del Estudio 1. Las variables ambientales (O_2 y T) se compararon entre estaciones por la prueba *U* de Mann-Whitney. Para analizar la heterogeneidad de O_2 y T se calculó el coeficiente de variación (CV,

SD/media*100) para cada unidad de censo y luego se calculó la media y SD para cada período. Finalmente, se realizaron regresiones lineales entre DNN y contenido de O_2 y la frecuencia de la DOE y contenido de O_2 en los dos períodos (Fig. I.2).

En la segunda etapa de análisis, que involucró la captura de peces, exploramos qué factores morfométricos y fisiológicos correlacionaban con DNN en período no reproductivo y reproductivo. El set de datos para este análisis se obtuvo en el Estudio 2. Las características individuales (tamaño corporal, y frecuencia de la DOE), la DNN, y DNN normalizado por la longitud corporal se compararon entre sexos dentro de cada período mediante la prueba de t (Tabla I.1). Debido a que el peso y la longitud corporal están fuertemente relacionados ($R = 0.91$, $N = 47$), y al hecho de contar con más datos de longitud que de peso, utilizamos la longitud como indicador de tamaño corporal en los análisis. La longitud corporal, DNN y la frecuencia de la DOE se compararon estacionalmente utilizando la prueba de t en hembras y machos juntos.

Para examinar el efecto de las características individuales (ver más adelante) sobre la DNN como variable dependiente utilizamos modelos lineales generalizados (GLM; (Zuur et al. 2007)), analizando los dos períodos por separado. En el período reproductivo, inicialmente se corrió un modelo con la longitud corporal, frecuencia de la DOE y sexo como variables independientes. Debido a que el modelo no fue significativo, se corrieron los dos sexos por separado. Para hembras se analizaron las variables independientes longitud corporal, frecuencia de la DOE y E_2 circulante, mientras que en machos las variables fueron la longitud corporal y la frecuencia de la DOE (Tabla I.2). Para el período no reproductivo el modelo incluyó hembras y machos juntos y las variables independientes fueron la longitud corporal, frecuencia de la DOE y sexo (Tabla I.3).

Para seleccionar el GLM más parsimonioso, utilizamos el comando *bestglm* (McLeod y Xu 2011), para un máximo de tres variables simultáneas y se consideraron las interacciones de segundo orden. Los modelos iniciales fueron simplificados mediante el método paso a paso (*stepwise*), y utilizando el Criterio de Información de Akaike (AIC) para comparar entre modelos alternativos. Esto permite evitar la sobreparametrización y así llegar al modelo más parsimonioso para las

variables evaluadas. La selección del modelo más parsimonioso tomó en cuenta el criterio AIC y el número y significancia estadística de los parámetros estimados. Se descartaron los modelos con una mejora en el AIC cuyos parámetros estimados no fueron significativos. Todos los modelos se sometieron al análisis de residuos para comprobar los supuestos de normalidad y homocedasticidad (McCullagh y Nelder 1989).

La etapa final de análisis tuvo como objetivos tres puntos. El primero fue evaluar con mayor detalle el impacto de caracteres sexualmente dimórficos (tamaño gonadal y esteroides sexuales) sobre la DNN particularmente durante el período reproductivo (Fig. I.3). Para esto se comparó estacionalmente la DNN y la DNN relativa al tamaño corporal en hembras y machos por separado. Además, para analizar la importancia del desarrollo gonadal en el espaciamiento individual, realizamos regresiones lineales entre DNN vs el IGS, y DNN vs peso corporal – peso gonadal, en hembras y machos. El segundo punto fue analizar si la concentración de O_2, además de influenciar es espaciamiento, mostraba asociación con variables morfológicas y fisiológicas (IGS, DOE_{freq}, niveles de E_2). El tercer punto fue establecer si la distribución de individuos por sexo difería de una distribución al azar, y para esto utilizamos una prueba Binomial (Conover 1971). Para el análisis el pez focal fue considerado solamente si el vecino más cercano se capturó y su sexo de confirmó. La proporción de sexos esperadas para una distribución al azar se deduce de la proporción empírica observada en cada temporada (Fig. I.4).

RESULTADOS

En los dos períodos, los individuos de *Gymnotus omarorum* se encontraron típicamente entre las raíces de las matas de vegetación a una profundidad de ~ 30 cm, en el área litoral tanto en verano como en invierno (Fig. I.1B). El camalote *Eichhornia crassipes* dominó el área tanto a nivel subacuático como aéreo, representando el 86% de la biomasa subacuática total. La vegetación asociada se compuso de las especies sumergidas *Egeria densa* y *Miriophyllum aquaticum*, la

flotante *Salvinia auriculata*, y las enraizadas y emergentes *Ludwigia elegans* e *Hydrocotyle criptocarpa*. La misma composición de vegetación se observó a lo largo del año, aunque la cobertura fue mayor en el período reproductivo.

Como es esperado en la región subtropical, la temperatura y concentración de O_2 del agua mostraron diferencias estacionales. La temperatura del agua fue más alta en el período reproductivo (27.3 ± 0.1 ºC, N = 36 vs 11.3 ± 0.5 ºC, N = 60; p = 1 exp-4, prueba *U* de Mann Whitney), mientras que la concentración de O_2 fue menor en el período reproductivo en comparación con el no reproductivo (5.6 ± 0.9 mg/l, N = 36, vs 8.4 ± 0.4 mg/l, N = 65; p = 4 exp-3, prueba *U* de Mann Whitney). Por el contrario, la conductividad del agua no presentó modificaciones estacionales y se mantuvo < 150 µS/cm a lo largo del año.

ESTUDIO 1: DISTRIBUCIÓN ESPACIAL Y VARIABLES AMBIENTALES

La Etapa 1 de análisis tuvo como objetivo relacionar datos ambientales con el espaciamiento y la frecuencia de la DOE de los peces individualizados por censo eléctrico. Los peces se localizaron en la parte central de la mata de vegetación, y no se detectaron en los bordes cerca del agua abierta (Fig. I.1C). En las dos temporadas los peces mostraron una distribución uniforme, no agregados con otros coespecímenes. La distribución de DNNs fue asimétrica, con un sesgo con moda en los 150 cm (Fig. I.2A). El valor medio de DNN fue significativamente mayor en el período reproductivo que en el no reproductivo (230 ± 15 cm, prueba de t, T = 5.9, p = 1 exp-4, N = 47 vs 140 ± 7 cm, N = 73).

La temperatura del agua medida en los sitios individuales dentro de cada unidad de censo mostró baja variabilidad (CV medio T período reproductivo = 2.0 ± 2.4 %, CV medio T período no reproductivo = 6.5 ± 5.5 %). La concentración de O2 presentó una alta variabilidad dentro de cada unidad de censo (CV medio O_2 período reproductivo = 20.4 ± 9.3 %, CV medio O_2 período no reproductivo = 25.9 ± 14.6 %). Por lo tanto, exploramos si el O_2 contribuye al patrón espacial. Durante el período reproductivo, la concentración de O_2 medida en los sitios individuales presentó un rango de 0 a 15 mg/l y un sesgo positivo (Fig. I.2B, verde), con alta frecuencia de

valores de concentración bajos (moda en 1 mg/l). Sin embargo, durante el período no reproductivo, la distribución de los niveles de O_2 presentó un sesgo hacia la izquierda, y mostró una moda en 11 mg/l (Fig. I.2B, gris).

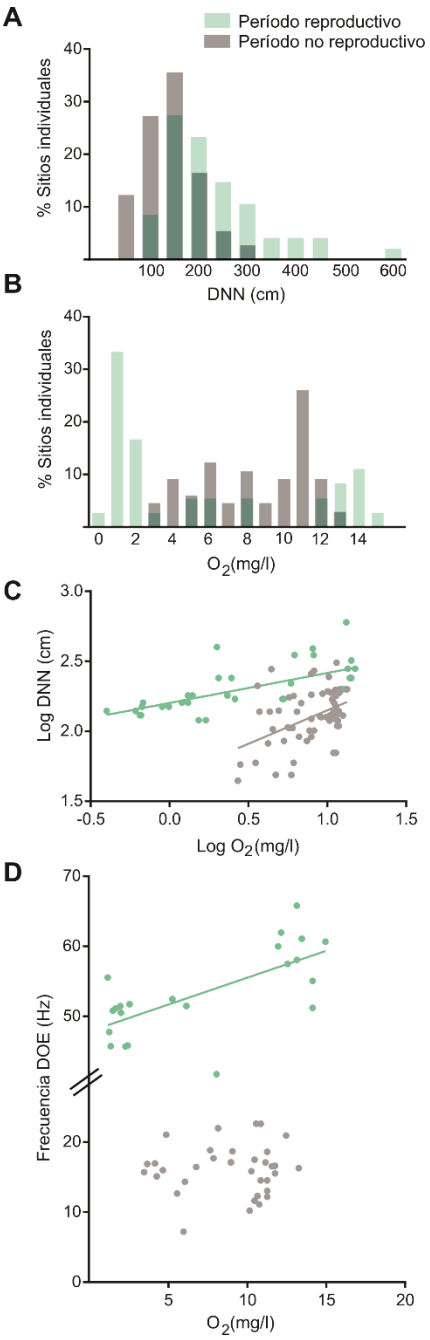

Figura I.2: Distribución espacial basada en variables ambientales (Estudio 1). El período reproductivo se representa en verde, y el no reproductivo en gris; la superposición de las dos estaciones se ilustra en verde oscuro. A. Distribución de frecuencias de distancia al vecino más cercano (DNN, en cm). B. Distribución de frecuencias de concentración de oxígeno (en mg/l) medido a 30 cm de la superficie en cada sitio individual. (DNN, en cm). C. Regresión lineal entre DNN y concentración de O2 en los sitios individuales (transformado con Log). Período reproductivo: R2 = 0.44, p = 1 exp -4, N = 35, período no reproductivo: R2 = 0.21, p = 1 exp-4, N = 50. D. Regresión lineal entre la frecuencia de la DOE y la concentración de O2 en los sitios individuales. Período reproductivo: R2 = 0.47, p = 5 exp-4, N = 22. Período no reproductivo: R2 = 1 exp-3, p = 0.54, N = 39.

La relación entre los niveles de O_2 y DNN fue significativa y positiva tanto en el período reproductivo (R^2 = 0.44, p = 1 exp -4, N = 31, Fig. I.2C verde) como en el período no reproductivo (R^2 = 0.21, p = 1 exp -4, N = 50, Fig. I.2C gris). De manera interesante, los niveles de O_2 presentaron una relación positiva con la frecuencia de la DOE durante el período reproductivo, pero la relación no fue significativa en el período no reproductivo (reproductivo: R^2 = 0.47, p = 5 exp -4, N = 22, Fig. I.2D verde; no reproductivo: R^2 = 1 exp -3, p = 0.54, N = 39, Fig. I.2D gris).

ESTUDIO 2: DISTRIBUCIÓN ESPACIAL BASADA EN CARACTERÍSTICAS INDIVIDUALES

La segunda etapa de análisis exploró el impacto de las variables morfométricas y fisiológicas individuales sobre la DNN en las dos temporadas. El 71% de los peces registrados en el Estudio 1 fueron recuperados en el Estudio 2. No se encontraron diferencias sexuales en el tamaño corporal, la frecuencia de la DOE, DNN, ni la DNN relativa al tamaño corporal. La falta de diferencias sexuales se mantuvo tanto en período no reproductivo, como en reproductivo (Tabla I.1). Durante la temporada reproductiva, las hembras presentaron niveles circulantes de E_2 con una media de 293.7 ± 97.7 pg/ml y los machos una media de 11-KT 399.1 ± 140.9 pg/ml. El tamaño corporal medio fue mayor en el período reproductivo (p = 1 exp-4, test de t, T = 6.6, N_{repro} = 28, $N_{no\ repro}$ = 53). Además, la frecuencia de la DOE corregida por temperatura fue más alta (p = 1 exp-4, test de t, T = 18.8, N_{repro} = 30, $N_{no\ repro}$ = 36), DNN fue mayor (p = 1 exp-4, test de t, T = 5.6, N_{repro} = 31, $N_{no\ repro}$ = 46) y DNN relativo (DNN/longitud corporal) fueron también mayores durante el período reproductivo (p = 9 exp-3, test de t, T = 2.7, N_{repro} = 30, $N_{no\ repro}$ = 46).

Los factores que influencian DNN se evaluaron por separado en los dos períodos. En el período reproductivo, el GLM inicial incluyó hembras y machos juntos con tamaño corporal, frecuencia de la DOE, y sexo como parámetros independientes no arrojó resultados significativos, por lo que luego se corrieron modelos para cada sexo por separado. En hembras se incluyó el E_2 circulante además del tamaño corporal y la frecuencia de la DOE como variables explicativas del DNN. Se

obtuvieron dos modelos significativos equivalentes según el criterio de AIC (Tabla I.2). En el modelo con mejor ajuste (modelo 1), el DNN mostró una relación significativa positiva con los niveles de E_2 y una relación negativa marginal con la frecuencia de la DOE. En el modelo 2, el único parámetro que correlacionó significativamente con el DNN fue el E_2 circulante.

Tabla I.1: Comparación sexual de las características individuales y la distancia al vecino más cercano en las dos temporadas (Estudio 2). Variables individuales: Longitud corporal y frecuencia de la DOE corregida por temperatura. Distancia al vecino más cercano (DNN en cm), y DNN relativo (DNN/longitud corporal). Los valores se expresan como medias ± error estándar de la media (SEM), y las comparaciones estadísticas se hicieron con la prueba de t.

	Tamaño corporal (cm)		Frecuencia DOE $_{temp}$		DNN (cm)		DNN / longitud corporal	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
A- Reproductivo	22.4 ± 0.5 n = 13	24.5 ± 0.9 n = 15	41.0 ± 1.1 n = 13	39.3 ± 0.9 n = 17	220 ± 20 n = 13	230 ± 30 n = 18	9.8 ± 0.8 n = 13	9.9 ± 1.4 n = 17
	♀ vs ♂ p = 0.2		♀ vs ♂ p = 0.3		♀ vs ♂ p = 0.8		♀ vs ♂ p = 0.9	
B- No-reproductivo	16.9 ± 0.9 n = 26	17.4 ± 0.8 n = 27	20.0 ± 1.2 n = 18	19.3 ± 0.95 n = 18	113 ± 10 n = 23	120 ± 10 n = 23	7.0 ± 0.6 n = 23	7.8 ± 0.7 n = 23
	♀ vs ♂ p = 0.7		♀ vs ♂ p = 0.6		♀ vs ♂ p = 0.5		♀ vs ♂ p = 0.4	

En machos no encontramos correlación entre las variables independientes evaluadas y el DNN. Aunque los andrógenos no se incluyeron en el GLM por bajo N, es destacable que la 11-KT mostró una tendencia positiva en una regresión lineal simple con el DNN, si bien el número de datos fue bajo para alcanzar poder estadístico. En el período no reproductivo las variables individuales no mostraron diferencias sexuales, y por ende se incluyeron hembras y machos juntos en el modelo para predecir el DNN. Exploramos si el sexo, tamaño corporal y frecuencia

de la DOE predicen el DNN, y encontramos que la única variable significativa fue el tamaño corporal, que correlacionó positivamente con DNN (Tabla I.3).

Tabla I.2: Modelos lineales generalizados que presentaron el mejor ajuste para explicar la distancia al vecino más cercano (DNN) en hembras durante el período reproductivo, con datos obtenidos en el Estudio 2. El intercepto y las variables explicativas se expresan como medias (desvío estándar). Para cada parámetro, el valor se muestra en negrita si es significativo ($p<0.05$), en itálica si es marginal ($p<0.1$), y como NS si no mostró significancia estadística. El Modelo 1 y Modelo 2 no presentaron diferencias significativas con respecto al criterio de información de Akaike (AIC).

Modelo	Intercepto	E_2 circulante	DOE $_{freq}$	N	P modelo	R2 ajustado	AIC
M1	**452** (141)	**0.14** (0.03)	*-0.51* (2.7)	13	0.02	0.44	20.24
M2	**188** (18)	**0.1** (0.04)	NS	13	0.03	0.31	22.21

Tabla I.3: Modelos lineales generalizados que presentaron el mejor ajuste para explicar la distancia al vecino más cercano (DNN) en los dos sexos durante el período no reproductivo, con datos obtenidos en el Estudio 2. El intercepto y la variable explicativa se expresa como media (desvío estándar). El valor del parámetro significativo se muestra en negrita ($p<0.05$).

Intercepto	Tamaño corporal	N	P modelo	R2 ajustado	AIC
36.4 (34)	**5.2** (2)	48	0.01	0.11	79.75

Para evaluar posibles diferencias sexuales en las características de los territorios realizamos la Etapa 3 de análisis. Comparamos el tamaño territorial relativo entre temporadas y evaluamos la relación entre variables individuales y ambientales. Si bien el DNN absoluto y relativo fue mayor en el período reproductivo en los dos sexos, cuando se analizaron hembras y machos por separado se evidenció que la

diferencia estacional en el DNN relativo es solo significativa en hembras (hembras: reproductivo 9.8 ± 0.8, N = 13 vs no reproductivo 7.0 ± 0.6, N = 23; prueba de t, T = 2.7, p = 0.01, machos: reproductivo 9.9 ± 1.4, N = 17 vs no reproductivo 7.5 ± 0.7, N = 22; prueba de t, T = 1.4, p = 0.12, Fig. I.3A). En concordancia con los resultados del GLM, en período reproductivo el tamaño corporal no mostró asociación con el DNN en ninguno de los sexos (hembras: p = 0.8, R^2 = 7 exp-3, N = 13. Machos: p = 0.7, R^2 = 0.01, N = 15; Fig. I.3B). Con respecto a la importancia relativa de la madurez gonadal en el espaciamiento, encontramos que el IGS fue significativamente mayor en el período reproductivo en hembras (Hembras: 1.1 ± 0.22 % N = 9 vs 0.6 ± 0.09 % N = 11; p = 0.02, prueba de t, T = 2.3. Machos: 0.24 ± 0.03 % N = 10 vs 0.23 ± 0.03, N = 16; p = 0.87, prueba de t, T = 0.3); y el IGS mostró la esperada relación positiva con el E_2 circulante en hembras reproductivas (p = 2 exp-3, R^2 = 0.76, N = 9, datos no mostrados). El IGS presentó una relación positiva con el DNN solamente en hembras reproductivas (Hembras: p = 1 exp-3, R^2 = 0.8, N = 9. Machos: p = 0.14, R^2 = 0.25, N = 10, Fig. I.3C); y DNN no mostró relación significativa con el peso corporal luego de la sustracción del peso gonadal (Hembras: p = 0.7, R^2 = 0.02, N = 9. Machos: p = 0.6, R^2 = 0.03, N = 10; Fig. I.3D). Más aún, el contenido de O_2 del agua presentó una relación positiva con el E_2 circulante de las hembras reproductivas (p = 0.03, R^2 = 0.41, N = 11, Fig. I.3E) y el O_2 mostró una relación marginal con el IGS de hembras (p = 0.08, R^2 = 0.5, N = 7, datos no mostrados); mientras que los niveles de 11-KT en machos no presentaron asociación con la concentración de O_2, aunque el n fue pequeño para realizar la regresión (N = 5, Fig. I.3E).

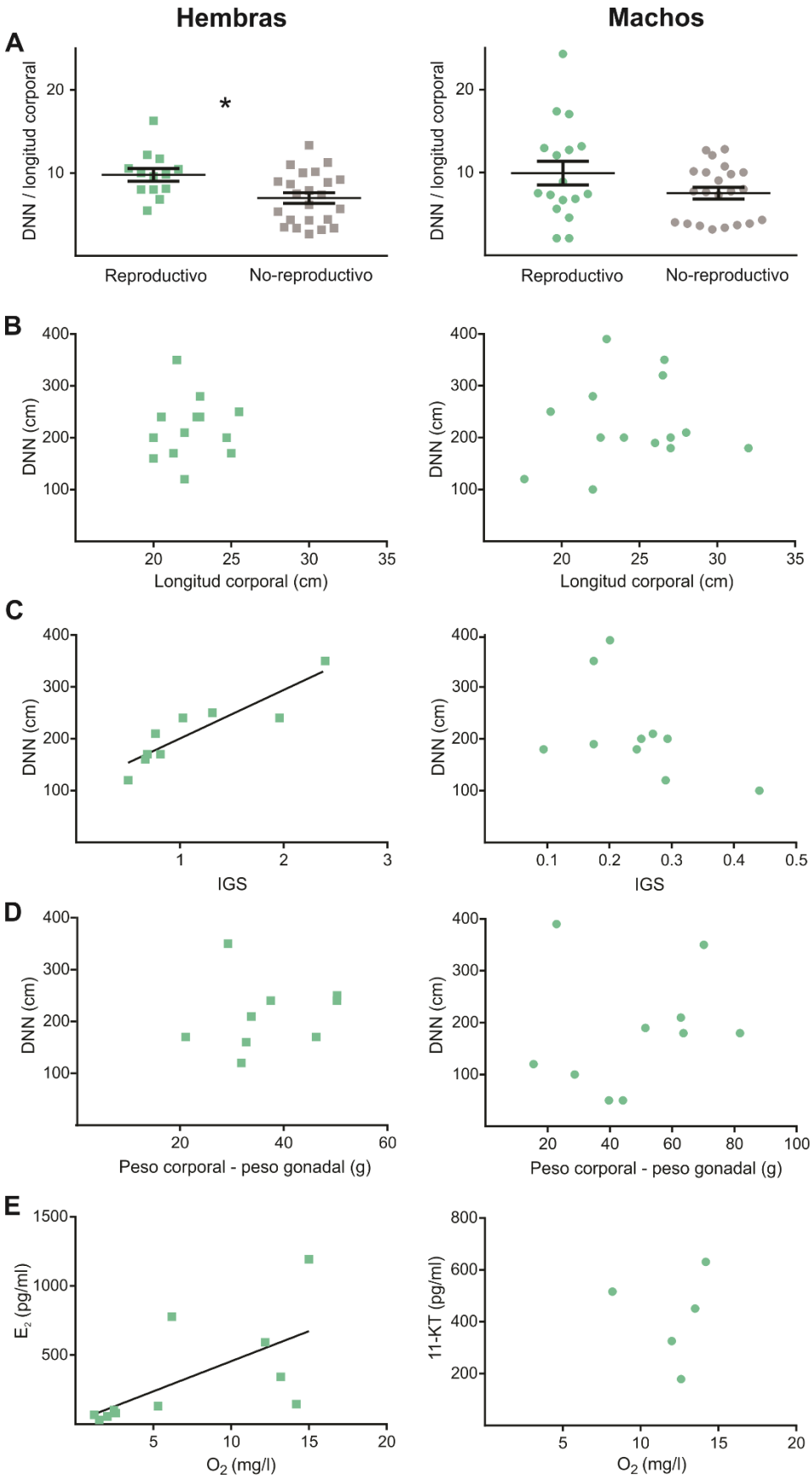
Hembras
Machos
A
DNN / longitud corporal
20
10
*
Reproductivo
No-reproductivo
B
DNN (cm)
400
300
200
100
20
25
30
35
Longitud corporal (cm)
C
IGS
1
2
3
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
D
Peso corporal - peso gonadal (g)
20
40
60
80
100
E
E_2 (pg/ml)
1500
1000
500
5
10
15
20
O_2 (mg/l)
11-KT (pg/ml)
800
600
400
200

Figura I.3: Aparición del dimorfismo sexual durante el período reproductivo
Las gráficas muestran valores para hembras (paneles de la izquierda, representados como cuadrados) y machos (paneles de la derecha, representados como círculos); el color verde indica período reproductivo y el gris no reproductivo. Los datos fueron obtenidos en el Estudio 2 (Etapa de análisis 3).
A- Distancia relativa al vecino más cercano (DNN en cm / longitud corporal en cm). Los puntos representan valores individuales, y la línea horizontal en A y B representa la media y las barras de error representan el error estándar de la media. * indica la significancia estadística ($p < 0.05$) prueba de t. **B-** Regresión lineal entre tamaño corporal (cm) y DNN (cm) en el período reproductivo. Hembras: $p = 0.8$, $R^2 = 7$ exp-3, $N = 13$; machos $p = 0.7$, $R^2 = 0.01$, $N = 15$. **C-** Regresión lineal entre GSI y DNN (cm) en el período reproductivo. Hembras: $p = 1$ exp-3, $R^2 = 0.8$, $N = 9$; machos: $p = 0.14$, $R^2 = 0.25$, $N = 10$. **D-** Regresión lineal entre peso corporal – peso gonadal (g) y DNN (cm) en el período reproductivo. Hembras: $p = 0.7$, $R2 = 0.02$, $N = 9$. Machos: $p = 0.6$, $R^2 = 0.03$, $N = 10$. **E-** Regresión lineal entre concentración de O_2 (mg/l) y E_2 (pg/ml) en hembras reproductivas: $p = 0.03$, $R^2 = 0.41$, $N = 11$. La misma relación se muestra para la 11-KT en machos reproductivos sin el ajuste estadístico debido al pequeño tamaño de muestra ($N = 5$).

En el período reproductivo los individuos presentaron una distribución por sexos significativamente distinta del azar. El porcentaje de hembras con otra hembra como vecina más cercana fue significativamente menor que el esperado por azar ($p = 0.03$, $N = 11$; prueba Binomial, Fig. I.4A), y el porcentaje de hembras con un mecho como vecino más cercano fue significativamente mayor que el esperado por azar ($p = 0.04$, $N = 16$; prueba Binomial, Fig. I.4A). Por el contrario, en el período no reproductivo la configuración espacial de sexos en la población fue al azar. La probabilidad de tener una hembra como vecina más cercana no fue diferente de la esperada por azar tanto si el pez focal era hembra como si era macho (hembras: $p = 0.82$, $N = 20$; machos: $p = 0.12$, $N = 15$; prueba Binomial Fig. I.4B).

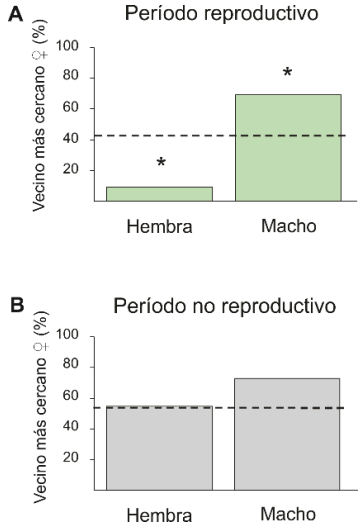

Figura I.4: Estacionalidad en la distribución espacial de los sexos (datos obtenidos en Estudio 2). Sexo del vecino más cercano (expresado en porcentaje) cuando el pez focal es una hembra o un macho, en período reproductivo (A, arriba), y en período no reproductivo (B, abajo). La línea punteada representa el porcentaje esperado de tener una hembra como vecino más cercano si la distribución fuera al azar, de acuerdo con la proporción sexual empírica (41% en el período reproductivo y 50.9% en el período no reproductivo). * indica la significancia estadística ($p < 0.05$) de acuerdo con una prueba binomial.

DISCUSIÓN

En este estudio se examinaron las diferencias estacionales y sexuales en los determinantes del tamaño territorial en un pez teleósteo que presenta agresión territorial durante todo el año. Encontramos que *Gymnotus omaroum* en su ambiente natural posee una distribución espacial consistente con territorialidad tanto en período reproductivo como en no reproductivo, y que la concentración de oxígeno correlacionó positivamente con el tamaño del territorio en las dos estaciones. También mostramos que: a- en el período no reproductivo el tamaño del territorio fue sexualmente monomórfico y determinado parcialmente por el tamaño corporal de los individuos; y b- en el período reproductivo aparece el dimorfismo sexual en el tamaño territorial relativo y sus determinantes. En este capítulo se cumplieron los Objetivos específicos I.A-D y los resultados refrendaron la hipótesis de trabajo 1.

El tamaño corporal se asocia fuertemente con atributos fisiológicos y ecológicos en muchas especies (ej. *home range* y tasa metabólica), y es clave para entender cómo los animales hacen uso del ambiente (Brown et al. 2004; Peters 1983; White et al. 2007; Woodward et al. 2005). La distribución de individuos de diferente tamaño puede ser influenciada por las interacciones sociales, como por ejemplo, la defensa territorial (Allen et al. 2006). Estas ideas, postuladas inicialmente para analizar interacciones interespecíficas (Violle et al. 2012), se pueden aplicar en la interpretación de individuos dentro de una misma especie, como es el caso de este estudio. Aquí evidenciamos que el tamaño corporal predice DNN en el período no reproductivo, pero no durante el reproductivo (Tablas I.2 y I.3). Esto sugiere que durante la época reproductiva existen otros aspectos (fisiológicos, conductuales, motivacionales) que pueden anteponerse al tamaño corporal influenciando el tamaño del territorio.

El contenido de O_2 es una variable fisicoquímica limitante en ambientes acuáticos, y la hipoxia se ha relacionado con la mortalidad de peces (La y Cooke 2011). Es

interesante que *Gymnotus* ha sido reportado como tolerante a un amplio rango de concentraciones de O_2, y puede sobrevivir en ambientes hipóxicos (Crampton 1998). *Gymnotus* tiene la capacidad de tomar aire de la superficie y posee adaptaciones metabólicas que compensan posibles daños que la hipoxia puede causar (Moraes et al. 2002). En este estudio los sitios individuales mostraron concentraciones de O_2 que correlacionaron con el tamaño territorial en los dos períodos (Fig. I.2C). Este resultado sugiere que mayores niveles de O2 podrían permitir a los peces defender territorios de mayor tamaño debido a un incremento en la capacidad de respiración aeróbica. Es interesante que la concentración de O2 correlacionó positivamente con la frecuencia de la DOE solamente durante el período reproductivo, cuando la frecuencia de la DOE fue significativamente más alta y el contenido de O_2 más bajo que el período no reproductivo (Fig. I.2). Este resultado es consistente con el requerimiento metabólico de la emisión de la DOE (Markham et al. 2016), que puede ser especialmente demandante en el ambiente hipóxico del verano.

ESPACIAMIENTO EN PERÍODO NO REPRODUCTIVO: DEPENDENCIA DEL TAMAÑO CORPORAL E INDEPENDENCIA DEL SEXO

La territorialidad durante todo el año ha sido examinada en teleósteos mayormente en especies de arrecifes de coral (por ejemplo, *Stegastes fuscus* (Osório et al. 2006)). En este estudio evaluamos la distribución espacial de una especie subtropical dulceaquícola y encontramos que la distribución durante el invierno es consistente con territorialidad. ¿Por qué *Gymnotus* defiende territorios durante el período no reproductivo? La adquisición y el mantenimiento de los territorios es mediado por la conducta agonística (Börger et al. 2008). En particular, reportes previos de encuentros diádicos en el laboratorio demuestran que *Gymnotus omarorum* exhibe conducta agonística no reproductiva que media la adquisición del territorio (Perrone et al. 2019) y que el tamaño corporal es el principal determinante de la dominancia en una contienda (Batista et al. 2012).

La producción de la DOE impone un costo metabólico alto (Markham et al. 2016), que puede requerir una necesidad de forrajeo adicional. En línea con esto, encontramos que los peces de mayor tamaño tienen territorios más grandes en los dos sexos (Tabla I.3). El tamaño corporal es sexualmente monomórfico en esta especie, y los experimentos en el laboratorio muestran que el inicio de las contiendas y la determinación de la dominancia en la resolución del conflicto no tiene sesgo por sexo (Batista et al. 2012). En este estudio confirmamos que hembras y machos no reproductivos poseen territorios sin dimorfismo sexual de tamaño en su ambiente natural (Tabla I.1), probablemente para hacer frente a los requerimientos energéticos que no se espera que sean diferentes entre sexos fuera del período reproductivo.

Los peces eléctricos utilizan señales eléctricas de comunicación como parte de su repertorio comportamental. Dado que la DOE codifica información como tamaño corporal y estado fisiológico (Caputi y Budelli 2006; Caputi y Budelli 1995; Gavassa et al. 2011, 2012; Pedraja et al. 2016), los individuos podrían mantener los límites territoriales por evaluación remota de la DOE de sus vecinos. La frecuencia de la DOE señaliza el estatus de dominancia luego de la resolución del conflicto cuando los peces se mantienen confinados, pero no cuando se les da la posibilidad de distanciarse (Perrone et al. 2019). Por lo tanto, la predicción era que no existiera asociación entre la frecuencia de la DOE y el tamaño de los territorios en el campo, como se confirmó con nuestros datos (Tabla I.3). La señalización del estatus de dominante por medio de la frecuencia de la DOE podría ser necesario para reforzar la sumisión cuando un individuo subordinado es incapaz de escapar del pez dominante como sucede en condiciones de laboratorio donde existe confinamiento. Sin embargo, con la densidad poblacional observada en este estudio, la dominancia eléctrica no es esperada.

ESPACIAMIENTO EN PERÍODO REPRODUCTIVO: LA APARICIÓN DE DIMORFISMO SEXUAL EN LOS DETERMINANTES DEL TERRITORIO

Mientras que la competencia por oportunidades reproductivas es por lo general sexualmente dimórfica, la competencia por recursos no reproductivos es usualmente similar entre hembras y machos (Tobias et al. 2012; West-Eberhard 1983). Más aún, muchas especies que despliegan territorialidad en hembras y machos muestran monomorfismo sexual en el tamaño corporal y en las características de sus señales de comunicación (Odreitz y Sefc 2015; Tobias et al. 2011; Whittingham et al. 1992). En concordancia con este patrón, en este estudio encontramos que durante el período reproductivo tanto el tamaño territorial como el tamaño relativo del territorio no mostraron diferencias sexuales, lo que es un paralelismo con el monomorfismo en tamaño corporal (Tabla I.1). Sin embargo, en el período reproductivo el tamaño corporal no predice el tamaño territorial (Fig. I.3B), lo que sugiere que otros factores aparte del tamaño corporal influencian la adquisición de recursos y su mantenimiento.

Un análisis con más detalle (Etapa 3) mostró que, aunque no existen diferencias sexuales en el tamaño relativo del territorio, estas diferencias emergen cuando se realiza una comparación estacional. Las hembras parecen utilizar territorios relativamente más grandes en el período reproductivo que en el no reproductivo (Fig. I.3A). Este resultado puede ser interpretado en el contexto del gasto metabólico. El IGS de las hembras fue mayor en el período reproductivo, y correlacionó positivamente con la concentración plasmática de E_2. Más aún, el IGS fue un predictor excelente del tamaño territorial en hembras (Fig. I.3C). Esto sugiere que las hembras reproductivas podrían establecer territorios mayores con relación a su tamaño corporal para hacer frente a los requerimientos de forrajeo impuestos por la maduración ovárica. En línea con esto, el E_2 circulante correlacionó positivamente con el tamaño territorial en hembras (Tabla I.2), resultado arrojado por los dos modelos significativos en hembras reproductivas. Por otro lado, la influencia de la frecuencia de la DOE sobre el tamaño territorial es menos confiable,

dada su correlación marginal solamente en uno de los modelos de hembras reproductivas.

Las hormonas esteroides son moduladores relevantes de la plasticidad comportamental (Oliveira 2009); y orquestan respuestas fisiológicas integradas y respuestas conductuales a claves sociales (Hirschenhauser y Oliveira 2006; McEwen y Wingfield 2003). En hembras, el hecho de que tanto el IGS como el E_2 correlacionaron con el tamaño territorial, combinado con reportes de que el E_2 promueve la agresión en hembras (Albert et al. 1990; Rendon et al. 2017; Scaia et al. 2018), sugiere que el E_2 gonadal modula la conducta territorial en *G. omarorum.* Hipotetizamos que la secreción de E_2 integra los requerimientos metabólicos de las hembras reproductivas con el ambiente social, a través de la expresión de conducta territorial. Una mirada con más detalle a la relación entre la concentración de O_2 y las características individuales de las hembras, muestra que los niveles de O_2 correlacionan positivamente con el E_2 circulante (Fig. I.3E) y marginalmente con el IGS. Estos datos nos llevan a especular que las hembras compiten por territorios con mayor contenido de O_2, que les darán la ventaja de afrontar mejor los procesos energéticamente costosos. En machos identificamos una tendencia positiva entre niveles circulantes de 11-KT y tamaño de territorio, la cual a pesar de no tener significancia estadística es esperada debido a la documentada relación entre andrógenos y territorialidad en machos (Monaghan y Glickman 1992; Nelson 2005; Simon y Lu 2006).

El hecho que el tamaño corporal sea mayor en el período reproductivo que en el no reproductivo probablemente responda al crecimiento corporal inherente a la historia de vida de *G. omaroum*. Sin embargo, no podemos asumir que la población permanece incambiada demográficamente. Aunque este estudio no tuvo como objetivo realizar un seguimiento estacional de la población, las diferencias en tamaños entre estaciones podrían reflejar cambios demográficos. Los peces adultos de mayor tamaño podrían desplazar a los más pequeños no solo para forrajear los territorios más valiosos, sino para acceder a sitios donde su descendencia tenga mayor probabilidad de sobrevivencia, como se observa, por ejemplo, en el cíclido *Lobochilotes labiatus* (Kohda et al. 2008).

La motivación por la defensa territorial en el período reproductivo puede involucrar, no solo el valor del territorio *per se* (tamaño, contenido de O_2), sino también el sexo del vecino más cercano. Los resultados presentados en la Figura I.4 sugieren que *G. omarorum* puede evaluar las características de los territorios y utilizar esta información para cambiar de posiciones estacionalmente. En invierno, los peces tienen un vecino más cercano distribuido al azar con respecto al sexo, mientras que en verano es más probable que el vecino más cercano sea del sexo opuesto (Fig. I.4). Esta evidencia apoya la idea que el sexo del vecino más cercano se convierte en un fator relevante para el valor del territorio, solamente durante el período reproductivo. Esto puede ser considerado un buen ejemplo de plasticidad comportamental, por la cual los individuos responden diferente al mismo estímulo social (en este caso el sexo del vecino más cercano), dependiendo de las variaciones de su estado fisiológico (hormonas sexualmente dimórficas).

COMENTARIO FINAL

Gymnotus omarorum ofrece la oportunidad de analizar los cambios estacionales en la territorialidad que se mantiene todo el año. Los resultados de este capítulo refrendaron la hipótesis de trabajo 1, que postulaba: *En poblaciones naturales la territorialidad en Gymnotus omarorum es expresada todo el año. En período no reproductivo el tamaño territorial es sexualmente monomórfico y depende del tamaño corporal. En período reproductivo el tamaño territorial depende de variables sexualmente dimórficas.* Mostramos que en el período no reproductivo los únicos factores que influenciaron el tamaño territorial fueron el tamaño corporal y la concentración de O_2. Por el contrario, en el período reproductivo el sexo se tornó un factor relevante para la territorialidad: a) el sexo de los vecinos es relevante; b) el tamaño del territorio se relacionó con las hormonas gonadales en los dos sexos, lo que era esperado en machos pero reportado por primera vez en hembras; y c) las hembras reproductivas poseen territorios relativamente más grandes que las hembras no reproductivas, lo que refleja demandas metabólicas particularmente altas relacionadas a la maduración de los ovocitos.

CAPÍTULO II. VÍAS ESTEROIDEAS QUE MODULAN LA AGRESIÓN NO REPRODUCTIVA

II. Estudiar la relevancia de la vía estrogénica y androgénica rápida en la regulación de la agresión territorial no reproductiva en hembras de *Gymnotus omarorum*.

II.A. Caracterizar la agresión territorial no reproductiva entre hembras de *Gymnotus omarorum*.
II.B. Evaluar el rol de la vía estrogénica en la agresión territorial no reproductiva en la agresión intrasexual de hembras no reproductivas
II.C. Evaluar el rol de la vía androgénica en la agresión territorial no reproductiva en la agresión intrasexual de hembras no reproductivas

MÉTODOS

Animales

Se utilizaron hembras adultas de *Gymnotus omarorum* (Richer-de-Forges et al. 2009) de 15 a 26 cm de longitud y 9 a 60 g de peso; capturadas en el campo y alojadas en el IIBCE durante 4 a 5 semanas antes de los experimentos. Todos los experimentos se realizaron durante el período no reproductivo (A. Silva et al., 2003). Los peces se alojaron en compartimientos individuales (40x40x60 cm) colocados en tanques exteriores de mayor tamaño (120x120x50 cm, 500 L). Estos tanques exteriores poseen vegetación acuática traída de la laguna, y están sometidos a condiciones naturales de fotoperíodo (de LD 10:14 a LD 11:13), temperatura (10.41 ± 3.48 °C), y régimen de lluvias. Para conservar las condiciones similares a las del hábitat natural, se mantuvo la conductividad por debajo de 200 µS/cm (Silva et al. 2003). Dentro de cada alojamiento individual, se colocó un refugio por pez, y se alimentó *ad libitum* con *Tubifex tubifex*. Los experimentos se realizaron de acuerdo

con la regulación para el uso de animales y el protocolo de experimentación fue aprobado por la comisión de ética del IIBCE (Resolución CEUA IIBCE 004/05/2016).

Manipulaciones farmacológicas

Evaluación de la efectividad del acetato de ciproterona

El acetato de ciproterona (CA, por sus siglas en inglés cyproterone acetate) fue previamente reportado como bloqueante efectivo de los receptores de andrógeno en peces teleósteos (Dey et al. 2010; Remage-Healey y Bass 2004). Sin embargo, como es la primera vez que se usó en *Gymnotus omarorum*, y antes de utilizarlo como posible bloqueante de la conducta agonística femenina, se confirmó la inocuidad del vehículo y su acción inhibidora efectiva en la especie. Para eso, se utilizó el CA en experimentos preliminares para asegurar su poder bloqueante de un rasgo dependiente de acción androgénica previamente reportado (Ardanaz et al. 2001). La DOE de *G. omarorum* tiene una forma de onda multifásica con 4 componentes (V1 - V4, Trujillo-Cenóz et al. 1984). Luego de un tratamiento de 15 días con implantes subcutáneos de testosterona, la amplitud de V4 aumenta consistentemente en individuos adultos machos y hembras, resultando en un aumento significativo del índice amplitud V4 / amplitud V3 (AV4/AV3, Ardanaz et al. 2001). Se implantó un pellet de silastic subcutáneo conteniendo una dosis de testosterona de 100 µg/gpc a 22 individuos adultos no reproductivos. También se preparó una solución de CA (8 µg/µl, Sigma, C3412) utilizando como vehículo aceite mineral (Droguería Industrial Uruguaya). Los animales implantados se dividieron en dos grupos: un grupo control (n = 12) que recibió diariamente la inyección intraperitoneal de aceite mineral durante 15 días y el grupo tratado (n = 10), que recibió diariamente la inyección intraperitoneal de CA (20 µg/gpc) por 15 días. Los volúmenes efectivamente inyectados se ajustaron por el tamaño corporal y variaron entre 22.5 a 150 µl. Se registró la forma de onda de la DOE de acuerdo a Pouso et al. (2010). Tal como era esperado, se observó un aumento significativo del índice de amplitud de la DOE AV4/AV3 en el grupo tratado a los 15 días del implante

respecto al día del implante (t-test pareado, p = 0.006, n = 12, Fig. II.1A), mientras que en el grupo control no se observó un aumento de este índice (t-test pareado, p = 0.8, n = 10, Fig. II.1B). Este resultado demuestra la efectividad de CA como bloqueante de acciones androgénicas *G. omarorum*, como fuera previamente reportado en otras especies de teleósteos. Para verificar la inocuidad del aceite mineral, se comparó el comportamiento locomotor y eléctrico en hembras inyectadas con el mismo volumen de PBS (n=6) y aceite mineral (n=6). Los despliegues locomotores fueron cuantificados en una ventana temporal de 2 min, 60 min después de la inyección. El porcentaje de tiempo en movimiento no fue diferente entre las hembras inyectadas con PBS y con aceite (prueba de *U* Mann Whitney, p = 0.2, n_{OIL} = 6, n_{PBS}= 6). La frecuencia basal de la DOE fue calculada para cada animal 60 min luego de la inyección (ver más abajo) y no fue diferente entre las hembras tratadas con PBS y aceite mineral (prueba de *U* Mann Whitney, p = 0.57, n_{OIL} = 6, n_{PBS}= 6).

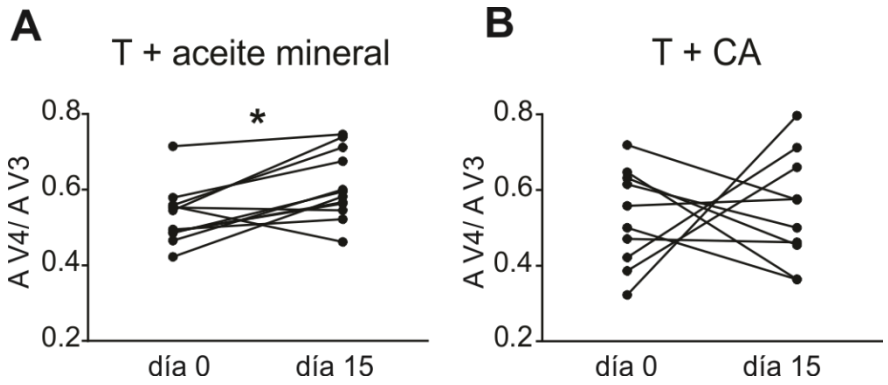

Figura II.1: Prueba de la efectividad del antagonista de receptores de andrógeno acetato de ciproterona (CA) en *Gymnotus omarorum* A. Animales implantados con testosterona (T) y sometidos a una inyección diaria de aceite mineral (n=12) durante 15 dias, presentaron un cambio esperado en la forma de onda de la DOE (Ardanaz et al., 2001), donde se observa un aumento en la amplitud del componente V4 en comparación con el dia 1, que se evidencia como un incremento en el índice V4/V3. B. Animales implantados con testosterona (T) y sometidos a una inyección diaria de CA (n=10) durante 15 dias, no mostraron diferencias significativas en la amplitud de V4.

Experimentos conductuales: manipulación de la vía androgénica y estrogénica

Para evaluar el efecto de la manipulación aguda de la vía androgénica sobre la conducta agonística, se administró CA en forma intraperitoneal (a partir de una solución de almacenamiento a una concentración de CA de 2 µg/µl disuelta en aceite mineral para alcanzar una dosis de 10 µg/gbw) a ambos individuos de díadas hembra-hembra 60 min antes del encuentro agonístico. Para asegurar un bloqueo efectivo, se utilizó esta dosis que es superior a la previamente reportada en teleósteos (Remage-Healey y Bass 2004).

Para evaluar el efecto de la manipulación aguda de la vía estrogénica sobre la conducta agonística, se administró el inhibidor de la aromatasa fadrozole (FAD, Sigma F3806) en forma intraperitoneal (a partir de una solución de almacenamiento a una concentración de FAD de 10 µg/µl disuelta en aceite mineral para alcanzar una dosis de 20 µg/gbw) a ambos individuos de díadas hembra-hembra 60 min antes del encuentro agonístico. FAD ha sido previamente reportado como eficaz bloqueante de la aromatasa en teleósteos en general (Gonçalves et al. 2007; Huffman et al. 2013) y en esta especie en particular (Jalabert et al. 2015).

El grupo control para estos experimentos consistió en díadas hembra-hembra inyectadas con un volumen equivalente de PBS 60 min antes del encuentro agonístico. El sexo de las contendientes se determinó por inspección quirúrgica un mes antes del encuentro agonístico (grupo FAD y control) siguiendo a (Jalabert et al. 2015), o por inspección gonadal en los animales eutanizados post-registros conductuales por inmersión en una solución de eugenol de 8mg/l (grupo CA).

Experimentos conductuales: registro

Se registró la conducta agonística en díadas hembra-hembra de *G. omarorum* con una asimetría de peso entre contendientes de 7-20% del peso corporal en tres grupos: díadas control (n=8), díadas tratadas con FAD (n= 10) y díadas tratadas con CA (n=7). En primer lugar, se realizó la caracterización del encuentro agonístico tomando en cuenta la ocurrencia del encuentro, el establecimiento o no del estatus dominante-subordinada, la dinámica del encuentro, los niveles de agresión y de

sumisión; y esos parámetros fueron luego comparados con los obtenidos en las díadas tratadas con FAD o CA.

Las díadas se registraron en una estación de registro conductual con control de temperatura, conductividad del agua y fotoperíodo, que permite el registro simultáneo de video filmación y de los despliegues eléctricos siguiendo a Silva et al. (2007)). Esta estación consiste en 4 peceras de 55 × 40 × 25 cm divididas en dos compartimientos iguales por una compuerta removible. Por respeto a los hábitos nocturnos de la especie, todos los experimentos se realizaron en la fase oscura con iluminación por paneles de infrarroja (Kingbright L- 53F3BT; 940 nm) ubicados arriba de las peceras. Los experimentos se filmaron con una video cámara sensible a la luz infrarroja (SONY CCDIris) a través del vidrio inferior de la pecera. Las señales eléctricas emitidas por los individuos en libre movimiento fueron detectadas por dos pares de electrodos ortogonales fijados a las paredes de las peceras de registro y conectados a amplificadores de alta impedancia de entrada (1 MΩ, FLA-01; Cygnus Technologies Inc.). Las imágenes y las señales eléctricas fueron adquiridas por una tarjeta de video (Pinnacle Systems, PCTV-HD pro stick) y almacenadas en la computadora para posterior análisis. Se utilizó un protocolo conductual de arena neutral sin enriquecimiento ni refugios, en la que se colocó cada individuo en uno de los compartimientos 2 horas antes del encuentro agonístico para asegurar recursos equivalentes a ambas contendientes siguiendo a Batista et al. (2012). Los tratamientos farmacológicos se realizaron 1 hora antes de levantar la compuerta, la compuerta se levantó 10 min después del comienzo de la fase de oscuridad, y los animales fueron separados 10 min después de que se resolviera el conflicto.

Procesamiento de datos

Siguiendo a Batista et al. (2012), se identificaron las tres fases del encuentro agonístico: 1) evaluación, entre el momento en que se levanta la compuerta y la ocurrencia del primer ataque; 2) el conflicto, entre la ocurrencia del primer ataque y la resolución del conflicto; y 3) la post-resolución, registrada hasta 10 min después de la resolución del conflicto. La resolución del conflicto se definió como el momento

en que se observe la tercer retirada sucesiva de un pez sin devolver ataques. Este criterio define sin ambigüedades y sin reversión el estatus subordinado. Si luego de 20 min, las díadas no entraban en conflicto, se calificaban como “díadas sin interacción agonística”. Si luego de 20 min de conflicto, no se alcanzaba el establecimiento del estatus dominante-subordinada, las díadas se calificaban como “díadas con conflicto no resuelto”.

Para calcular la frecuencia de ataques, se dividió el número de ataques por el tiempo considerado en segundos. Se identificaron los despliegues eléctricos de sumisión previamente descriptos en el comportamiento agonístico de la especie: interrupciones, chirps y rango de frecuencia basal (Batista et al. 2012; Perrone y Silva 2018). Se calculó la frecuencia de chirps e interrupciones dividiendo el número de eventos por el tiempo considerado en segundos. Para evaluar la sumisión eléctrica, se determinó la frecuencia media de dominantes y subordinadas antes del conflicto y luego de la resolución en segmentos de registro 10-60 s utilizando el software Clampfit (Axon, 10.0.0.61). Para comparar la diferencia de frecuencia basal de la DOE entre contendientes, se calculó la relación de frecuencias entre subordinados y dominantes (índice S/D) de tal manera que un valor <1 indica que la frecuencia basal de la DOE del dominante es superior a la de la subordinada.

Estadística

Para analizar el efecto del CA sobre la forma de onda de la DOE de individuos tratados con implantes de testosterona, se utilizó el test de t pareado comparando el índice AV4/AV3 en el mismo individuo entre el día 0 y el día 15 post-tratamiento. Dado que los datos comportamentales no cumplieron los requisites de homocedasticidad, se analizaron con tests no paramétricos: test pareado de Wilcoxon para variables pareadas en el mismo pez o díada; y prueba *U* de Mann-Whitney para variables independientes con datos provenientes de peces diferentes. Por esta razón, los datos se expresan como mediana ± rango intercuartil. El test de Fisher de dos colas se utilizó para comparar la proporción de díadas que resolvieron el conflicto en díadas control y tratadas con FAD.

RESULTADOS

AGRESIÓN TERRITORIAL NO REPRODUCTIVA EN HEMBRAS

Las díadas hembra-hembra de *G. omarorum* desplegaron una robusta conducta agonística luego de levantar la compuerta en la arena (Fig. II.2). Todas las díadas se enfrentaron en conflictos agresivos, y todas las díadas resolvieron sus conflictos con el establecimiento de un claro estatus dominante-subordinada. La hembra de mayor tamaño resultó dominante en 6 de los 8 encuentros del grupo control. La conducta agonística presentó las fases características previamente descriptas para esta especie: 1) una corta fase de evaluación con una latencia al primer ataque= 34.8 ± 8.8 s, n = 8); 2) una fase de conflicto con una duración=273 ± 85.6 s, n = 8), y 3) una fase post-resolución (Fig. II.2A). La fase de conflicto presentó despliegues agresivos que fueron más frecuentes en dominantes que en subordinadas (frecuencia de ataque, test pareado de Wilcoxon, p = 0.008, n = 8, Fig. II.2B) pero fuertemente correlacionados entre contendientes (R^2 = 0.8, p = 0.003, n = 8).

Durante las fases de conflicto y post-resolución, las subordinadas emitieron señales eléctricas de sumisión (frecuencia de interrupciones 0.02 ± 0.005, n = 8; y frecuencia de chirps 0.025 ± 0.01, n = 8). Luego de la resolución, se estableció un ranking de frecuencias de la DOE como se observa en la Fig. II.2C. En la fase de evaluación, la frecuencia basal de la DOE no difería entre contendientes. Previo al conflicto, los contendientes no mostraron diferencias en su frecuencia de la DOE (mediana del índice S/D = 1.01), mientras que en la fase de post-resolución la frecuencia basal de la DOE de las dominantes era mayor que la de las subordinadas (mediana del índice S/D = 0.6; índice S/D pre-conflicto vs índice S/D post-resolución: test pareado de Wilcoxon, p = 0.016, n = 7, Fig. II.2C).

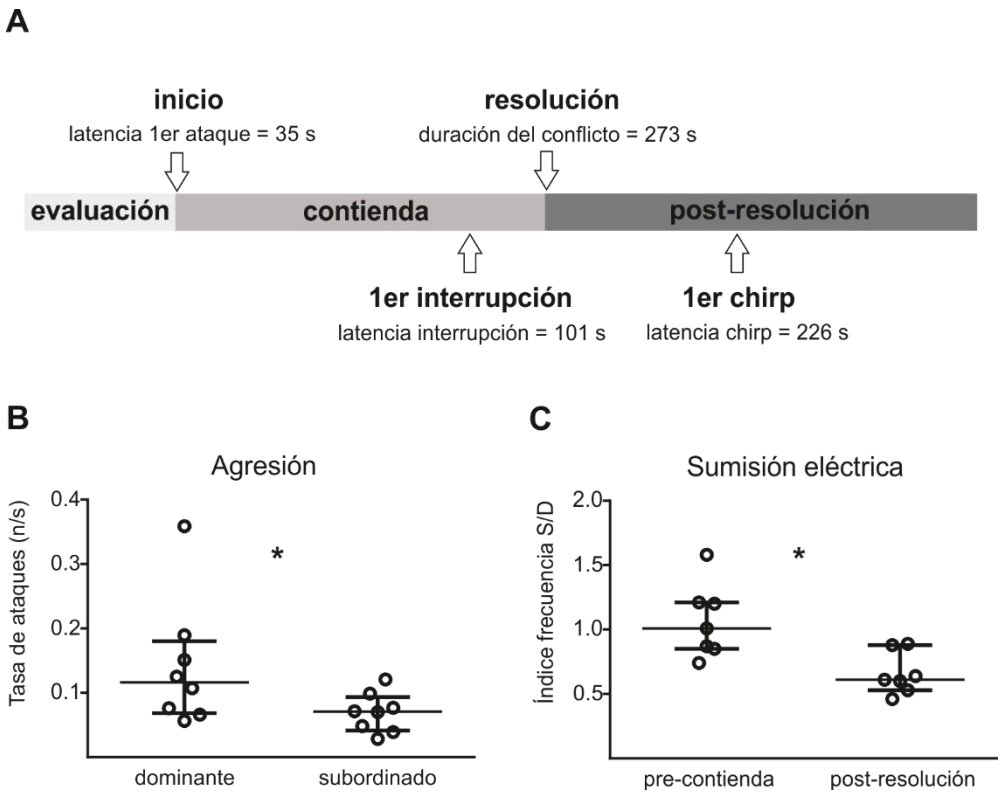

Figura II.2: Caracterización de la conducta agonística territorial no reproductiva en hembras. A. Encuentros diádicos en hembras despliegan las tres fases características de la conducta agonística. Las señales de sumisión comienzan a emitirse durante la fase de contienda, y continúan durante la post-resolución (n=8 díadas control). B. Los individuos que resultaron dominantes mostraron mayores niveles de agresión que los subordinados. C. El estatus de dominancia/subordinación se expresa mediante un ranking de frecuencia de la DOE. Las frecuencias se compararon realizando un índice Subordinado/Dominante freqDOE (S/D freqDOE). Los valores de este índice se ubicaron cercanos a 1 antes de los conflictos, y fueron significativamente menores luego de la resolución.

Con el objetivo de explorar en detalle posibles diferencias entre sexos, se realizó una comparación de la dinámica, niveles de agresión y sumisión de contiendas diádicas intrasexuales macho-macho y hembra-hembra. Como se observa en la Tabla II.1 las díadas no presentaron diferencias sexuales en ninguno de los parámetros analizados: latencia a la primer interrupción, duración de la contienda, latencia la primer chirp, tasa de ataques del dominante, tasa de ataques del subordinado, tasa de interrupciones, tasa de chirps. Por lo tanto, las díadas de machos y de hembras comparten el mismo repertorio conductual que incluye despliegues de agresión, y una secuencia de tres señales de sumisión.

Tabla II.1: Comparación de la conducta agonística entre hembras y machos de contiendas diádicas intrasexuales.

Díada	Latencia interrupción	Duración conflicto	Latencia Chirp	Tasa ataques dominante	Tasa ataques subordinado	Tasa interrupciones	Tasa chirps
Macho-macho	38 (20)	78 (21)	172 (102)	0.21 (0.16)	0.11 (0.05)	0.02 (0.02)	0.05 (0.043)
Hembra-hembra	78 (49)	152 (97)	426 (132)	0.11 (0.025)	0.07 (0.046)	0.01 (0.01)	0.003 (0.003)
Comparación	0.11	1	0.6	0.4	0.3	0.7	0.3

Comparación entre contiendas macho-macho y hembra-hembra. La identificación del sexo fue realizada luego del experimento conductual. Las contiendas entre machos y entre hembras no presentaron diferencias significativas en: las decisiones del subordinado (latencia primer interrupción, $p = 0.11$; duración del conflicto, $p = 1$; latencia al primer chirp, $p = 0.6$), ni en la intensidad de los despliegues de agresión (tasa de ataques del dominante, $p = 0.4$, tasa de ataques del subordinado, $p = 0.3$), ni en la intensidad de los despliegues de sumisión (tasa de interrupciones, $p = 0.7$, tasa de chirps, $p = 0.3$). Comparaciones estadísticas realizadas con el test de U de Mann-Whitney.

MODULACIÓN HORMONAL DE LA AGRESIÓN: INHIBICIÓN AGUDA DE LA AROMATASA

Para indagar la existencia de efectos rápidos de estrógenos en la expresión de la agresión territorial no reproductiva femenina, se comparó la conducta agonística de díadas hembra-hembra control con díadas hembra-hembra en las que ambas contendientes fueron tratadas con FAD. La principal acción que la inhibición en agudo de la aromatasa tuvo sobre la conducta agonística fue una significativa disminución de la agresión. Como se muestra en la Fig. II.3A, las 8 díadas control se enfrentaron en conflictos agresivos en menos de 28 s y todas ellas resolvieron los conflictos por establecimiento del estatus dominante-subordinada en menos de 156 s. En cambio, solo 7 de las 10 díadas tratadas con FAD se enfrentaron en conflictos agresivos, y solo 5 de esas 7 resolvieron el conflicto por establecimiento del estatus dominante-subordinada, lo que es significativamente distinto que en la situación control (resolución del conflicto: test de Fisher, $p=0.035$, $n_{FAD} = 10$, n_{CTRL}

= 8). Las otras dos díadas que se enfrentaron en conflicto no lograron resolverlo en menos de 20 min (Fig. II.3A). Por otra parte, el tratamiento con FAD provocó un aumento en la latencia al primer ataque con respecto al grupo control (prueba *U* de Mann-Whitney, p = 0.014, n_{FAD} = 7, n_{CTRL}= 8; Fig. II.3B) y se observó un importante descenso en los niveles de agresión en las díadas tratadas con FAD que se enfrentaron en conflicto respecto a las díadas control. La frecuencia de ataques que desplegaron las dominantes tratadas con FAD durante la fase de conflicto fueron significativamente menores que en díadas control (prueba *U* de Mann-Whitney, p = 0.019, n_{FAD} = 5, n_{CTRL} = 8; Fig. II.3C), así como la frecuencia de ataques desplegadas por las subordinadas (prueba *U* de Mann-Whitney, p = 0.006, n_{FAD} = 5, n_{CTRL} = 8; Fig. II.3D).

En suma, se observó un llamativo efecto decremental sobre la agresión desplegada en las díadas tratadas con FAD respecto a las díadas control que probablemente dé cuenta de la disminución del porcentaje de díadas en las que se resolvió el conflicto. Sin embargo, estos impactantes efectos del tratamiento agudo con FAD no se acompañaron de modificaciones en la emisión de señales eléctricas de subordinación. La frecuencia de interrupciones y chirps en las subordinadas tratadas con FAD no resultaron diferentes que las emitidas por las subordinadas de díadas control (interrupciones: prueba *U* de Mann-Whitney, p =0.9, n_{FAD} = 7, n_{CTRL} = 8; chirps: prueba *U* de Mann-Whitney, p =0.3, n_{FAD} = 7, n_{CTRL} = 8). Asimismo, el rango de la frecuencia basal de la DOE establecido entre dominantes y subordinadas tratadas con FAD fue indistinguible del establecido en díadas control. Es decir, el índice S/D de la frecuencia basal de la DOE post-resolución fue inferior que antes del conflicto en díadas tratadas con FAD, lo que refleja una supremacía en la frecuencia de la DOE de las dominantes respecto a las subordinadas (índice S/D pre-conflicto$_{FAD}$ vs índice S/D post-resolución$_{FAD}$: test pareado de Wilcoxon, p = 0.06, n = 5). No solo el índice S/D de frecuencia de la DOE disminuyó luego de la resolución como en las díadas control, sino que sus valores no resultaron diferentes entre díadas tratadas con FAD y controles ni en la fase pre-conflicto (prueba *U* de Mann-Whitney, p = 0.84, n_{FAD} = 5, n_{CTRL} = 7) ni en la de post-resolución (prueba *U* de Mann-Whitney, p = 0.11, n_{FAD} = 5, n_{CTRL} = 7). Las díadas tratadas con FAD

tampoco mostraron diferencias en su actividad locomotora 1 h después del tratamiento justo antes del levantamiento de la compuerta con respecto a las díadas control (prueba *U* de Mann-Whitney, p = 0.28, n_{FAD} = 20, n_{CTRL} = 16).

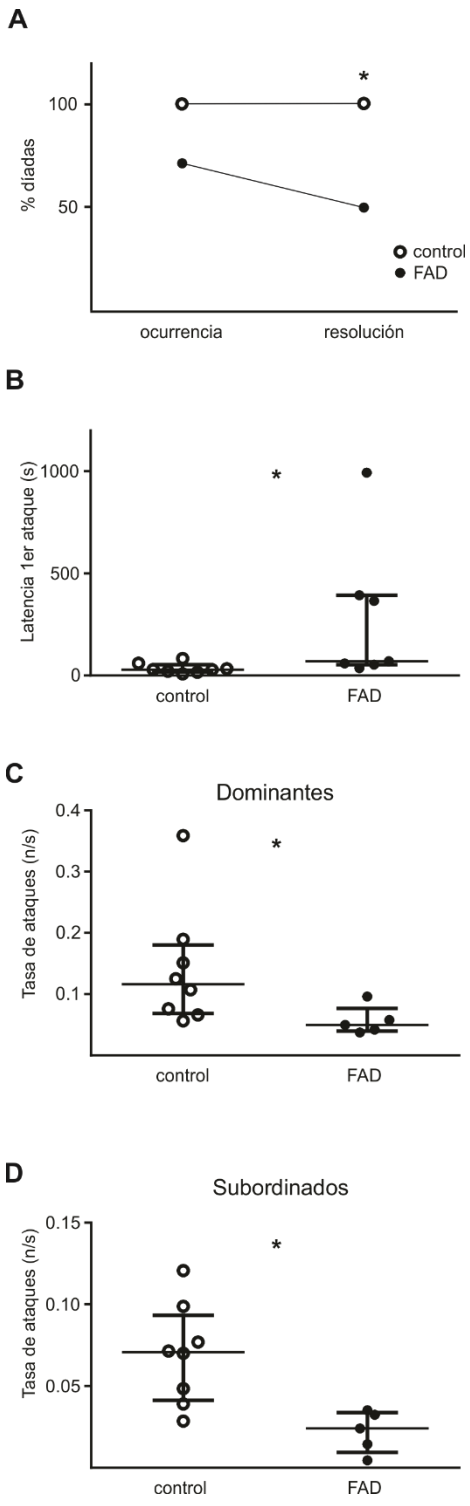

Figura II.3: Efectos de la inhibición aguda de la aromatasa sobre la agresión no reproductiva en hembras. A. En las díadas tratadas con fadrozole (FAD) se observa una menor ocurrencia de conflicto que en las díadas control, y solamente 5 díadas tratadas resuelven el conflicto y establecen el estatus de dominancia/subordinación. B. La latencia al primer ataque en las díadas tratadas con FAD fue significativamente mayor. C. Las hembras que resultaron dominantes desplegaron menor tasa de ataques en comparación con las díadas control. D. Las subordinadas presentaron menores niveles de agresión en las díadas tratadas con FAD en comparación con las díadas control.

MODULACIÓN HORMONAL DE LA AGRESIÓN: INHIBICIÓN AGUDA DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

Con el fin de analizar, si además de la modulación estrogénica, los andrógenos ejercían una acción rápida sobre la agresión territorial no reproductiva femenina de *G. omarorum,* se comparó la conducta agonística de díadas hembra-hembra control con díadas hembra-hembra en las que ambas contendientes fueron tratadas con CA. El bloqueo en agudo de los receptores de andrógenos no tuvo efectos evidenciables sobre el encuentro agonístico en díadas hembra-hembra. No se observaron efectos del tratamiento con CA ni en el enfrentamiento al conflicto, ni en la latencia al primer ataque, ni en los niveles de agresión de dominantes y subordinadas cuando se compararon con las díadas control (latencia al primer ataque: prueba *U* de Mann-Whitney, $p = 0.56$, $n_{CA} = 7$, $n_{CTRL} = 8$; frecuencias de ataque de las dominantes; prueba *U* de Mann-Whitney, $p = 0.67$, $n_{CA} = 7$, $n_{CTRL} = 8$; frecuencias de ataque de las subordinadas: prueba *U* de Mann-Whitney, $p = 0.09$, $n_{CA} = 7$, $n_{CTRL} = 8$). Las subordinadas de las díadas tratadas con CA no se diferenciaron de las subordinadas control en la frecuencia de emisión de interrupciones (prueba *U* de Mann-Whitney, $p =0.45$, $n_{CA} = 7$, $n_{CTRL} = 8$), ni de chirps (prueba *U* de Mann-Whitney, $p =0.25$, $n_{CA} = 7$, $n_{CTRL} = 8$). El rango de frecuencias basales de la DOE fue establecido en la post-resolución de los encuentros agonísticos de díadas tratadas con CA de la misma manera que en díadas control (índice S/D pre-conflicto$_{CA}$ vs índice S/D post-resolución$_{CA}$: test pareado de Wilcoxon, $p = 0.016$, $n = 7$). No solo el índice S/D de frecuencia de la DOE disminuyó luego de la resolución como en las díadas control, sino que sus valores no resultaron diferentes entre díadas tratadas con CA y controles ni en la fase pre-conflicto (prueba *U* de Mann-Whitney, $p = 0.38$, $n_{CA} = 7$, $n_{CTRL} = 7$) ni en la de post-resolución (prueba *U* de Mann-Whitney, $p =, 0.38$, $n_{CA} = 7$, $n_{CTRL} = 7$).

DISCUSIÓN

Este es el primer reporte sobre la evaluación del control hormonal de la agresión no reproductiva en hembras de un teleósteo. Mostramos que a- las hembras no reproductivas de *Gymnotus omarorum* despliegan conducta territorial de manera robusta, b- la agresión depende de la modulación rápida de la aromatasa, revelando la importancia del efecto estrogénico a corto plazo, y c- los andrógenos no presentan modulación rápida sobre esta conducta. En este capítulo se cumplieron los Objetivos específicos II.A-C y los resultados abonaron a la hipótesis de trabajo 2: *en el período no reproductivo la agresión territorial es mantenida por neurosíntesis de estrógenos en ambos sexos.*

La agresión territorial de *G. omarorum* ha sido reportada previamente tanto en machos como en hembras, con la característica de no presentar un sesgo sexual en el resultado de las contiendas (Batista et al., 2012). Sin embargo, para aproximarse a la modulación hormonal de esta conducta, es imperativo analizar la agresión en hembras en detalle de manera separada a la de machos. De hecho, una misma salida conductual puede estar basada en mecanismos que sean diferentes entre sexos (revisado en (De Vries 2004)). Un ejemplo bien estudiado es el comportamiento parental de machos y hembras de ratones de la pradera, que es similar entre sexos, aunque su base neural es sexualmente dimórfica (diferente inervación vasopresinérgica en áreas reguladoras, revisado en (De Vries 2004)). En este trabajo, las hembras de *G. omarorum* mantuvieron contiendas agresivas y escaladas durante el período no reproductivo, compitiendo por un cuerpo de agua como recurso. Luego de una corta evaluación, las contiendas se inician y se resuelven en menos de 5 minutos. La hembra de mayor tamaño resulta dominante, la sumisión se señaliza mediante señales eléctricas sociales, y la dominancia se despliega por la exclusión activa de la subordinada del territorio adquirido a la vez que se establece un ranking de frecuencia de la DOE, como fue previamente reportado (Batista et al. 2012; Perrone y Silva 2018; Zubizarreta et al. 2015). La agresión territorial no reproductiva de *G. omarorum* es extremadamente robusta y

mantiene sus características independientemente del sexo, en encuentros diádicos control, y en animales sexados con inspección quirúrgica (Tabla II.1; Batista et al. 2012; Comas et al. 2019; Jalabert et al. 2015; Perrone et al. 2019; Perrone y Silva 2018; Zubizarreta et al. 2015).

LA AGRESIÓN TERRITORIAL NO REPRODUCTIVA EN HEMBRAS ES INDEPENDIENTE DE LA ACCIÓN DIRECTA DE ANDRÓGENOS

La conversión en el cerebro del precursor circulante adrenal DHEA en esteroides sexuales activos (andrógenos y estrógenos) ha sido reportado como el principal mecanismo de mantenimiento de la agresión no reproductiva en aves y mamíferos (revisado en (Soma et al. 2015)). En este estudio, para explorar el rol de los esteroides sexuales en la agresión no reproductiva en hembras de *G. omarorum*, como primera aproximación realizamos manipulaciones farmacológicas de la vía adrogénica. Las acciones androgénicas rápidas han sido reportadas en rodajas de hipocampo murino, donde los andrógenos promueven cambios en la morfología de las espinas dendríticas que son mediados por receptores que ejercen acciones no genómicas (Soma et al. 2018). Asimismo, las acciones rápidas no genómicas de los andrógenos han sido descriptas en distintos tipos celulares (revisado en (Davey y Grossmann 2016; McEwen y Milner 2017)). En el pez *Lythrypnus dalli* se postula que la agresión territorial depende de las acciones androgénicas rápidas, ya que la conducta aumenta su intensidad luego de 2 horas de la administración del andrógeno no aromatizable 11-KT (Pradhan et al. 2014). El Acetato de Ciproterona es un antagonista de los receptores de andrógeno, incluyendo los que median acciones rápidas (Kim et al. 2007) y fue efectivo en *G. omarorum* ya que bloqueó el cambio inducido por andrógenos en la forma de onda de la DOE (Fig. II.1). Sin embargo, el bloqueo rápido de los receptores de andrógeno no influenció la dinámica de la agresión no reproductiva, los niveles de agresión, ni el establecimiento de la dominancia. Estos resultados sugieren que, si los andrógenos estuvieran involucrados en el mantenimiento de la agresión no reproductiva en hembras, su acción probablemente sea mediada por un mecanismo genómico, y

por lo tanto será evidenciada en un marco temporal más largo. En machos de *G. omarorum* la gonadectomía no afecta la agresión no reproductiva, lo que permite descartar el rol de los andrógenos como moduladores a largo plazo (Jalabert et al. 2015). En el pez *Stegastes nigricans*, que presenta territorialidad durante todo el año, los niveles de andrógenos circulantes durante el período no reproductivo son bajos, y no muestran cambios luego de un encuentro agonístico, aunque el bloqueo a largo plazo de los receptores de andrógeno disminuye la agresión en machos pero no en hembras (Ros et al. 2014; Vullioud et al. 2013). Por lo tanto, en *G. omarorum* aún queda explorar si existe un efecto androgénico a largo plazo sobre la agresión no reproductiva en hembras y machos, independientemente de la fuente de producción.

LA AGRESIÓN TERRITORIAL NO REPRODUCTIVA EN HEMBRAS DEPENDE DE LA SÍNTESIS DE ESTRÓGENOS

Los estrógenos han sido postulados como elementos clave en la regulación de la agresión no reproductiva en modelos de aves y mamíferos. Estudios pioneros en aves muestran que la inhibición a largo plazo de la aromatasa reduce la agresión no reproductiva, y la conducta se recupera mediante el tratamiento con E2 (Soma et al. 2000; Soma et al. 1999). En este trabajo con enfocamos en el rol de la vía estrogénica en la agresión no reproductiva en hembras de *G. omarorum* utilizando la inhibición aguda de la aromatasa, y mostramos que los estrógenos tienen un rol preponderante en la regulación de esta conducta. Se observó una disminución general en la motivación para el despliegue de agresión, evidenciado por un aumento en la latencia al primer ataque, y una disminución en el porcentaje de díadas que alcanzaron la resolución del conflicto (Fig. II.3). Estos resultados son similares a los reportados en machos de *G. omarorum*, donde los potenciales dominantes no logran resolver los conflictos y alcanzar la dominancia cuando se les administra el inhibidor de la aromatasa (Jalabert et al. 2015). Interesantemente, el tratamiento con el inhibidor de aromatasa, a pesar de afectar la intensidad de la agresión no modifica la señalización eléctrica, lo que sugiere que el sistema

electrogenerador no es sensible a los efectos rápidos de los estrógenos. Nuestros resultados sumados a los reportes de la modulación por estrógenos en machos abonan a la hipótesis de la vía estrogénica como un modulador clave en la agresión no reproductiva, actuando a través de mecanismos rápidos en *G. omarorum*. Los efectos rápidos de los estrógenos de origen cerebral han sido reportados como subyacentes a la agresión no reproductiva en aves y mamíferos (Heimovics et al. 2015; Rendon et al. 2017; Soma et al. 2000; Trainor et al. 2007, 2008). Se ha mostrado que la magnitud de los efectos rápidos sobre la conducta dependen de la expresión de receptores de estrógeno en áreas clave del cerebro social, a mayor expresión más sensibilidad (Merritt et al. 2018). Es interesante que la agresión en hembras puede aportar mecanismos de regulación novedosos y sexualmente dimórficos. Estudios de tejido cerebral de aves canoras *in vitro* muestran que el E2 provoca una disminución rápida (10 min.) de la actividad enzimática que convierte DHEA en esteroides sexuales activos, y este efecto es más pronunciado en hembras que en machos (Pradhan et al. 2008). Las hembras del hámster Siberiano despliegan altos niveles de agresión no reproductiva, y en este período presentan bajos niveles circulantes de E2 que se acompañan de un aumento estacional en la expresión de receptores de estrógeno en áreas cerebrales asociadas a la agresión (Rendon et al. 2017). Los peces teleósteos emergen como modelo ventajoso para esta aproximación ya que presentan actividad aromatasa excepcionalmente alta que muestra tanto plasticidad estacional como dimorfismo sexual (revisado en (Diotel et al. 2010)).

COMENTARIO FINAL

Los resultados de este capítulo abonan a la hipótesis de trabajo 2 que postula: *En el período no reproductivo la agresión territorial es mantenida por neurosíntesis de estrógenos en ambos sexos.* Mostramos por primera vez en hembras de teleósteo que la agresión no reproductiva depende de la producción de estrógenos. En las hembras de *Gymnotus omarorum* es necesaria la síntesis rápida de estrógenos para desplegar conducta agonística territorial, mantener los niveles normales de

agresión, y alcanzar la resolución del conflicto. Los resultados de este estudio, junto con los reportes en machos de esta misma especie y trabajos previos en aves y mamíferos, resaltan la importancia de la acción rápida de los estrógenos en el control de la agresión no reproductiva, y sugiere fuertemente la existencia de estrategias comunes entre especies.

CAPÍTULO III. CARACTERIZACIÓN DE LOS PERFILES ESTEROIDEOS CIRCULANTES Y CEREBRALES DE ANIMALES NO REPRODUCTIVOS

III. Estudiar los perfiles esteroideos cerebrales y circulantes basales de adultos no reproductivos

III.A. Poner a punto un método de cuantificación de esteroides que permita la cuantificación simultánea de múltiples hormonas en plasma y cerebro a nivel individual en animales no reproductivos

III.B. Caracterizar el perfil esteroideo plasmático de hembras y machos no reproductivos. Realizar la comparación sexual.

III.C. Caracterizar el perfil esteroideo cerebral de hembras y machos no reproductivos. Realizar la comparación sexual.

III.D. Comparar los niveles hormonales entre plasma y cerebro.

MÉTODOS

Colecta de muestras

Las muestras de plasma y cerebro provienen de hembras y machos adultos (n = 11 por sexo), capturados durante el período no reproductivo (en el mes de junio del 2018) en la Laguna de los Cisnes, Maldonado, Uruguay. La colecta de muestras se realizó durante la fase de reposo de los animales, y el método de captura (descripto en el Capítulo 1) consiste en localizar los individuos con un detector y utilizar un calderín para levantar la vegetación y el pez. Inmediatamente luego de la captura los individuos se anestesiaron sumergiéndolos en una solución con eugenol (1.2 mg/l, previa disolución en alcohol 70%). Para minimizar el tiempo entre captura y colecta de muestras se utilizó una mesada flotante, donde se midió el largo de los individuos y se realizó la extracción de sangre de la vena caudal con una jeringa heparinizada. Las muestras que sobrepasaron los 3 min de extracción no formaron parte del estudio, y se reservaron para el desarrollo metodológico. Al cabo de 3

minutos se finalizó la extracción de sangre y se decapitó para evitar que la respuesta de estrés afecte los niveles hormonales basales (Dunlap et al. 2000; Fox et al. 1997; Salazar y Stoddard 2008). La sangre se conservó en hielo hasta la hora de centrifugación en el laboratorio (aproximadamente 5 horas). Luego de la decapitación se transportó el cráneo en hielo hasta la orilla, y se extrajo el cerebro que fue rápidamente congelado en hielo seco en polvo, y almacenado en hielo seco hasta la llegada al laboratorio. El tiempo entre la decapitación y el congelado del cerebro siempre fue menor a 90 seg. Luego se extrajeron las gónadas, que se almacenaron en hielo seco. Una vez en el laboratorio se determinó el peso de las gónadas y el peso corporal. Para calcular el índice gonadosomático se sumó el peso de las gónadas al peso corporal, y el índice se calculó de la siguiente manera: [peso gonadal / peso corporal] x 100. La sangre se centrifugó (3000rpm, 10 min) y el plasma se almacenó a -80, junto con los cerebros correspondientes.

Disección de cerebros

Se disecó cerebro anterior que incluye nodos de la RCS (O'Connell y Hofmann 2012): área preóptica (POA), hipotálamo anterior, hipotálamo ventromedial, septum lateral, stria terminalis, entre otras. En la disección se excluyeron el cerebelo y el tectum óptico, por no tener un rol preponderante en la regulación de las conductas sociales. Asimismo, se excluyó la hipófisis, que en *G. omarorum* usualmente se separa del cerebro al momento de su extracción ya que queda inserta en la fosa hipofisaria. La disección se llevó a cabo sobre una placa de metal congelada y rodeada de hielo seco, bajo lupa. Los cerebros congelados a -80 se montaron en tissue tek, y se fijaron a la placa por su superficie dorsal, exponiendo la superficie ventral. El corte se realizó en el plano coronal como se indica en la Figura III.1 (siguiendo a Pouso et al. 2017), con una cuchilla de crióstato caliente. Luego de realizar el corte coronal, la pieza se montó nuevamente sobre tissuetek, apoyando la superficie caudal a la placa, para resecar el cerebelo, y el téctum óptico bilateralmente (líneas punteadas, Fig. III.1B). Los sectores disecados se colocaron

en viales de polipropileno de 2 ml (Sarstedt AG y Co.) y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

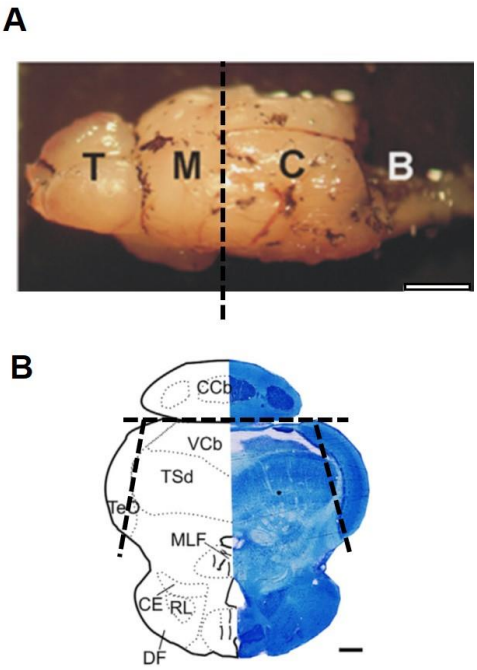

Figura III.1: Disección de cerebro anterior de *Gymnotus omarorum* para posterior cuantificación de esteroides por LC-MS/MS. A- El primer corte se realizó en el plano coronal, como indica la línea punteada. B- La figura representa la vista desde la cara rostral en el lugar del primero corte. Luego de realizar el corte coronal, la pieza se apoyó por la superficie caudal, para resecar el cerebelo, y el téctum óptico bilateralmente, como indican las líneas punteadas. Modificado de (Pouso et al. 2017)

Desarrollo del método de extracción

La interferencia (supresión o potenciación) es un fenómeno que ocurre cuando la eficiencia de ionización del analito de interés es modificada por la ionización de otros analitos provenientes de la matriz biológica. Cuando esto ocurre, disminuye la capacidad de detección del analito de interés, y por ende su cuantificación. En especial, el tejido cerebral posee gran contenido lipídico, lo que provoca interferencia. Por lo tanto, para la cuantificación de este tipo de muestras es necesario separar los esteroides de sustancias que interfieren utilizando extracción líquido-líquido o extracción en fase sólida (Appelblad y Irgum 2002; Taves et al., 2011). En la puesta a punto del método de extracción el primer aspecto que se abordó fue la evaluación de la interferencia por tratarse de un factor limitante de la cuantificación, que aumenta a mayor cantidad de tejido. La interferencia se evaluó

cuantificando el porcentaje de señal de los estándares internos en muestras con tejido biológico en relación con la señal de los mismos estándares en viales sin tejido (expresado gráficamente como % Área blanco). De esta manera, si el valor es <100% existe supresión, y si es >100% hay potenciación. Los estándares internos son esteroides deuterados preparados en 50% Metanol HPLC (progesterona-d9, cortisol F-d4, DHEA-d6, testosterona-d5, 17β-estradiol-d4; C/D/N Isotopes Inc., Pointe-Claire, Canada).

En una segunda etapa, la pérdida de esteroides en el proceso de extracción se evaluó en los diferentes protocolos comparando la señal (Área) de estándares internos en una solución de MeOH (blanco) sometidos al proceso de extracción.

Extracción de esteroides

Los esteroides se extrajeron de muestras de cerebro y plasma utilizando un protocolo que consistió en una extracción líquido-líquido seguida por una extracción en fase sólida (Fig. III.2). El protocolo que se detalla a continuación es el resultado final de un desarrollo metodológico que se muestra en la primera sección de resultados. El tejido (25 mg aproximadamente) o plasma (25 µl) se colocó en viales de 2 ml (Sarstedt AG y Co.) y a cada uno se le agregó 5 beads de cerámica (diámetro 1.4 mm, Fisher Scientific). Se utilizaron estándares internos para evaluar y corregir: a- el porcentaje de recuperación (en caso de pérdida por procedimiento) y b- la interferencia provocada por la matriz en cada muestra. A cada vial se agregó 50 µL de estándares internos (se agregaron a los viales con los que se construyen los puntos de la curva de calibración y a las muestras). A los viales se les agregó 1 ml de Etilacetato HPLC y las muestras se homogeneizaron utilizando un *bead mill homogenizer* a 4 m/s durante 30 s (Omni International Inc., Kennesaw, GA). Luego las muestras se centrifugaron a 16,100g durante 5 min, y 1 mL del sobrenadante se transfirió a tubos de vidrio de borosilicato (VWR International). Este paso se repitió una vez más. A los tubos que contienen 2 ml de Etilacetato se les agregó 500ul de agua miliQ, se vortexeó durante 16 s y se centrifugó a temperatura ambiente 3200g durante 1 min. El sobrenadante se retiró y colocó en un tubo de vidrio, y el Etilacetato

se secó en speedvac a 60°C durante 45 min. Luego del secado, se resuspendió en el pellet 500 ul de Metanol HPLC y se agitó con un vortex durante 20 segundos. A esta muestra resuspendida se le realizó una extracción en fase sólida (SPE). Las columnas C18 (Waters) se acondicionaron sucesivamente con 3 ml de Hexano HPLC, 3 ml de Acetona HPLC y 3 ml de MeOH HPLC. Se sembraron los 500 ul de muestra resuspendida en MeOH en las columnas y se colectó en un tubo de vidrio. Se eluyó la muestra en 2 ml de MeOH HPLC. Los 2.5 ml de eluido se secaron en speedvac durante 50 min a 60°C. La muestra se resuspendió en 55 ul de MeOH 25%, se aplicó vortex por 5 seg y se centrifugó a 3200g durante 1 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo de 0.6ml, que se centrifugó a 16100g por 2 min. Se tranfirió 50 ul de sobrenadante al inserto (Agilent, Santa Clara, CA), que se colocó dentro de un vial y se conservó a -20 °C hasta el día siguiente en el que se inyectó.
Todo el material de vidrio se limpió previamente con MeOH de calidad HPLC.

Las muestras se procesaron en paralelo con los blancos y las curvas de calibración. Las curvas de calibración se construyeron utilizando estándares de referencia certificados (Cerilliant Co., Round Rock, TX) preparados en metanol HPLC al 50%. Los rangos correspondientes a los diferentes estándares en las curvas de calibración fueron 0.2 a 1000 pg para la testosterona y la estrona, 0.4 a 1000 pg para la androstenediona y la 11-cetotestosterona, 0.8 a 1000 pg para el cortisol, la progesterona y el 17β-Estradiol, y 20 a 10,000 pg para la dehidroepiandrosterona.

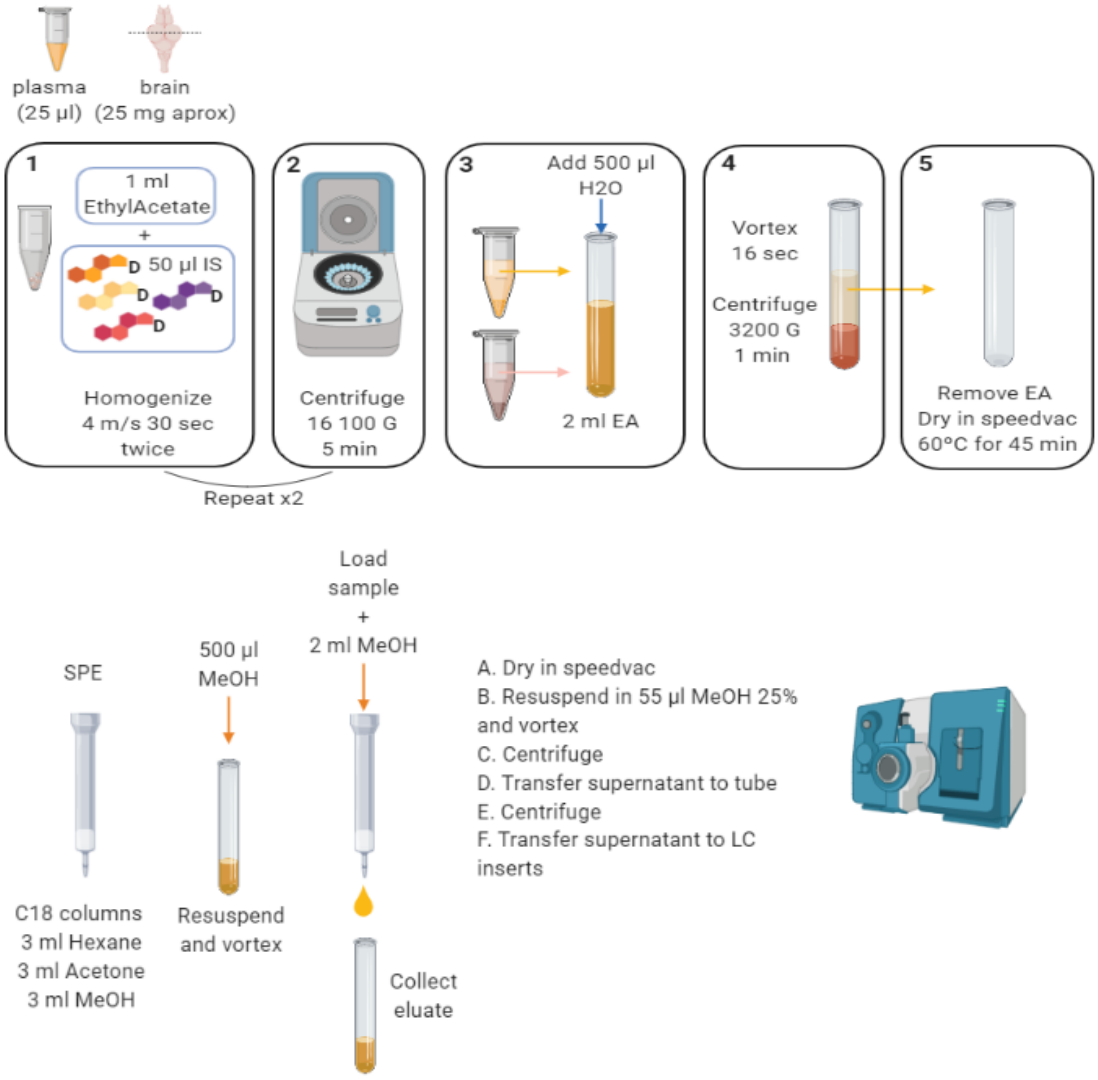

Figura III.2: Preparación de muestras de cerebro y plasma de *Gymnotus omarorum* para posterior cuantificación por LC-MS/MS.

Análisis de esteroides por LC-MS/MS

Los esteroides se cuantificaron utilizando un sistema Sciex QTRAP 6500 UHPLC-MS/MS como fue descripto previamente (Tobiansky et al. 2017). Las muestras se transfirieron a un autoinyector refrigerado (15°C). Luego, 45 µL de la muestra preparada previamente se inyectó en un sistema Nexera X2 UHPLC (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan), pasó a través de un filtro KrudKatcher ULTRA HPLC (Phenomenex, Torrance, CA) seguido de una columna Poroshell 120 HPH C18 (2.1

mm) y separada mediante una columna Poroshell 120 HPH C18 (2.1 x 50 mm; 2.7 µm; a 40°C) utilizando fluoruro de amonio diluido en agua MilliQ 0.1 mM (fase móvil A) y Metanol HPLC (fase móvil B, FMB). The flow rate was 0.4 mL/min. El protocolo fue el siguiente: Durante la carga, la FMB fue del 10% durante 0.5 min, luego desde los 0.6 a los 4 min el gradiente correspondió en un 42%a la FMB, y presentó una rampa que finalizó en el 60% hasta los 9.4 min. Desde los 9.4 a los 9.5 min el gradiente fue del 60-70% FMB, y se aplicó una rampa que finalizó en el 98% de FMB a los 11.9 min. Finalmente se lavó la columna desde los 11.9 a los 13.4 min con una FMB al 98%. Luego se volvió a la condición inicial de FMB al 10% durante 1 min. La duración total de la corrida fue de 14.9 min.

Tabla III.1: Parámetros utilizados en el análisis de los diferentes esteroides por LC-MS/MS.

Esteroide	Modo de Ionización	Tiempo de retención (min)	Cuantificador m/z	Calificador m/z
Progesterona	ESI +	10.34	315.2→97.0	315.2→109.1
Pg-d9	ESI +	10.31	324.2→100.0	-
Cortisol	ESI +	3.91	363.3→121.2	363.3→327.1
F-d8	ESI +	3.88	367.2→121.1	-
Dehidroepiandrosterona	ESI +	8.51	271.1→253.0	271.1→213.2
DHEA-d6	ESI +	8.43	277.1→219.2	-
Androstenediona	ESI +	7.15	287.2→97.2	287.2→109.1
Testosterona	ESI +	7.96	289.0→97.0	289.0→109.1
11-Cetotestosterona	ESI +	4.16	303.2→121.0	303.2→259.2
T-d5	ESI +	7.88	294.0→100.0	-
17β-Estradiol	ESI -	7.41	271.0→145.0	271.0→143.0
Estrona	ESI -	7.31	269.0→145.0	269.0→143.0
E_2-d4	ESI -	7.35	275.0→147.0	-

Se muestra el modo de ionización positiva o negativa; los tiempos de retención, y las transiciones iónicas para cada esteroide y estándar interno.

Abreviaturas: Pg, Progesterona; F, Cortisol; DHEA, Dehidroepiandrosterona; T, Testosterona; E_2, 17β-Estradiol; ESI, ionización electrospray.

La aguja de inyección fue lavada externamente con isopropanol 100% antes y después de cada inyección.

Se monitorizaron las reacciones de transición iónica masa/carga (m/z); para cada esteroide se utilizaron 2 transiciones (iones cuantificador y calificador) y para cada estándar interno deuterado se utilizó una única transición (Tabla III.1). Las concentraciones de los esteroides se adquirieron en un cuadrupolo triple en tándem con un espectrómetro de masa Sciex 6500 Qtrap (Sciex LLC, Framingham, MA) en modo de ionización electrospray positivo para todos los esteroides excepto la estrona y el 17β-estradiol, que fueron adquiridos en un modo de ionización electrospray negativo (Figura III.3). La masa (expresada en pg) de cada esteroide se calcula como el área bajo la curva corregido por el área de estándar interno correspondiente a esa misma muestra. De esta manera se normaliza la señal para corregir interferencia o pérdida por procedimiento.

Todos los blancos estuvieron por debajo del estándar menos concentrado en la curva de calibración. El porcentaje de recuperación se evaluó para plasma y cerebro por separado, comparando muestras con una concentración conocida es estándares (spiked) con muestras sin la adición de estándares (unspiked). La precisión se evaluó midiendo la señal de un control de calidad de concentración conocida en neat solution (Tabla III.2). La precisión se evaluó comparando 5 réplicas del control de calidad entre diferentes corridas (variación intrer-ensayo) y en la misma corrida (variación intra-ensayo) (Tabla III.2).

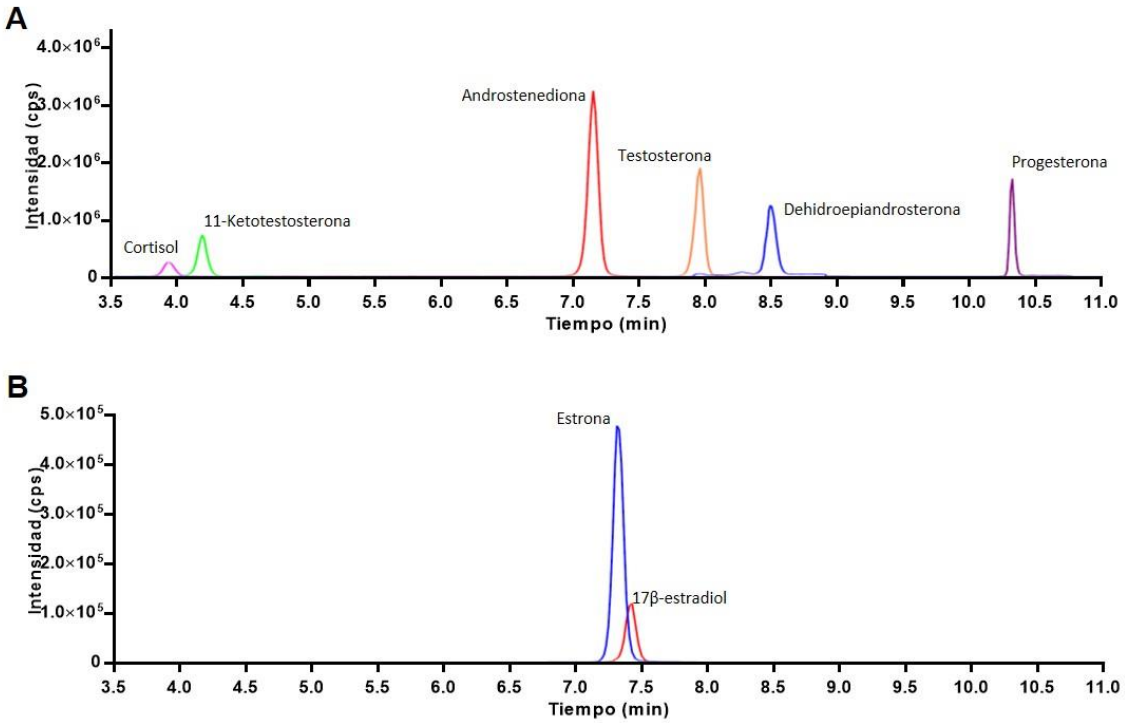

Figura III.3: Cromatograma representativo de los iones cuantificadores de los esteroides analizados. La muestra es una mezcla de esteroides estándar de referencia certificados (100 pg para todos los esteroides excepto el DHEA que es 1000 pg). A- Se muestran los esteroides ionizados en el modo electrospray positivo. B- Se muestran los esteroides ionizados en el modo electrospray negativo. La intensidad está expresada en conteos por segundo (cps).

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con GraphPad Prism versión 6.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Un valor se consideró no-detectable si se encuentra por debajo del estándar menos concentrado de la curva de calibración. Cuando los valores detectables dentro de un grupo fueron >20%, los valores faltantes se estimaron por el método de imputación por regresión utilizando el recurso web MetImp (Wei et al., 2018). Por el contrario, cuando los valores faltantes de un grupo fueron <20%, a los no detectables se les asignó el valor de 0.

Cuando fue necesario, los datos se transformaron con Log., previamente al análisis de normalidad. La comparación entre las diferentes hormonas en los perfiles circulantes y cerebrales dentro de cada sexo se analizaron con un ANOVA de una

vía de medidas repetidas. Los análisis se siguieron con el test de Tukey de comparaciones múltiples, y en el texto se muestran los valores de p corregidos. Las comparaciones de cada esteroide entre hembras y machos se realizaron por el test de t. Las comparaciones de un mismo esteroide dentro de cada sexo se realizaron con el test de t pareado. El criterio de significancia para todos los análisis estadísticos fue $p < 0.05$. Las gráficas se expresan como media ± error estándar de la media, y se muestran los valores sin transformar.

Para la comparación entre los niveles de esteroides en cerebro y plasma se asumió que 1ml de plasma pesa 1 g. Para evaluar la fuente de producción hormonal se calculó la diferencia entre las concentraciones plasmáticas y cerebrales para cada individuo. La relación entre los esteroides sexuales cerebrales se exploró mediante correlaciones lineales tomando en cuenta pares de hormonas que forman un binomio sustrato-producto. Para las regresiones lineales las concentraciones se expresaron en nM, con el objetivo de comparar entre diferentes esteroides.

Tabla III.2: Recuperación en diferentes matrices y precisión del ensayo.

	% Recuperación			% de Variación	
Esteroide	Neta	Plasma (25µL)	Cerebro (25 mg)	Intra-ensayo	Inter-ensayo
Progesterona	-	-	-	13.6	14.5
Cortisol	113.8	110.2	107.6	33.5	46.7
Dehidroepiandrosterona	131.5	89.9	117.6	15.5	21.8
Androstenediona	110.4	114	87.5	10.8	10.8
Testosterona	102	100.5	96.9	15.2	19.7
11-Cetotestosterona	75.9	135.3	93.3	33.3	33.3
17β-estradiol	114.8	90.1	76.7	8.2	8.3
Estrona	112	85.9	96.2	5.3	5.3

Nota: Las muestras fueron *spikeadas* con 2 pg para todos los esteroides excepto DHEA (20 pg). La progesterona presentó efecto matriz, que provocó una potenciación e inhabilitó el cálculo de % de recuperación.

RESULTADOS

DESARROLLO DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES PARA POSTERIOR CUANTIFICACIÓN POR LC-MS/MS

En una primera aproximación a la técnica de extracción se evaluó si existe interferencia (supresión o potenciación) de la señal de estándar interno. Para esto se calculó el % de señal de estándar interno en las muestras extraídas en relación con la señal en muestras extraídas sin tejido biológico (% Área blanco). El primer método que se ensayó fue uno que ya estaba validado para muestras de plasma y tejido cerebral de la especie *Melospiza melodia* (gorrión) y en ratas (Heimovics et al. 2018; Tobiansky et al. 2017). El método consiste en la extracción líquido-líquido con Acetonitrilo (ACN) y Hexano (HEX). El tejido se homogeneiza con Acetonitrilo y el sobrenadante se mezcla con Hexano. Posteriormente, se remueve el HEX y la fracción que contiene los esteroides (ACN) se seca y se reconstituye en metanol para su inyección en el LC-MS/MS. En las muestras de plasma (5 y 10 µl) este método de extracción fue efectivo en eliminar la interferencia en todas las estirpes esteroideas, evidenciándose niveles mayores de supresión a mayor volumen de muestra, aunque la diferencia no es relevante (Fig. III.4). Sin embargo, la extracción líquido-líquido con ACN y HEX no fue efectiva en eliminar la interferencia en el tejido cerebral, y los esteroides que se vieron más afectados fueron los andrógenos. Como muestra la Figura III.5 se constató una supresión del 80% en la T-D5 y la DHEA, aun utilizando la menor cantidad de tejido (0.5 mg). Para tener una referencia, el telencéfalo de *G. omarorum* pesa 20 mg aproximadamente, por lo que este método de extracción no es adecuado para el tejido cerebral de *G. omarorum*.

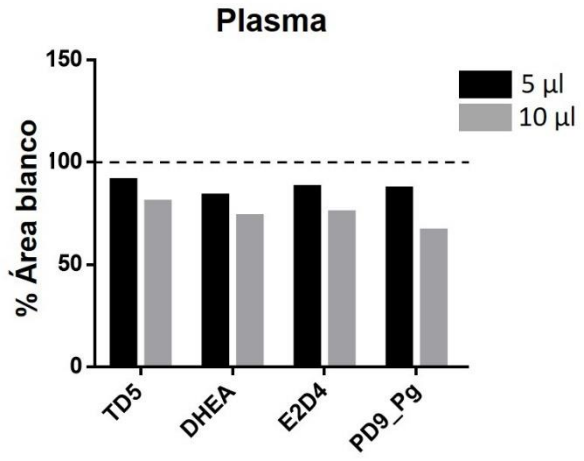

Figura III.4: Extracción líquido-líquido con Acetonitrilo y Hexano en muestras de plasma. El % Área blanco representa el porcentaje de área de la señal de cada estándar interno extraído con muestra biológica con respecto al área del mismo estándar extraído sin muestra biológica. Se utilizaron dos volúmenes de plasma (5 y 10 µl). La línea punteada indica cuando el área del estándar interno es igual con en la extracción y sin muestra biológica (0% de interferencia).

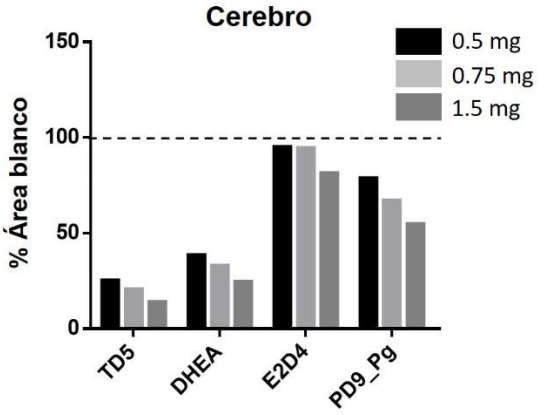

Figura III.5: Extracción líquido-líquido con Acetonitrilo y Hexano en muestras de cerebro. El % Área blanco representa el porcentaje de área de la señal de cada estándar interno extraído con muestra biológica con respecto al área del mismo estándar extraído sin muestra biológica. Se utilizaron 3 cantidades de tejido (0.5, 0.75 y 1.5 mg). La línea punteada indica cuando el área del estándar interno es igual en la extracción con y sin muestra biológica (0% de interferencia).

Como la extracción líquido-líquido no fue efectiva en eliminar la interferencia en los andrógenos, se pasó a probar la extracción en fase sólida (SPE), que es más potente en purificar muestras. Se ensayaron dos métodos diferentes de SPE. En el método de SPE rápida se utilizan columnas de C18 acondicionadas con Hexano, Acetona y MeOH. El tejido se homogeneiza con Acetonitrilo y el sobrenadante se seca, y se resuspende en MeOH

para sembrar. En esta SPE, las columnas se utilizan como filtro, por lo que los esteroides resuspendidos en MeOH se siembran en la columna y se recogen en el

eluído agregando más MeOH. A continuación, el eluído se seca y se resuspende en MeOH para la inyección en el LC-MS/MS. El segundo método de SPE lenta consiste en utilizar las columnas C18 acondicionadas con MeOH y H2O para capturar los esteroides. El tejido se homogeneiza con MeOH 84% y el sobrenadante se mezcla con 5 ml de H2O para sembrar. La muestra se siembra, luego se realiza una elución de interferencia con MeOH 40%, y los esteroides retenidos en la columna se eluyen finalmente con MeOH 90%. A continuación, el eluído se seca y se resuspende en MeOH para la inyección en el LC-MS/MS. Cuando comparamos estos dos métodos de extracción, podemos ver que el rápido es más efectivo en eliminar la interferencia, ya que para todas las cantidades de tejido y los 3 estándares analizados presentó menores niveles de supresión que la SPE lenta (Fig. III.6). En la Figura III.6 se puede apreciar como aumenta la supresión a medida que se incrementa la cantidad de tejido, y esto ocurre en todas las estirpes esteroideas en mayor o menor medida, siendo los andrógenos los más afectados. Como el objetivo era cuantificar en el cerebro anterior, que tiene un peso aproximado de 30 mg, fue necesario seguir aumentando la eficiencia en la eliminación de interferencia.

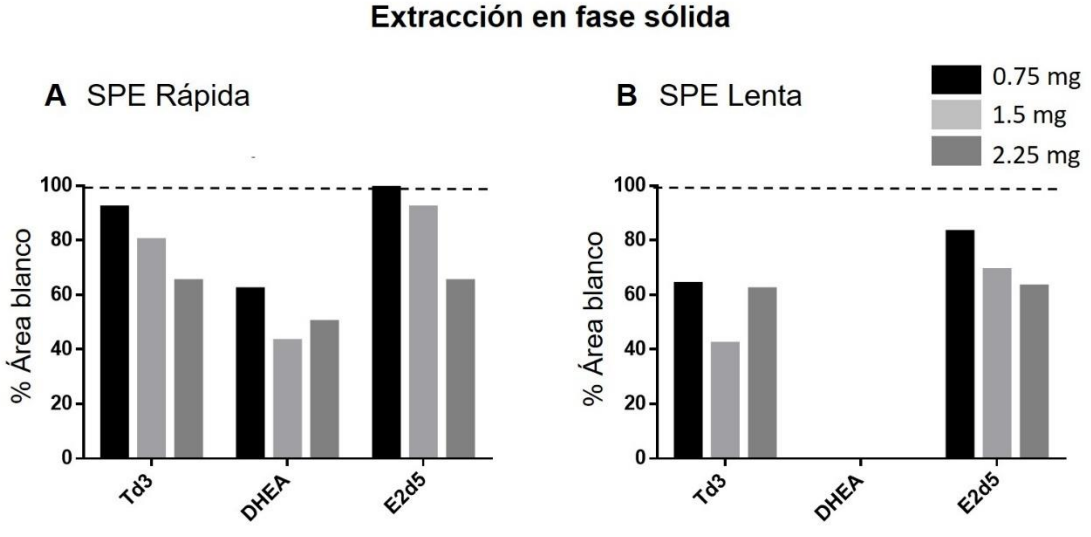

Figura III.6: Extracciones en fase sólida en muestras de cerebro. A- SPE rápida. B- SPE lenta. El % Área blanco representa el porcentaje de área de la señal de cada estándar interno extraído con muestra biológica con respecto al área del mismo estándar extraído sin muestra biológica. Se utilizaron 3 cantidades de tejido (0.75, 1.5 y 2.25 mg). La línea

punteada indica cuando el área del estándar interno es igual en la extracción con y sin muestra biológica (0% de interferencia).

Se conservó la SPE rápida y se acoplaron 3 extracciones líquido-líquido diferentes previas a la SPE (Acetonitrilo/Hexano, Etilacetato/H2O, Etilacetato+Hexano/H2O). Como se observa en la Figura 7, acoplar una extracción líquido-líquido con ACN y HEX previo a la SPE rápida no elimina la supresión de los andrógenos, que continúa siendo del 40% de la señal (Fig. III.7A vs B). Por otro lado, el agregado de extracciones líquido-líquido con Etilacetato (EA) y H2O previo a la SPE sí eliminan de mejor manera la supresión, y para las dos estirpes androgénicas la más eficaz fue la que no incorporó HEX al EA (Fig. III.7C vs D). Incorporar HEX al EA provoca una mayor supresión del Estrógeno también (Fig. III.7D). En suma, de las diferentes combinaciones la que dió los mejores resultados en cuanto a la eliminación de la interferencia fue la de Etilacetato/H2O acoplada a una SPE rápida.

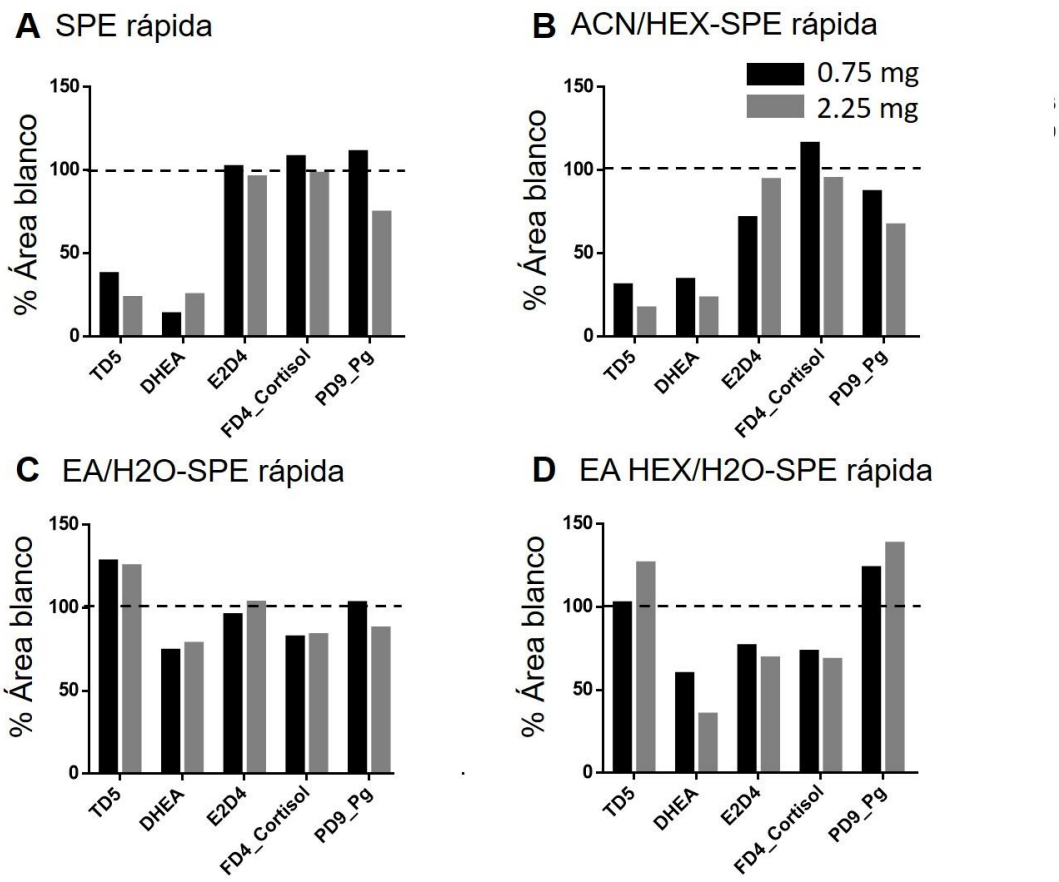

Figura III.7: Extracciones en fase sólida acopladas a protocolos de extracción líquido-líquido en muestras de cerebro. A- SPE rápida. B- Extracción líquido-líquido con Acetonitrilo y Hexano, luego del secado del ACN se resuspende en MeOH y se realiza una SPE rápida. C- Extracción líquido-líquido con Etilacetato y H2O, luego del secado del H2O se resuspende en MeOH y se realiza una SPE rápida. D- Extracción líquido-líquido con Etilacetato + Hexano y H2O, luego del secado del H2O se resuspende en MeOH y se realiza una SPE rápida. El % Área blanco representa el porcentaje de área de la señal de cada estándar interno extraído con muestra biológica con respecto al área del mismo estándar extraído sin muestra biológica. Se utilizaron 2 cantidades de tejido (0.75 y 2.25 mg). La línea punteada indica cuando el área del estándar interno es igual en la extracción con y sin muestra biológica (0% de interferencia).

Como el objetivo fue cuantificar en muestras de cerebro anterior esto impone un compromiso ya que cuanto mayor es la cantidad de tejido, mayor es la supresión. Esto fuerza a realizar protocolos de extracción eficientes que purifiquen la muestra para eliminar la interferencia de la matriz, pero cuanto mayor es esta purificación hay más riesgo de pérdida de los esteroides de interés. Para avanzar en un protocolo de extracción optimizado, se continuó con cantidades de tejido cerebral de 20 mg y se evaluó además de la interferencia, la pérdida de estándar (comparando las áreas de los estándares sin muestra biológica sometidos a extracciones en los diferentes protocolos). La extracción líquida de EA/H2O acoplada a SPE rápida probó ser efectiva en eliminar la interferencia de todas las estirpes esteroideas en muestras de hasta 2.25 mg. Sin embargo, este protocolo es largo y más costoso que las extracciones líquidas debido al uso de columnas C18, por lo que a continuación se ensayaron combinaciones de extracciones líquidas. Se realizó una extracción líquida con EA/H2O, una extracción líquida con ACN/HEX seguida de un secado y resuspensión en EA al que se extrajo nuevamente con H2O, y por último, una extracción líquida con EA/H2O seguida de un secado y resuspensión en ACN al que se extrajo nuevamente con HEX (Fig. III.8). En la comparación de las tres extracciones no se verificaron grandes diferencias en la pérdida de estándares por procedimiento, ya que el área de los estándares fue similar entre los diferentes protocolos (Fig. III.8A). Si se comparan los niveles de supresión en los tres protocolos se evidencia la eficacia de las dos extracciones líquidas en comparación con una única extracción, donde la supresión fue mucho

mayor (Fig. III.8B). Las dos extracciones líquidas dobles fueron similares en cuanto a la eliminación de la interferencia, siendo la de ACN/HEX primero un poco mejor que la otra. Es de notar que con los protocolos de extracción líquida ningún esteroide superó el 80% de señal respecto al blanco, por lo que se optó por continuar por el camino del protocolo líquido EA/H2O acoplado a SPE rápida.

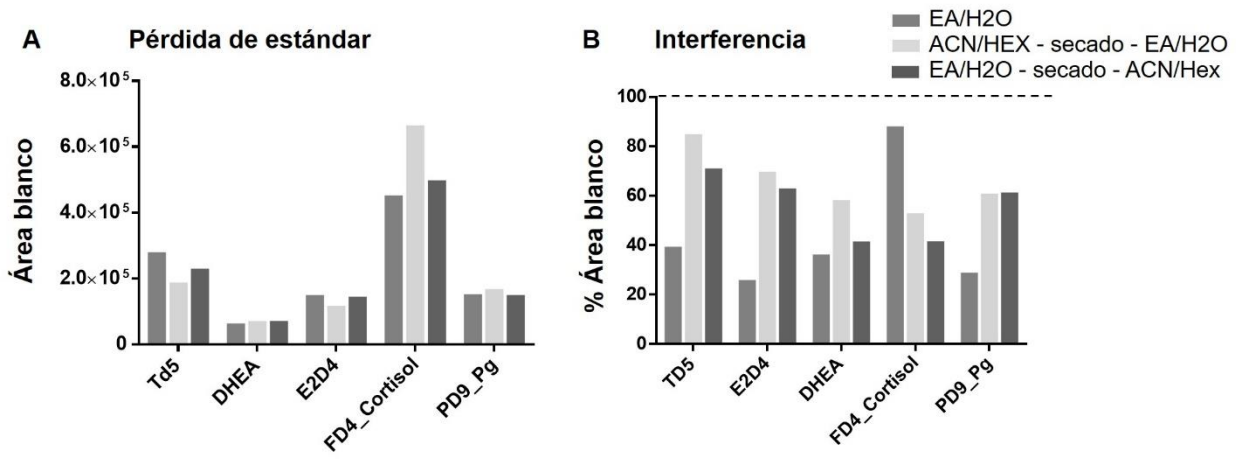

Figura III.8: Protocolos de extracción líquido-líquido en muestras de 20 mg. de cerebro. Se ilustran 3 protocolos de extracción líquida: Primero, con EA/H2O, segundo, una extracción líquida con ACN/HEX seguida de un secado y resuspensión en EA al que se extrajo nuevamente con H2O, y por último, una extracción líquida con EA/H2O seguida de un secado y resuspensión en ACN al que se extrajo nuevamente con HEX. A- Evaluación de la pérdida de estándares internos por los procedimientos de extracción. Se muestra la señal (áreas de los estándares) en una solución blanco (MeOH sin muestra biológica). B- El % Área blanco representa el porcentaje de área de la señal de cada estándar interno extraído con muestra biológica con respecto al área del mismo estándar extraído sin muestra biológica. La línea punteada indica cuando el área del estándar interno es igual en la extracción con y sin muestra biológica (0% de interferencia).

La Figura III.9 muestra los resultados de las extracciones líquidas con Etilacetato y H2O. En primer lugar, se puede apreciar que el acoplamiento de una SPE provoca pérdida de estándares ya que la señal es mayor con el protocolo que implica solo la extracción líquida con EA/H2O (Fig. III.9A). Por otro lado, el protocolo que tiene la menor pérdida de estándares no es eficaz en eliminar la interferencia en las muestras con 20 mg. de tejido cerebral (Fig. III.9B). En la comparación entre los dos

protocolos con SPE asociados se evidencia que el secado y resuspensión con MeOH no afecta mayormente la pérdida de estándar (Fig. III.9A), ya que algunos esteroides incluso tienen una señal mayor que el protocolo donde se siembra directamente el EA en la SPE. Los niveles de interferencia fueron similares para todos los esteroides, menos para la T y el E2, donde el protocolo que involucra secado del EA y posterior resuspensión en MeOH para el SPE presentó menos interferencia (Fig. III.9B).

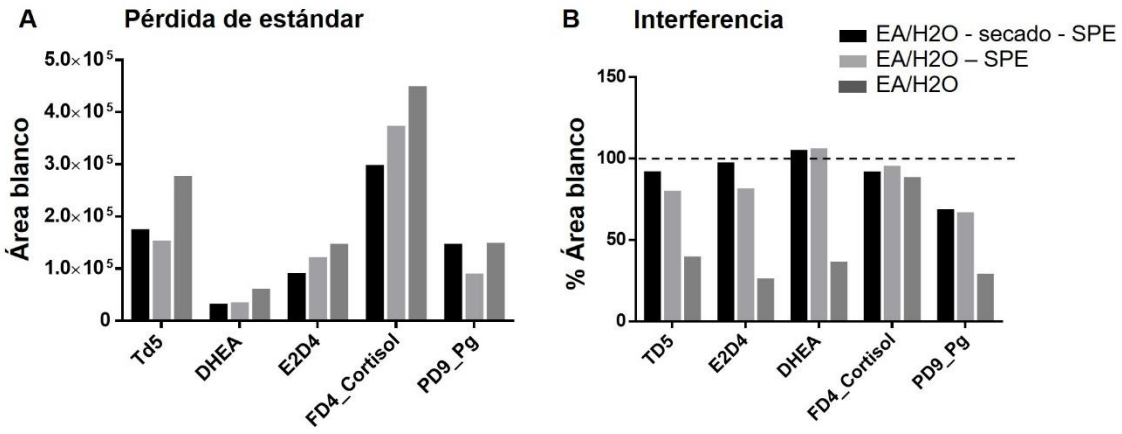

Figura III.9: Protocolos de extracción líquido-líquido con Etilacetato y acopladas a extracciones en fase sólida en muestras de 20 mg. de cerebro. Se ilustran 3 protocolos de extracción: Primero, con EA/H2O, segundo, una extracción líquida con EA/H2O seguida de un secado y resuspensión en MeOH que se extrajo nuevamente con SPE rápida, y por último, una extracción líquida con EA/H2O cuya fracción de EA que se extrajo nuevamente con SPE rápida. A- Evaluación de la pérdida de estándares internos por los procedimientos de extracción. Se muestra la señal (áreas de los estándares) en una solución blanco (MeOH sin muestra biológica). B- El % Área blanco representa el porcentaje de área de la señal de cada estándar interno extraído con muestra biológica con respecto al área del mismo estándar extraído sin muestra biológica. La línea punteada indica cuando el área del estándar interno es igual en la extracción con y sin muestra biológica (0% de interferencia).

Habiendo seleccionado el protocolo de SPE con EA y H2O con secado, resuspensión en MeOH y una SPE rápida, el paso siguiente fue poner a prueba dicho protocolo incrementando la cantidad de tejido. Como muestra la Figura III.10, los niveles de supresión fueron mínimos para todas las estirpes esteroideas, y la interferencia no se incrementó con la cantidad de tejido.

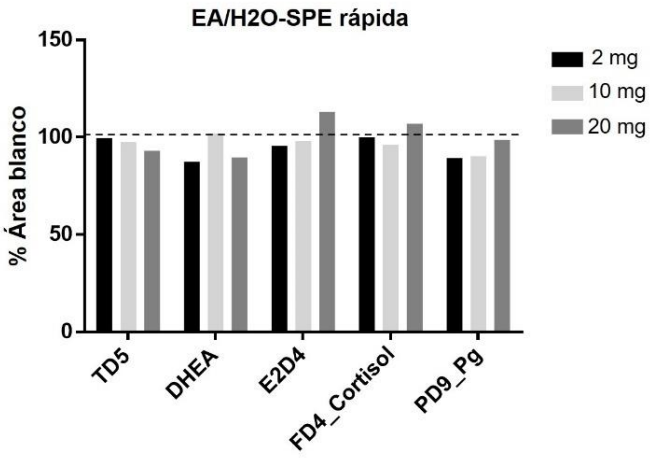

Figura III.10: Extracción líquido-líquido con Etilacetato y H2O acoplada a extracción en fase sólida rápida con cantidades crecientes de tejido cerebral. El % Área blanco representa el porcentaje de área de la señal de cada estándar interno extraído con muestra biológica con respecto al área del mismo estándar extraído sin muestra biológica. Se utilizaron 3 cantidades de tejido (2, 10 y 20 mg). La línea punteada indica cuando el área del estándar interno es igual en la extracción con y sin muestra biológica (0% de interferencia).

PERFIL HORMONAL CIRCULANTE DE ADULTOS NO REPRODUCTIVOS

Se cuantificaron 8 esteroides (progesterona, androstenediona, dehidroepiandrosterona, testosterona, 11-cetotestosterona, estrona, 17-β estradiol y cortisol) en plasma de hembras y machos adultos de *Gymnotus omarorum* en período no-reproductivo, representados en la Figura III.11. Las hembras presentaron una media de niveles circulantes de: cortisol 5.2 ± 2.1 ng/ml, androstenediona 0.15 ± 0.03 ng/ml, y testosterona 0.15 ± 0.03 ng/ml. Como ilustra la Figura III.11, los niveles de cortisol fueron un orden de magnitud mayores que las otras hormonas. La comparación de los niveles circulantes de AE y la T mostró que no presentan diferencias significativas (t-test pareado, p = 0.85; t=0.1943 df=10, Fig. III.11A). El análisis estadístico se realizó también expresando las concentraciones en nM, y arrojó el mismo resultado (datos no mostrados). Los machos presentaron una media de niveles circulantes de: cortisol 2.9 ± 0.7 ng/ml, androstenediona 0.03 ± 0.01 ng/ml, testosterona 0.2 ± 0.006 ng/ml, y 11-cetotestosterona 0.01 ± 0.001 ng/ml. Al igual que en hembras, los niveles de cortisol fueron mayores que el resto de las hormonas. La comparación de los niveles circulantes en machos mostró un

efecto significativo del tipo de esteroide (F (1.96, 19.6) = 13.5, p < 0.001; Fig. III.11B). En la comparación post hoc la 11-KT presentó menor concentración que la AE (p = 0.001), y menor que la T (p = 0.03). La T y la AE no mostraron diferencias significativas. El análisis estadístico se también realizó expresando las concentraciones en nM, y arrojó el mismo resultado (datos no mostrados). En el contexto de la caracterización de los niveles hormonales es importante resaltar el dato negativo; ni hembras ni machos presentaron niveles circulantes detectables de progesterona, 17-β estradiol, estrona y dehidroepiandrosterona. Las hembras, a diferencia de los machos, no mostraron niveles detectables de 11-KT. El límite de detección es diferente para cada uno de los esteroides, y se detalló en métodos.

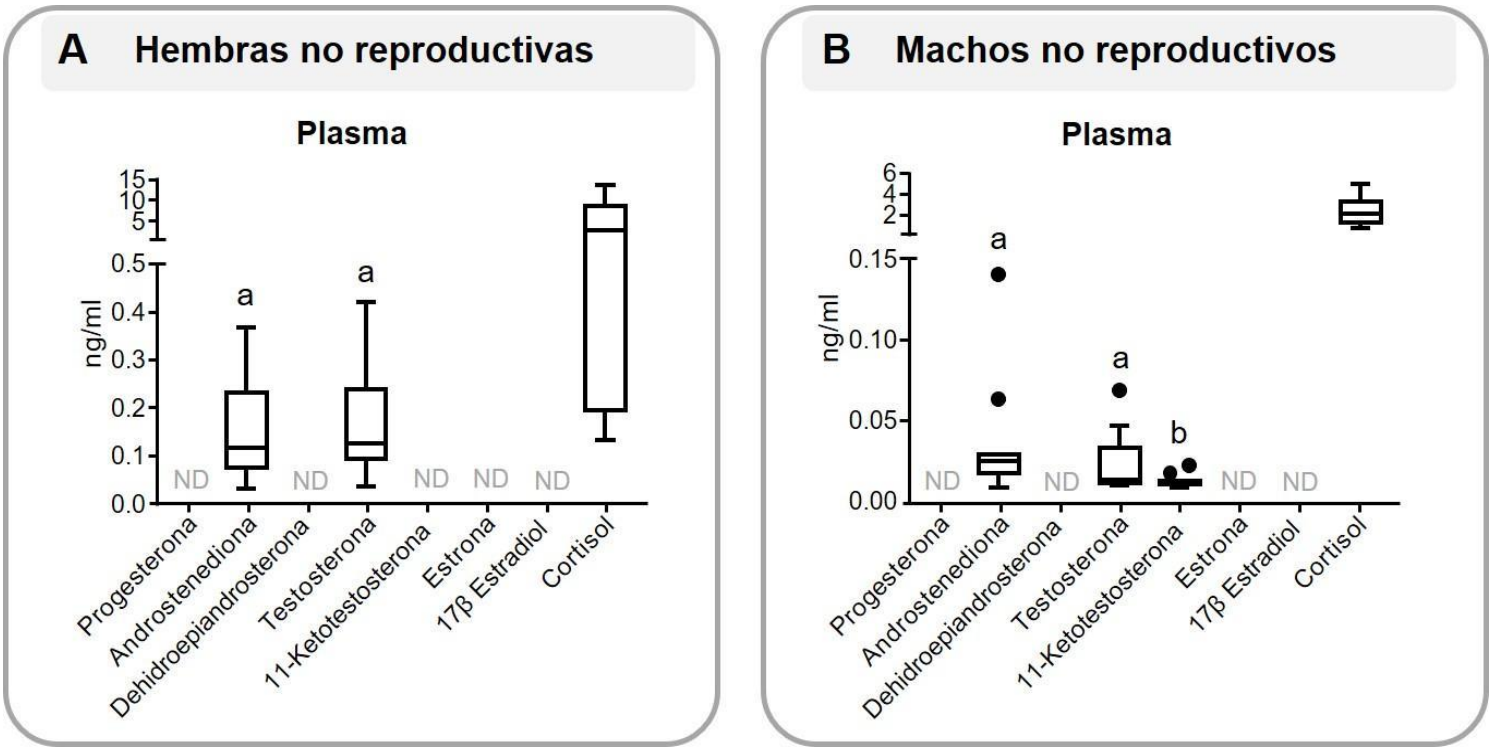

Figura III.11: Perfiles hormonales plasmáticos. A- Hembras no reproductivas. B- Machos no reproductivos.

La comparación de las concentraciones plasmáticas entre sexos evidenció que las hembras presentaron mayores niveles de AE y T que los machos, mientras que el cortisol no mostró diferencias sexuales (Tabla III.3).

La relación entre las concentraciones plasmáticas de los esteroides sexuales AE, T y 11-KT se exploró mediante regresiones lineales. En hembras la correlación entre la concentración plasmática de AE y T sexos fue directamente proporcional, significativa y con un alto ajuste (R^2 =0.93, p < 0.0001, Fig. III.12). En machos la correlación entre la concentración de AE y T plasmática fue directamente proporcional y significativa (R^2 =0.82, p = 0.0001, Fig. III.13A), así como la correlación entre la T y la 11-KT plasmáticas (R^2 =0.83, p < 0.0001, Fig. III.13B).

Tabla III.3: Comparación de concentraciones plasmáticas entre sexos

Hormona	Concentración plasmática (ng/ml)		
	Hembras	Machos	p
Androstenediona	0.15 ± 0.03	0.03 ± 0.01	**0.0001**
Testosterona	0.15 ± 0.03	0.2 ± 0.006	**< 0.0001**
11-Cetotestosterona	ND	0.01 ± 0.001	-
Cortisol	5.2 ± 2.1	2.9 ± 0.7	0.55

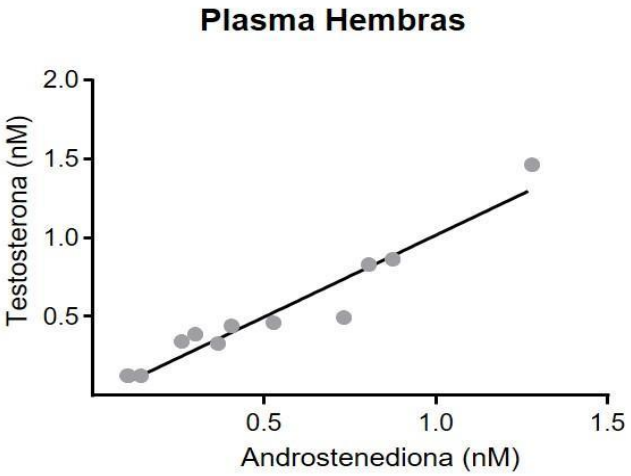

Figura III.12: Correlación lineal entre esteroides plasmáticos en hembras.

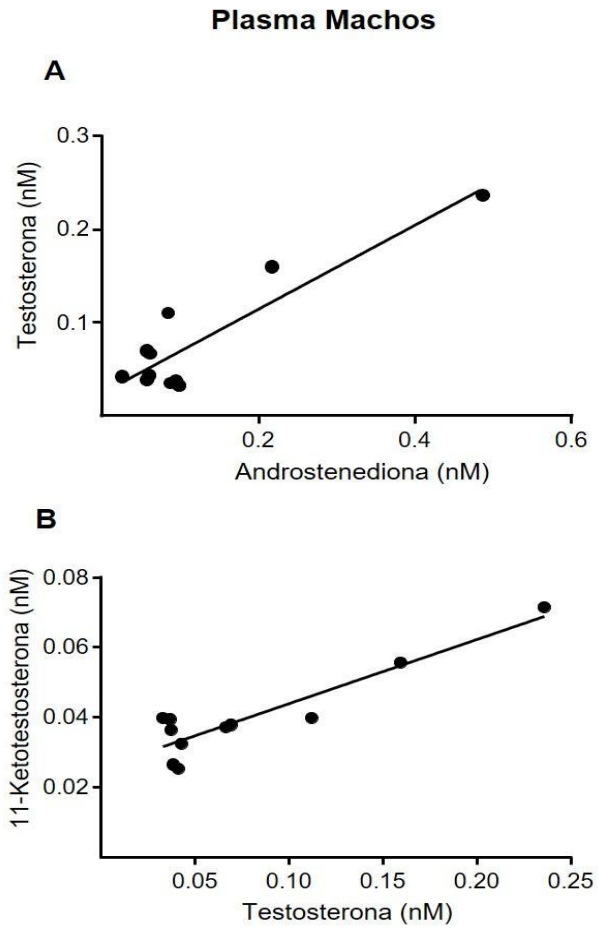

Figura III.13: Correlaciones lineales entre esteroides plasmáticos en machos.

PERFIL HORMONAL CEREBRAL DE ADULTOS NO REPRODUCTIVOS

Se cuantificaron 8 esteroides en cerebro anterior de hembras y machos no reproductivos de *Gymnotus omarorum*. En la Figura III.14 se presentan los perfiles cerebrales de hembras y machos. Las hembras presentaron una media de niveles cerebrales de: cortisol 3.8 ± 1.6 ng/g, androstenediona 0.04 ± 0.007 ng/g, testosterona 0.007 ± 0.001 ng/g y estrona 0.01 ± 0.004 ng/g. El cortisol presentó concentraciones cerebrales de dos órdenes de magnitud mayor al resto de los esteroides. Cuando se comparan los niveles cerebrales de las diferentes hormonas en hembras se encontró un efecto significativo del tipo de esteroide ($F(1.9, 18.9) = 47.65$, $p < 0.0001$). El análisis post hoc mostró que la AE fue significativamente mayor que la T ($p < 0.0001$) y la E ($p < 0.001$), mientras que la T no mostró

diferencias con la E (Fig. III.14A). El análisis estadístico se realizó expresando las concentraciones en nM, y arrojó el mismo resultado (datos no mostrados). Los machos presentaron una media de niveles cerebrales de: cortisol 3.6 ± 0.4 ng/g, androstenediona 0.02 ± 0.006 ng/g, testosterona 0.006 ± 0.002 ng/g, 11-cetotestosterona 0.02 ± 0.002 ng/g y estrona 0.008 ± 0.001 ng/g. Al igual que en hembras, el cortisol presentó concentraciones cerebrales de dos órdenes de magnitud mayor al resto de los esteroides. En la comparación de los niveles cerebrales para las restantes hormonas se encontró un efecto significativo del tipo de esteroide ($F(1.4, 14.4) = 7.23$, $p = 0.01$). El análisis post hoc mostró que la T fue significativamente menor que la 11-KT ($p = 0.003$) y la E fue significativamente menor que la 11-KT ($p = 0.01$, Fig. III.14B). La T no mostró diferencias con la E, y la AE no presentó diferencias significativas con la T, la E ni la 11-KT. El análisis estadístico se realizó expresando las concentraciones en nM, y arrojó el mismo resultado (datos no mostrados). Ni hembras ni machos presentaron niveles cerebrales detectables de progesterona, 17-β estradiol, y dehidroepiandrosterona. Las hembras, a diferencia de los machos y siguiendo el mismo patrón plasmático, no mostraron niveles cerebrales detectables de 11-KT.

La comparación de las concentraciones cerebrales entre hembras y machos mostró que las hembras tienen mayores niveles de AE cerebral que los machos, mientras que los machos presentaron niveles detectables de 11-KT y las hembras no. No se observaron diferencias significativas en la concentración de T, E ni cortisol entre cerebros de hembras y de machos (Tabla III.4).

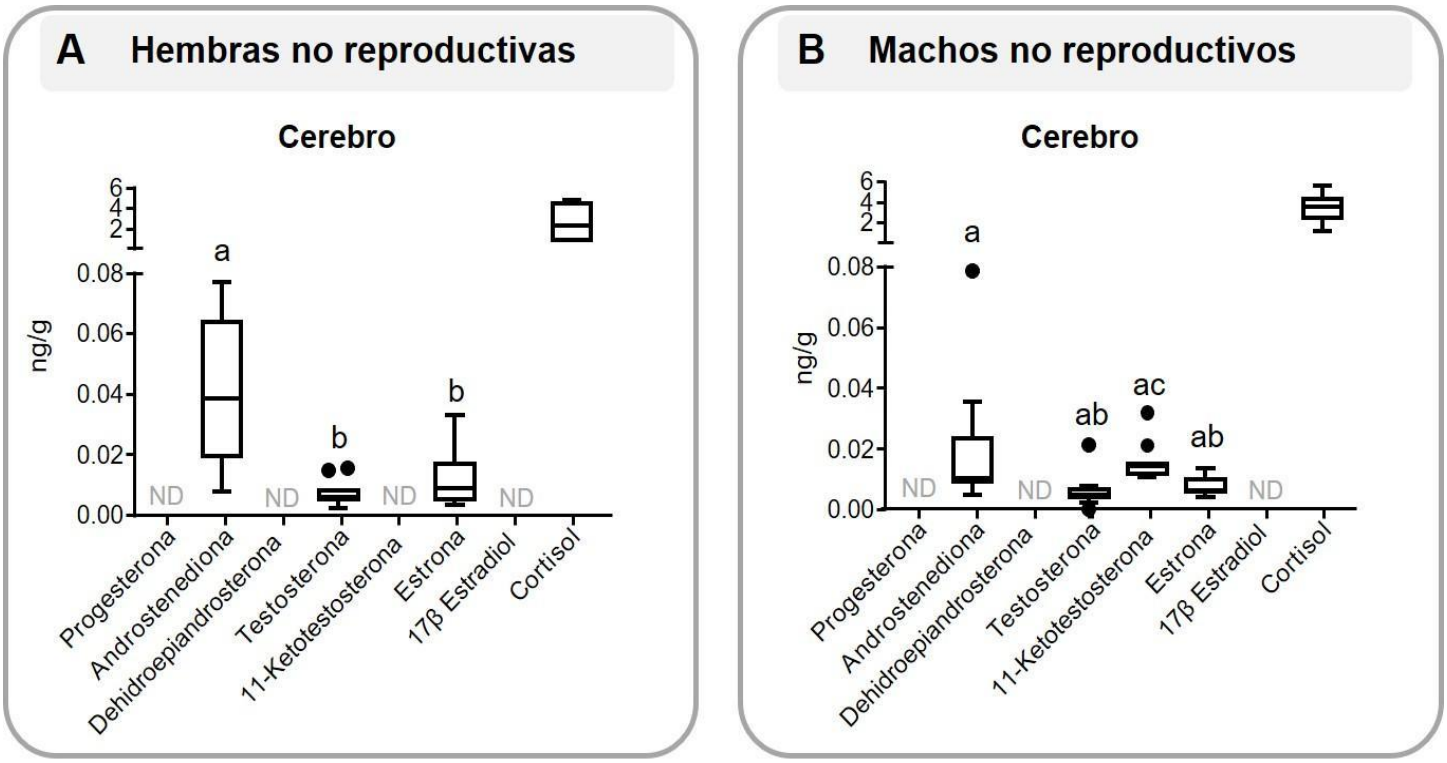

Figura III.14: Perfiles hormonales cerebrales. A- Hembras no reproductivas. B- Machos no reproductivos.

Tabla III.4: Comparación de concentraciones cerebrales entre sexos

Hormona	Concentración cerebral (ng/g)		
	Hembras	Machos	p
Androstenediona	0.04 ± 0.007	0.02 ± 0.006	**0.009**
Testosterona	0.007 ± 0.001	0.006 ± 0.002	0.3
Estrona	0.01 ± 0.004	0.008 ± 0.001	0.3
11-Cetotestosterona	ND	0.02 ± 0.002	-
Cortisol	3.8 ± 1.6	3.6 ± 0.4	0.23

La relación entre los esteroides sexuales cerebrales se exploró mediante correlaciones lineales. En hembras, las concentraciones cerebrales de AE y T mostraron una relación directamente proporcional ($R^2 = 0.48$, $p = 0.02$; Fig. III.15A),

y la correlación entre la concentración de AE y E cerebral fue también positiva y significativa (R^2 = 0.55, p = 0.009; Fig. III.15B).

En machos la relación entre las concentraciones cerebrales de AE y T fue negativa (R^2 = 0.75, p = 0.0006; Fig. III.16A), la relación entre T y 11-KT cerebral no fue significativa (R^2 = 0.01, p = 0.74, Fig. III.16B) y la relación entre la AE y E cerebral fue significativa y directamente proporcional (R^2 = 0.4, p = 0.038; Fig. III.16C).

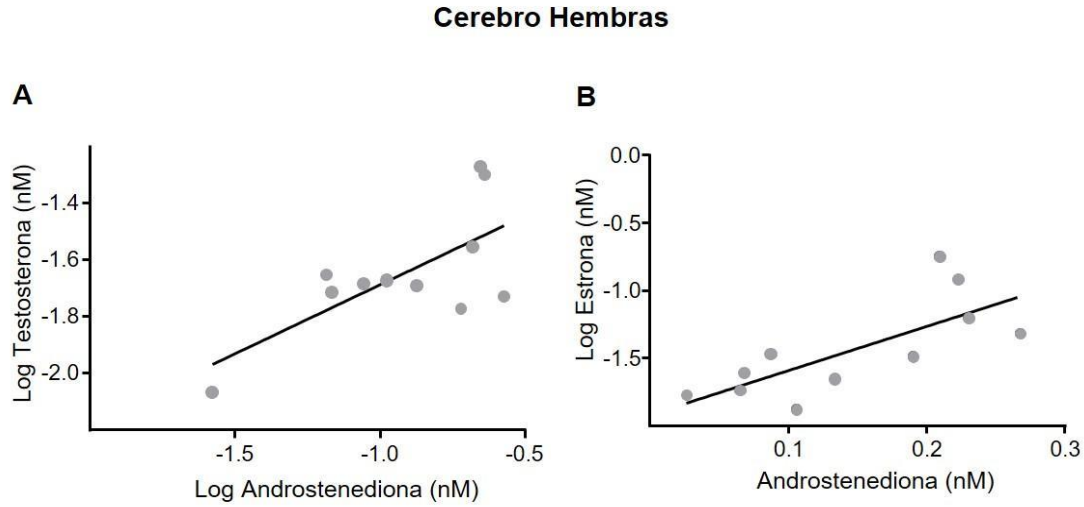

Figura III.15: Correlaciones lineales entre esteroides cerebrales en hembras.

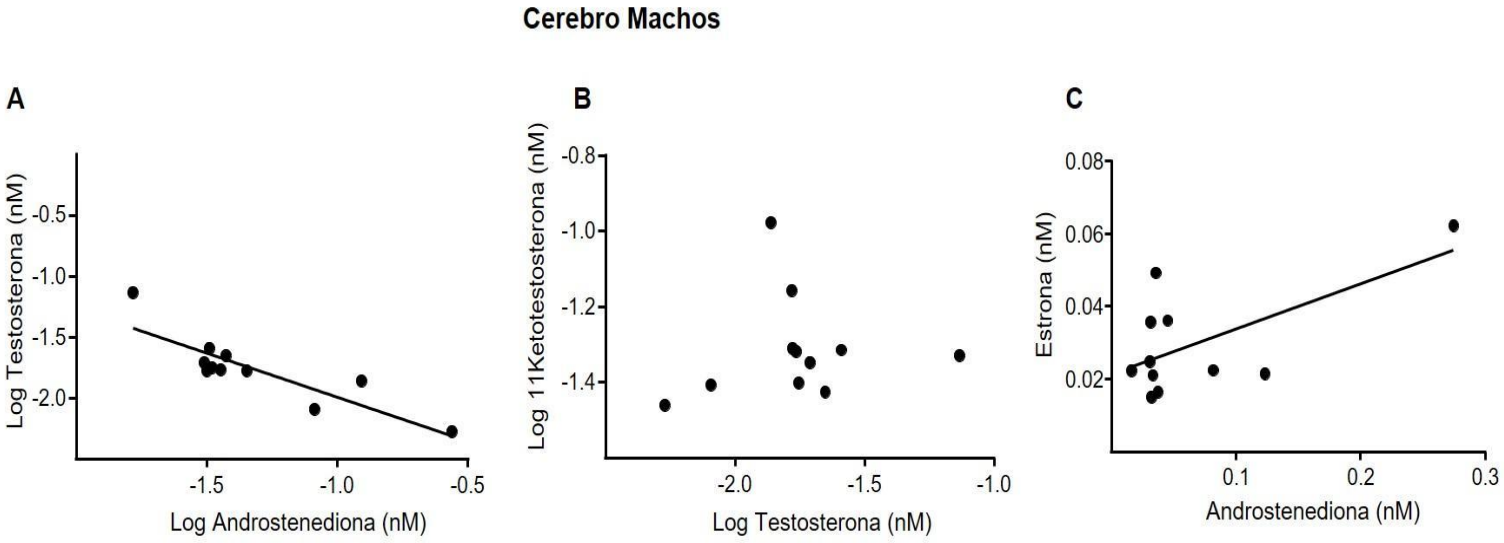

Figura III.16: Correlaciones lineales entre esteroides cerebrales en machos.

COMPARACIÓN ENTRE NIVELES CIRCULANTES Y CEREBRALES

El cortisol fue detectable en todas las muestras de plasma y cerebro, tanto en hembras como en machos. Para este esteroide no se evidenciaron diferencias entre las concentraciones plasmáticas y cerebrales en hembras (test de t pareado, $p = 0.4$, $t = 0.9$; datos no mostrados), pero sí en machos donde las concentraciones cerebrales fueron mayores que las plasmáticas (test de t pareado, $p = 0.04$, $t = 2.3$; datos no mostrados).

La AE presentó niveles mayores circulantes que cerebrales tanto en hembras (test de t pareado, $p = 0.0004$, $t = 5.2$, Fig III.17A), como en machos (test de t pareado, $p = 0.03$, $t = 2.5$, Fig III.17B). Para evaluar la fuente de producción hormonal se calculó la diferencia entre las concentraciones de AE plasmáticas y cerebrales para cada individuo. Este cálculo mostró que, si bien en ambos sexos la diferencia fue negativa para la mayoría de los individuos, es decir que la concentración plasmática es mayor a la cerebral, las hembras presentaron una diferencia entre plasma y cerebro significativamente mayor que los machos ([AEcerebro]-[AEplasma] hembras = -0.11 ± 0.03; [AEcerebro]-[AEplasma] machos = -0.02 ± 0.007; test de t, $p = 0.005$; $t=3.163$ $df=20$; Fig. III.17C).

El análisis pareado de la T mostró que la concentración plasmática fue significativamente mayor que la cerebral, tanto en hembras (test de t pareado, $p < 0.0001$, $t = 21.3$, Fig. III.18A), como en machos (test de t pareado, $p = 0.003$, $t = 3.9$, Fig. III.18B). Cuando se calculó la diferencia entre las concentraciones de T plasmáticas y cerebrales para cada individuo las hembras presentaron una diferencia entre plasma y cerebro significativamente mayor que los machos (mediana [Tcerebro]-[Tplasma] hembras = -0.12; mediana [Tcerebro]-[Tplasma] machos = -0.01; Mann-Whitney U test, $p < 0.0001$, $U = 4.00$; Fig. III.18C).

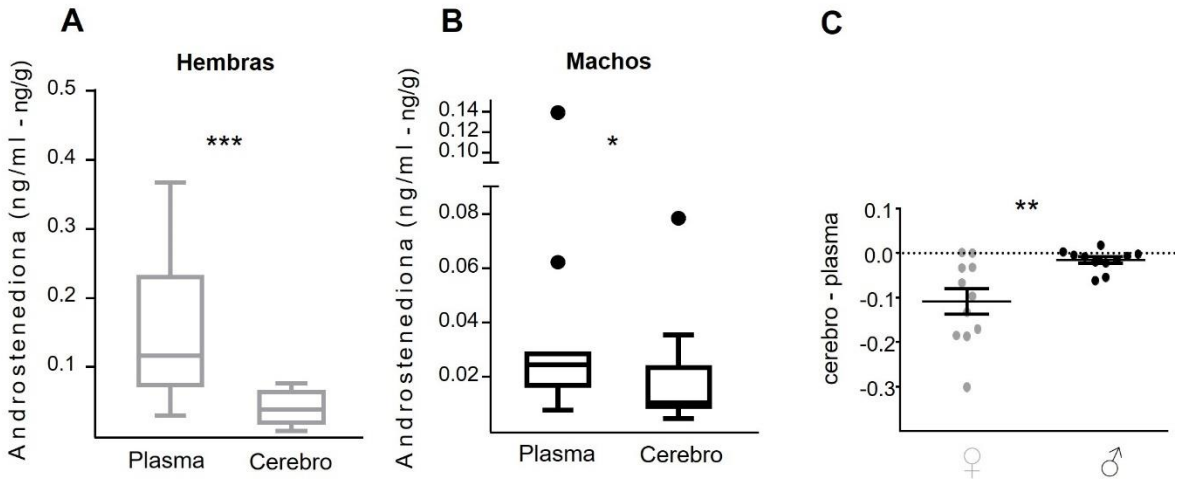

Figura III.17: Comparación de concentraciones plasmáticas y cerebrales de Androstenediona. A- Comparación de niveles plasmáticos y cerebrales en hembras. B- Comparación de niveles plasmáticos y cerebrales en machos. C- Diferencia individual de la concentración cerebral – plasmática. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, test de t.

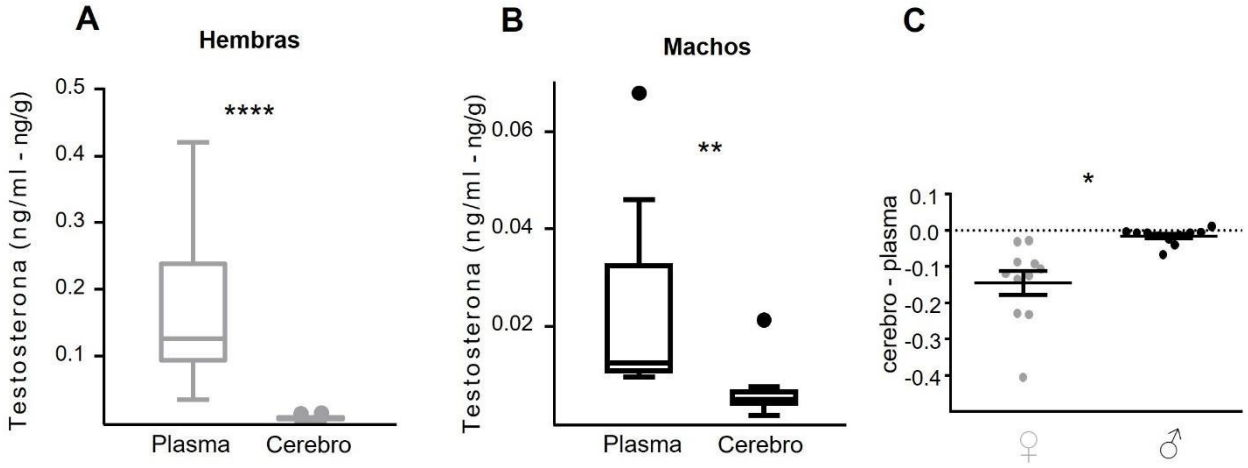

Figura III.18: Comparación de concentraciones plasmáticas y cerebrales de Testosterona. A- Comparación de niveles plasmáticos y cerebrales en hembras. B- Comparación de niveles plasmáticos y cerebrales en machos. C- Diferencia individual de la concentración cerebral – plasmática. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, test de t.

La 11-KT fue detectable solamente en muestras de plasma y cerebro de machos y no presentó diferencias significativas entre plasma y cerebro (Wilcoxon matched-pairs test, $p = 0.21$, Fig. III.19A). Un dato interesante es que cuando se calculó la diferencia entre la concentración cerebral y plasmática, 9 de los 11 machos

presentaron valores por encima de 0 (mayor concentración cerebral), el valor medio fue 0.03 ± 0.03 (Fig. III.19B), y el porcentaje de contribución cerebral fue de 11% ± 14% (Fig. III.19C).

La estrona fue la única hormona de las estudiadas que presentó niveles no detectables en plasma, y niveles detectables en muestras de cerebro tanto de hembras como de machos (Fig. III.20).

En hembras, la relación entre la T plasmática y cerebral fue directamente proporcional y significativa ($R2 = 0.75$, $p < 0.001$; Fig. III.21A), mientras que en machos esta relación no mostró significancia estadística ($R2 = 0.08$, $p = 0.4$; Fig. III.21B).

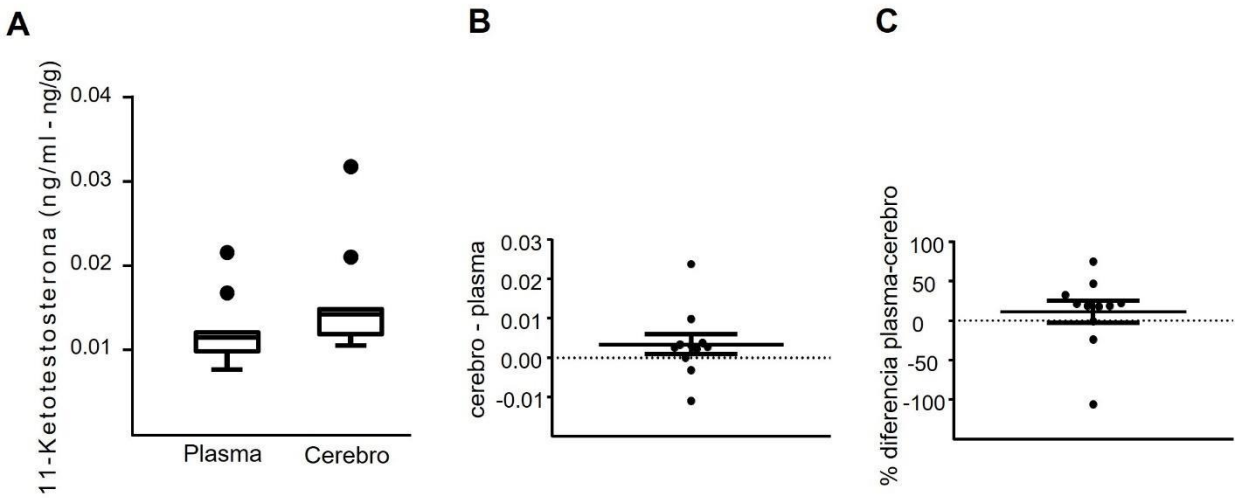

Figura III.19: Comparación de concentraciones plasmáticas y cerebrales de 11-Cetotestosterona. A- Comparación de niveles plasmáticos y cerebrales en machos. B- Diferencia individual de la concentración cerebral – plasmática. C- Porcentaje de contribución cerebral.

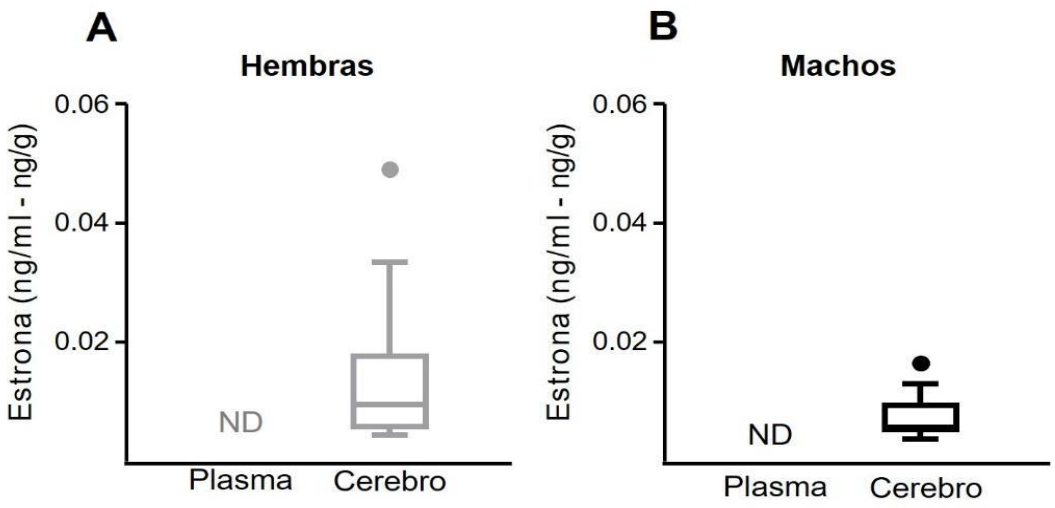

Figura III.20: Comparación de concentraciones plasmáticas y cerebrales de Estrona. A- Hembras. B- Machos.

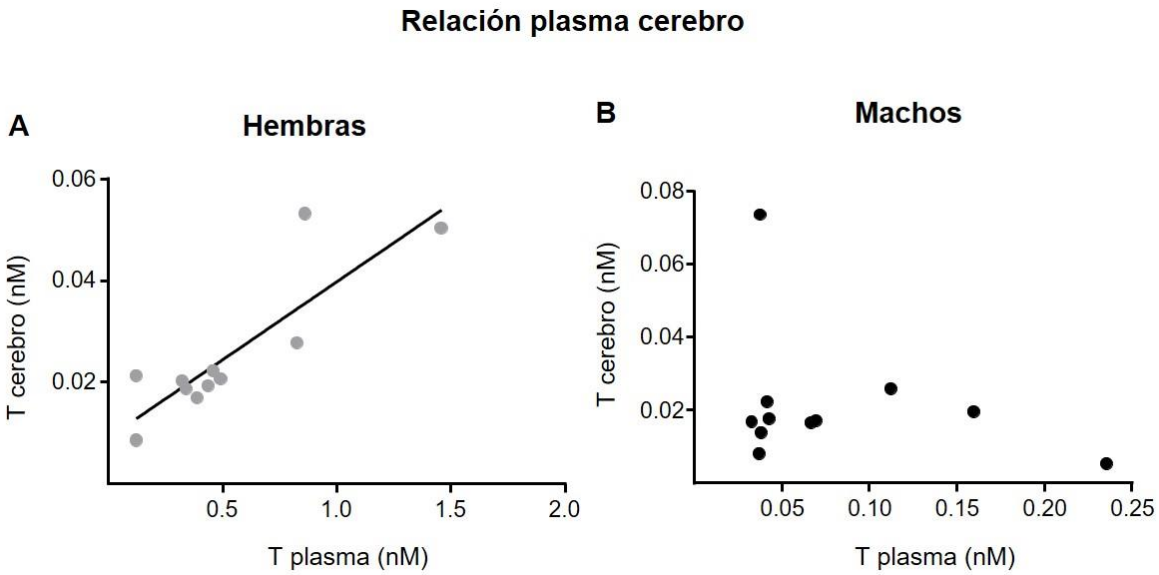

Figura III.21: Relación entre los niveles de testosterona cerebral y plasmática. A. Hembras. B. Machos.

DISCUSIÓN

En este capítulo se cuantificaron 8 esteroides en plasma y cerebro anterior de hembras y machos adultos de *Gymnotus omarorum* colectados durante el período no reproductivo en su hábitat natural. La caracterización del perfil circulante y cerebral, así como el análisis de los datos aportan información de base fundamental para comprender la modulación esteroidea de la agresión territorial no reproductiva. Este es el primer estudio que: 1- realiza una cuantificación de estrógenos y andrógenos cerebrales en animales no reproductivos por LC-MS/MS, y 2- realiza una comparación de niveles plasmáticos y cerebrales no reproductivos en hembras y machos silvestres. El método de extracción desarrollado es efectivo en purificar muestras de cerebro y plasma para remover la interferencia de la matriz para posterior análisis por LC-MS/MS. La cuantificación por LC-MS/MS es altamente específica, precisa, y sensible. En este capítulo se cumplieron los Objetivos específicos III.A-D y los resultados abonaron a la hipótesis de trabajo 2.

DESARROLLO DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ESTEROIDES Y PROTOCOLO DE CUANTIFICACIÓN

Con el método de extracción desarrollado y cuantificación por LC-MS/MS fuimos capaces de cuantificar 8 esteroides en 25 µL de plasma, y 25 mg de tejido cerebral. El método de extracción desarrollado reduce los niveles de ruido de fondo, y por tanto incrementa la sensibilidad de la cuantificación. La extracción remueve la interferencia causada por la matriz, y produce una recuperación consistente de los esteroides. Los estándares internos mostraron poca supresión o potenciación iónica en plasma y en cerebro (Fig. III.10). Los ensayos de % de recuperación comparando muestras con adición de una cantidad conocida de estándares con muestras sin adición, confirmaron que el efecto matriz es mínimo, excepto para la progesterona (Tabla III.2).

El método de LC-MS/MS tiene ventajas respecto de los inmunoensayos (RIA y ELISA): 1- Alta especificidad. Los inmunoensayos pueden presentar reactividad

cruzada con moléculas similares, y, por ende, sobreestiman las concentraciones, especialmente cuando los niveles son bajos (Grebe y Singh 2011; Wudy et al. 2018). Con la técnica de LC-MS/MS se tienen en cuenta múltiples criterios para cuantificar los analitos, que se separan entre sí cromatográfica y espectrográficamente. El tiempo de retención es específico para cada analito (Fig. III.3, Tabla III.1). Los esteroides sin fragmentar se seleccionan por su masa, y luego el proceso de fragmentación iónica se monitoriza paso a paso, antes de fragmentar, y en las dos transiciones. En cada transición se selecciona un ion cuantificador y un calificador (Tabla III.1), y la relación entre ambos se compara con la misma relación en los estándares. 2- La detección por espectrometría de masa habilita la medición de esteroides que no son comunes en inmunoensayos (en este estudio, por ejemplo, la androstenediona y la estrona). 3- La técnica permite cuantificar múltiples esteroides en una misma muestra. Esto evita tener que subdividir la muestra proveniente de un mismo individuo y hace posible la medición de un perfil hormonal a nivel individual. 4- La sensibilidad es similar o aún mejor que los inmunoensayos. En este estudio los límites de detección fueron del rango de 0.2 a 0.8 pg para la mayoría de los esteroides. En caso de querer aumentar la sensibilidad es posible poner a punto protocolos de derivatización.

NIVELES CIRCULANTES

De los 8 esteroides cuantificados, las hembras no reproductivas presentaron niveles detectables circulantes de androstenediona, testosterona y cortisol, y en machos al perfil circulante se sumó la 11-cetotestosterona (Fig. III.11). En este estudio, los niveles plasmáticos de estrona, 17-β estradiol, dehidroepiandrosterona, y progesterona no fueron detectables. Para la Pg y el E2 el límite de detección fue 0.03 ng/ml, y cabe la posibilidad de que los niveles circulantes de adultos no reproductivos estén por debajo de ese valor. La progesterona no tiene un rol claro en muchos teleósteos, y sus concentraciones plasmáticas usualmente están por debajo del límite de detección. Si bien en este estudio hay una ausencia de progesterona, esto no significa necesariamente una ausencia de progestágenos, ya

que los peces teleósteos tienen progestágenos únicos (Kime, 1993), los cuales no entraron dentro del panel de esteroides a cuantificar. Por otro lado, el E2 es una hormona que ha sido cuantificada en hembras del período reproductivo de esta misma especie (Zubizarreta et al. 2020a), y en valores relativamente bajos (0.3 ± 0.1 ng/ml). Esto nos sugiere que los niveles no detectables de E2 en el período no reproductivo reflejan realmente una disminución de esta hormona por debajo del límite de detección.

En este estudio, la cuantificación de DHEA era de particular interés, debido a su documentado rol en el mantenimiento de la agresión no reproductiva en aves y mamíferos (Soma et al. 2008; 2015). Existen reportes de que hay especies de teleósteos que tienen niveles circulantes de DHEA, como por ejemplo *Oncorhynchus mykiss* (Rege et al. 2019), sin embargo, los individuos adultos no reproductivos de *G. omarorum* no presentaron niveles circulantes detectables de DHEA. Es posible que este resultado negativo sea debido a que este esteroide presenta una baja capacidad de ionización, lo que provoca que su límite de detección sea un orden de magnitud mayor en comparación con las demás hormonas (Fig. III.3). Un artículo reciente de cuantificación de esteroides por LC-MS/MS en aves (*Song sparrow*) mostró que las concentraciones de DHEA plasmáticas son indetectables (menores a 0.4 ng/ml) a menos que se realice una derivatización de la muestra que aumenta la sensibilidad del método (Jalabert et al. 2020), resultado que contrastó con las concentraciones de DHEA realizadas previamente por RIA en la misma especie (~0.8 a 1 ng/ml; Newman et al. 2013; Newman et al. 2008; Soma y Wingfield 2001). Los inesperadamente bajos niveles de DHEA descriptos por Jalabert et al. sirven para ilustrar las diferencias que pueden surgir en la cuantificación con LC-MS/MS e inmunoensayos. En general los inmunoensayos sobreestiman las concentraciones de esteroides, y la causa predominante es la detección cruzada de los anticuerpos con moléculas similares (Wudy et al. 2018). La alta especificidad de la detección por espectrometría de masa, sumada a la separación cromatográfica de la muestra es una gran ventaja en este sentido.

Como era esperado, los niveles circulantes de cortisol fueron un orden de magnitud mayores que los otros esteroides. El cortisol circulante no presentó diferencias sexuales (Tabla III.3), lo que es esperado en período no reproductivo. Las diferencias sexuales podrían emerger durante el período reproductivo como ha sido reportado en otras especies (revisado en Milla et al. 2009). El hecho que no se evidencien diferencias sexuales en los niveles de cortisol contrasta de manera interesante con los otros esteroides circulantes analizados, que presentaron diferencias entre hembras y machos, a pesar de tratarse de individuos no reproductivos. La 11-KT es un andrógeno no aromatizable, uno de los principales andrógenos bioactivos de teleósteos (Borg 1994), y mostró la diferencia sexual plasmática esperada (Tabla III.3). Los niveles de 11-KT de machos no reproductivos fueron similares a los ya reportados en esta misma especie por el método de ELISA (Jalabert et al. 2015), y como es coherente, más bajos que los reportados para machos reproductivos (0.4 ± 0.1 ng/ml; Zubizarreta et al. 2020a). Asimismo, las concentraciones plasmáticas de 11-KT están dentro del rango de valores a las de otras especies de peces donde se cuantificó fuera del período reproductivo (Vitousek et al. 2018). Los otros dos andrógenos circulantes detectados tanto en hembras como en machos fueron la T y la AE, que no presentaron diferencias entre sí en sus concentraciones plasmáticas (Fig. III.11). Existen numerosos reportes de niveles plasmáticos de T en teleósteos no reproductivos, cuantificados por RIA y ELISA. Un resultado llamativo fue que en *G. omarorum* tanto la T como la AE mostraron mayor concentración plasmática en hembras que en machos (Tabla III.3), y este resultado es coherente con el dato que en muchos teleósteos los niveles de T circulantes son mayores en hembras que en machos (Revisado utilizando HormoneBase; Vitousek et al. 2018).

Si bien las hormonas circulantes pueden tener diferentes fuentes (gonadal, muscular, interrenal), la diferencia sexual entre los niveles de andrógenos circulantes observados sugiere que ovarios y testículos son las fuentes involucradas. Asimismo, la alta correlación entre hormonas apunta a que se originan en un mismo órgano. La AE y T circulantes correlacionan positivamente con un R2

excelente tanto en hembras (Fig. III.12) como en machos (Fig. III.13A). En machos, además la T y 11-KT circulantes correlacionan positivamente (Fig. III.13B).

NIVELES CEREBRALES

Este es el primer reporte de perfiles cerebrales esteroideos en peces teleósteos utilizando la detección por espectrometría de masa. Es también el primer estudio en caracterizar el perfil cerebral esteroideo de manera individual en hembras y machos de teleósteos. De hecho, la cuantificación de esteroides en cerebro por ELISA se hizo solamente en el pez hermafrodita bidireccional *Lythrypnus dalli*. En estos trabajos se analizaron los cambios de 11-KT, T y E2 que acompañan la reversión sexual (Lorenzi et al. 2012) y los niveles de 11-KT asociados al despliegue de cuidado parental y agresión (Pradhan et al. 2014; Pradhan et al. 2014). Estos estudios cargan con la limitación propia del método, que no permite la cuantificación más de una hormona en el mismo ensayo. También está presente la restricción del tamaño de muestra, que limita el número de hormonas que se pueden cuantificar en un mismo individuo. La presencia de enzimas esteroidogénicas para producir esteroides *de novo* han sido identificadas en cerebro de muchas especies de teleósteos (revisado en Diotel et al. 2011). Hay también evidencia de que homogenatos de cerebro de teleósteos pueden producir T, E2 y 11-KT (Andersson et al. 1988; Diotel et al. 2011; Pasmanik y Callard 1985; Schulz y Blüm 1991). Sin embargo, tanto los datos de expresión de enzimas como los de producción de esteroides en homogenatos pueden no corresponder con los niveles basales de producción cerebral porque las enzimas pueden no estar activas, la producción depende de las concentraciones de sustrato disponible, y en los homogenatos tanto sustratos como co-activadores están en concentraciones saturadas.

La técnica de extracción desarrollada en este estudio sumada a la cuantificación por LC-MS/MS permitió medir 8 hormonas en cerebro anterior de cada individuo de una muestra de adultos no reproductivos de *G. omarorum*. De las hormonas cuantificadas, 5 mostraron niveles detectables en las muestras, lo que constituye un resultado muy exitoso considerando que se trata de individuos fuera del período

reproductivo, y, asimismo, una caracterización sin precedentes en cerebro de peces. La progesterona, dehidroepiandrosterona y 17-β estradiol no mostraron niveles detectables en cerebro, siguiendo el mismo patrón que el plasma (Fig. III.14). La androstenediona, testosterona, y cortisol fueron detectables en cerebro de hembras y machos, al igual que en el plasma. Al perfil cerebral de machos, se sumó la 11-cetotestosterona, de la misma manera que en el plasma en este sexo. El único esteroide que fue detectable únicamente en cerebro fue la estrona (Fig. III.14).

Los niveles cerebrales de cortisol no fueron diferentes entre sexos, siguiendo el mismo patrón que en plasma. El cortisol parece estar en equilibrio entre la circulación y el cerebro, con altos niveles tanto circulantes como cerebrales. El andrógeno AE presentó mayores niveles cerebrales en hembras que en machos (Tabla III.4), diferencia que condice con el dimorfismo sexual en las concentraciones plasmáticas. La concentración cerebral de AE fue menos que la plasmática en ambos sexos (Fig. III.17A, B). La T cerebral no presentó diferencias sexuales (Tabla III.4), a pesar de mostrar mayores niveles plasmáticos en hembras que en machos (Tabla III.3). Al igual que la AE, la T presentó mayor concentración plasmática que cerebral en ambos sexos (Fig. III.18A, B). Como no existen reportes de andrógenos cerebrales por LC-MS/MS en animales fuera del período reproductivo no es posible realizar comparaciones que lleven a generalizaciones. Existen dos reportes de niveles basales de esteroides en áreas acotadas del cerebro en machos no reproductivos de *Melospiza Melodia*. En uno de ellos, los niveles de T (medidos por RIA) fueron entre 2 y 3 ng/g en condiciones basales en la mayoría de las áreas estudiadas (Heimovics et al. 2016) mientras que, en el otro estudio, los niveles basales de T (medidos por LC-MS/MS) fueron indetectables en todas las áreas de los machos no reproductivos (Jalabert et al. 2020). En el único pez en el que se cuantificaron los niveles de T y 11-KT cerebrales por ELISA, los niveles de T cerebrales basales fueron 200 ng/g tanto en machos como en hembras, y los de 11-KT alrededor de 2 ng/g (Lorenzi et al. 2012). Varios factores podrían explicar la gran diferencia observada entre la concentración de T en *L. dalli* y en *G. omarorum*. Primero, una diferencia debida a la técnica de cuantificación (ELISA vs MS),

segundo podría deberse a posibles diferencias interespecíficas, o al hecho de que los individuos de *L. dalli* estaban dentro del período reproductivo y poseen una fisiología sexual particular. La estrona fue el único esteroide que presentó solamente niveles cerebrales, y no mostró diferencias entre hembras y machos (Tabla III.4). Es interesante que cerebros de individuos no reproductivos de *G. omarorum* hayan presentado niveles basales de E, ya que en la única especie en la que se cuantificó estrona en período no reproductivo (*M. Melodia*) las áreas cerebrales analizadas presentan únicamente niveles detectables de progesterona y corticosterona (Jalabert et al. 2020). Por el contrario, los machos reproductivos de *M. Melodía* sí muestran niveles detectables de E cerebral. Otro estudio en el que se detectaron concentraciones cerebrales de E fue en machos y hembras de *Coturnix japónica*, donde no se evidencian diferencias sexuales en los niveles telencefálicos de animales reproductivos mediante la técnica de GC-MS (Liere et al. 2019).

NEUROSÍNTESIS DE ESTEROIDES

La neurosíntesis de esteroides es un proceso local donde los neuroesteroides se producen muy cerca de sus blancos (Schlinger 2015; Schlinger et al. 2014). Estudios de microdiálisis en *Taeniopygia guttata* han mostrado que los niveles de 17-β Estradiol fluctúan rápidamente (en menos de 30 min) en sectores espacialmente restringidos en respuesta al canto de un coespecimen (Remage-Healey et al. 2008, 2010). Se ha demostrado (mediante microdiálisis y cuantificación en punches) que núcleos localizados a pocas micras de distancia pueden presentar concentraciones esteroideas locales muy diferentes (de Bournonville et al. 2020; Liere et al. 2019; Tobiansky et al. 2017). En este estudio llama la atención que las concentraciones en cerebro anterior de *G. omarorum* fueron relativamente menores en comparación con otros reportes de esteroides cerebrales medidos por espectrometría de masa. Por ejemplo, en el caso de la T, en *G. omarorum* encontramos una media de 0.01 ng/g aproximadamente en cerebro anterior de hembras y machos no reproductivos, mientras que en el área preóptica de *M. Melodía* los machos reproductivos presentan 0.5 ng/g (Jalabert et al. 2020), el área

preóptica e hipotálamo anterior de *C. japónica* los machos reproductivos presentan 1 ng/g, y las hembras 0.1 ng/g (Liere et al. 2019), y el área preóptica e hipotálamo de machos reproductivos de *R. norvergicus* presentan 2.5 ng/g (Tobiansky et al. 2017). Las diferencias observadas podrían atribuirse tanto a divergencias evolutivas, como a que los estudios anteriores se realizaron en animales reproductivos. Evidencia a favor del factor reproductivo es: a- machos de *M. Melodia* presentan niveles indetectables de andrógenos y estrógenos cerebrales fuera del período reproductivo, que en temporada reproductiva se tornan detectables; y b- la gonadectomía reduce considerablemente los niveles de T en el área preóptica, en *R. norvergicus* de 2.5 ng/g a 0.1 ng/g (Tobiansky et al. 2017) y en *C. japónica* de 1 ng/g a 0.2 ng/g (Liere et al. 2019). La característica local de la producción de esteroides cerebrales podría también ser responsable de las diferencias entre las concentraciones previamente reportadas y las de *G. omarorum*. La cuantificación en áreas cerebrales acotadas podría arrojar concentraciones mayores que la cuantificación en una sección que contiene múltiples áreas junto con otros sectores no esteroidogénicos. En apoyo a esta hipótesis, los niveles telencefálicos de E en *C. japónica* son 0.03 ng/g (similares a los de este estudio), mientras que la concentración en el área preóptica es 0.2 ng/g (Liere et al. 2019). La extracción de esteroides de secciones mayores de cerebro, a pesar de tener la desventaja de diluir la concentración y poseer menor resolución espacial, tiene la ventaja de ser capaz de detectar esteroides que están en bajas concentraciones (fuera del período reproductivo).

En este estudio la AE y la T presentaron mayor concentración plasmática que cerebral (Fig. III.17, Fig. III.18). Para comprender si hay síntesis cerebral de AE y T a la vez que periférica se deben realizar cuantificaciones en sitios cerebrales precisos, en comparación con los niveles concomitantes periféricos. En hembras de *T. guttata* se ha comprobado por microdiálisis *in vivo* que existe síntesis cerebral de T y E2 en respuesta a un playback, aún en presencia de niveles circulantes elevados de E2 y T (de Bournonville et al. 2020). Las enzimas que producen AE a partir de DHEA y 17α-hidroxiprogesterona, así como T a partir de AE, y la enzima que realiza la conversión bidireccional de AE a T están presentes en el cerebro de *Gymnotus*

(Eastman et al. 2020), los resultados de la cuantificación cerebral y plasmática de AE y T no permiten concluir si hay o no síntesis cerebral de estas hormonas.
A diferencia de la T y AE, para la E y la 11-KT es posible proponer la existencia de neurosíntesis. Es importante aclarar que las hipótesis planteadas a continuación solamente tienen en cuenta los esteroides cuantificados, e ignoran deliberadamente la posible presencia de otras estirpes esteroideas (esteroides activos, precursores y metabolitos) tanto en plasma como en cerebro. La ampliación del número de esteroides a ser cuantificados, así como métodos para aumentar la sensibilidad de determinadas estirpes es una posibilidad a futuro.

ESTRONA

Los resultados de cuantificación plasmática y cerebral apoyan la hipótesis de que existe neurosíntesis de estrógenos en condiciones basales no reproductivas tanto en hembras como en machos. En particular, la estrona presentó concentraciones cerebrales superiores al límite de detección en ambos sexos, mientras que sus niveles plasmáticos fueron no detectables (Fig. III.20). La neurosíntesis de estrógenos es apoyada por el dato que el cerebro de *Gymnotus omarorum* en período no reproductivo presenta transcriptos de aromatasa (Eastman et al. 2020). El precursor directo de la E es la AE, que, si bien presentó niveles cerebrales detectables, su concentración plasmática es mayor que la cerebral en ambos sexos (Fig. III.17), por lo que es parsimonioso pensar que difunde desde la periferia y en el cerebro se aromatiza. Los resultados de correlaciones entre precursor y producto en cerebro aportan información sobre el origen de la producción de E. La AE cerebral correlacionó positivamente con la E cerebral (Fig. III.15, Fig. III.16), apoyando la hipótesis de neurosíntesis de E a partir de AE presente en concentraciones cerebrales basales. La correlación positiva entre la AE circulante y la E cerebral puede reflejar una entrada de AE desde la periferia como precursora de E. No se puede descartar, sin embargo, que haya producción de AE tanto periférica como cerebral.

11-CETOTESTOSTERONA

Los resultados de cuantificación plasmática y cerebral de 11-KT sugieren que podría existir neurosíntesis de este esteroide no aromatizable en condiciones basales no reproductivas en machos. La 11-KT presentó concentraciones cerebrales superiores al límite de detección en todos los individuos analizados (Fig. III.14). La neurosíntesis de 11-KT es apoyada por el dato que el cerebro de *Gymnotus omarorum* en período no reproductivo presenta 11β-hydroxylasa (P45011β) y 11β-hidroxiesteroide dehydrogenasa (11β-HSD) (Eastman et al. 2020). En machos, la 11-KT presentó niveles cerebrales mayores que dos de los otros esteroides cuantificados, la E y la T (Fig. III.14). El análisis estadístico no fue significativo en mostrar que la 11-KT está más concentrada en cerebro que en plasma (Fig. III.19). Es importante tener en cuenta que para la comparación circulante/cerebral se utilizaron las concentraciones plasmáticas, que representan una sobreestimación de las concentraciones circulantes en sangre, presentando en general el doble de concentración que la sangre (Taves et al. 2010; Jalabert et al. 2020), por lo que en este estudio las comparaciones están sesgadas hacia lo circulante. En la mayoría de los machos analizados la concentración de 11-KT fue mayor en cerebro que en plasma (Fig. III.19B), y el % de contribución cerebral de 11-KT fue de un 10% más que lo plasmático (Fig. III.19C). Por último, la 11-KT cerebral presentó mayor concentración que la T cerebral, su precursor (Fig. III.14B) y la correlación entre la 11-KT plasmática y cerebral no fue significativa (dato no mostrado), lo que puede ser una evidencia indirecta de producción cerebral. Una explicación alternativa puede ser que la 11-KT sea secuestrada de la circulación y acumulada en el cerebro por globulinas de unión a esteroides (SBG) que tal vez estén en mayores concentraciones en cerebro que en plasma. Las SBG pueden transportar esteroides de la circulación a las células, y se ha reportado que pueden ser internalizadas (Caldwell et al. 2007). También la diferencia en niveles cerebrales y plasmáticos pueden deberse a actividad enzimática diferencial (tanto de síntesis como de degradación).

Cuando se analizan las relaciones entre esteroides cerebrales, es interesante el resultado que en hembras todas las correlaciones son positivas (Fig. III.15), mientras que en machos la relación entre AE y T es inversamente proporcional (Fig. III.16A), y la correlación entre AE y E es positiva (Fig. III.16B). Los siguientes puntos enumeran los resultados coherentes con este dimorfismo y proponen explicaciones.
En hembras la correlación entre AE y T fue positiva ya que: a) la síntesis cerebral de E probablemente no sea un factor que afecte considerablemente los niveles de T, al ser el único producto neurosintetizado en hembras; b) los niveles de AE cerebrales de hembras son mayores que los de machos, por lo que no sería necesario consumir T cerebral para producir AE; c) los niveles plasmáticos de AE y T en hembras son mayores que los de machos, por lo que estas hormonas difundirían sin problema al cerebro. En machos la correlación entre AE y T fue negativa ya que: a) a diferencia de las hembras, existe producción de dos hormonas cerebrales (11-KT y E) y la producción de 11-KT cerebral, que consume T agregaría una exigencia sobre los niveles de T cerebrales; b) los niveles cerebrales de 11-KT son mayores que los de T, y de esta manera la concentración de T en machos se vería afectada por la producción de 11-KT por ser un sustrato limitado.
Un dato llamativo es que la concentración cerebral de E fue similar en hembras y machos (Tabla III.4), a pesar de que las concentraciones de AE cerebrales y plasmáticas fueron sexualmente dimórficas. La AE cerebral y E correlacionaron positivamente en hembras y machos (Fig. III15B; Fig. III.16C), lo que sugiere que la AE no está en concentraciones limitantes. Este conjunto de datos plantea la hipótesis de que la síntesis de E está limitada por la cantidad de aromatasa activa en condiciones basales, y la predicción de que la actividad de la enzima será similar en machos y hembras (al menos en condiciones basales).

Comentario final

Los resultados de este capítulo abonan a la hipótesis de trabajo 2 que postula: *En el período no reproductivo la agresión territorial es mantenida por neurosíntesis de estrógenos en ambos sexos.* Se cuantificó por primera vez en hembras y machos no reproductivos de un pez teleósteo un perfil esteroideo plasmático y cerebral. Los individuos no reproductivos presentan niveles circulantes detectables de andrógenos y cortisol, y niveles cerebrales de estas hormonas sumados a la detección de estrona. Los resultados demuestran la existencia de neurosíntesis de estrógenos, tanto en hembras como en machos no reproductivos. Los resultados de este estudio resaltan la importancia de caracterizar los niveles hormonales circulantes y cerebrales, y son el punto de partida para la generación de hipótesis sobre el mantenimiento de la agresión no reproductiva y la evaluación de estrategias comunes entre especies.

CAPÍTULO IV.
DISCUSIÓN GENERAL

Gymnotus omarorum es el único modelo en teleósteos desarrollado para explorar de manera multidisciplinaria la agresión no reproductiva, su regulación neuroendócrina y los mecanismos proximales que la mantienen. Una de las contribuciones de esta tesis fue reunir el enfoque ecológico con el análisis individual neuroendocrinológico para aportar un marco multi-dimensional realista para el estudio de los mecanismos que subyacen a la defensa territorial persistente en ausencia de condición reproductiva. La principal consecuencia de integrar estas miradas es la posibilidad de identificar la secuencia de eventos que dan como resultado la adquisición de territorios y la distribución espacial en la naturaleza, así como los mecanismos que la subyacen (Figura IV. 1). De esta manera se termina de consolidar un modelo para el estudio de la territorialidad no reproductiva, en el que es posible postular hipótesis a partir de evidencia conductual, plantear predicciones que pueden ser abordadas en el ambiente natural y también refrendarlas a través del tránsito inverso hacia el laboratorio.

Con respecto al enfoque ecológico, esta tesis confirmó aspectos relevantes de la conducta territorial de *G. omarorum*. Por un lado, se partió de experimentos de laboratorio que demuestran que en *G. omarorum* la conducta agonística media la adquisición y el mantenimiento de los territorios en el período no reproductivo (Perrone et al. 2019). En la población estudiada en su ambiente natural se demostró que durante el período no reproductivo los individuos presentan una distribución espacial compatible con territorialidad (Cap. I, Zubizarreta et al. 2020a). La definición de territorialidad más completa es la que reúne dos atributos necesarios: el conductual y el ecológico (revisado en Maher y Lott 1995). El componente conductual abarca los mecanismos comportamentales involucrados en los sistemas de espaciamiento, y describe las interacciones directas entre individuos. El componente ecológico se centra en la distribución de los individuos en el espacio, y en cómo es la distribución espacial de recursos, sin analizar las interacciones

directas entre individuos. Con los resultados de esta tesis sumados a los reportes previos, *G. omarorum* se convierte en uno de los pocos modelos de territorialidad en los que hay evidencias para sostener ambas definiciones. La caracterización inicial de la conducta agonística no reproductiva de esta especie mostró que el tamaño corporal es el principal predictor de la dominancia en las contiendas, y el sexo no es relevante en la determinación de la dominancia (Batista et al. 2012). La exploración más detallada de la agresión no reproductiva confirmó que la dinámica de las contiendas, los niveles de agresión y la sumisión no presentan dimorfismo sexual (Cap. II, Quintana et al. 2016). Las características de la agresión territorial estudiada en el laboratorio se vieron reflejadas en los resultados obtenidos en el ambiente natural, donde se constató una distribución compatible con territorialidad, con territorios no reproductivos sexualmente monomórficos cuyo tamaño depende del tamaño corporal. Como resultado se refrendó la hipótesis de trabajo I: *En poblaciones naturales la territorialidad en Gymnotus omarorum es expresada todo el año. En período no reproductivo el tamaño territorial es sexualmente monomórfico y depende del tamaño corporal.*

Con respecto al enfoque neuroendocrinológico, los resultados de manipulaciones farmacológicas en hembras demuestran que para el despliegue de agresión no reproductiva en *G. omarorum* es necesaria la aromatización de andrógenos a estrógenos (Cap. II). Cuando se administra un inhibidor de la aromatasa, la probabilidad de iniciar una contienda disminuye, y cuando existe conducta agonística presenta menores niveles de agresión y menor tasa de resolución del conflicto (Cap. II, Zubizarreta et al. 2020b). En concordancia con estos resultados, experimentos previos en machos de *G. omarorum* mostraron que la agresión no reproductiva se distorsiona con la inhibición aguda de la aromatasa (Jalabert et al. 2015). La neurosíntesis de 17β-estradiol se realiza a partir de la aromatización local de testosterona en muchas regiones cerebrales y se ha comprobado que influye sobre diversas funciones y conductas (Ball y Balthazart 2010; Balthazart et al. 2009; Garcia-Segura 2008; Yoder y Vicario 2012). En las especies en las que se ha estudiado, se postula que la agresión no reproductiva en machos es mantenida por

neurosíntesis de estrógenos (revisado en Demas et al. 2007). En hembras no reproductivas el vínculo entre estrógenos cerebrales y agresión no reproductiva no había sido explorado directamente. En *G. omarorum* la presencia de andrógenos aromatizables circulantes y cerebrales, así como la ausencia de estrógenos circulantes (Cap. III) sugiere fuertemente que el efecto de la inhibición de aromatasa sobre la conducta agonística ocurre a nivel cerebral. El postulado de que la agresión no reproductiva es mantenida por síntesis cerebral de estrógenos es también apoyado por el hecho de que los individuos no reproductivos mostraron neurosíntesis inequívoca de estrona (Cap. III), y expresión de aromatasa cerebral en grandes cantidades (Eastman et al. 2020). En suma, los resultados de esta tesis sumados a la evidencia mencionada refrendan la hipótesis de trabajo II: *En el período no reproductivo la agresión territorial es mantenida por neurosíntesis de estrógenos en ambos sexos.*

LA AGRESIÓN TERRITORIAL ES SEXUALMENTE MONOMÓRFICA PESE AL PERFIL ESTEROIDEO DIMÓRFICO

La significancia funcional de las diferencias sexuales en el cerebro actualmente no está del todo dilucidada. La idea predominante es que las diferencias sexuales que existen en el cerebro provocan diferencias en el comportamiento. Otra posibilidad es que las diferencias sexuales cerebrales estén compensando diferencias fisiológicas entre hembras y machos, y de esta manera impedir que ocurran diferencias en funciones o conductas (revisado en De Vries 2004). Por ejemplo, los niveles hormonales gonadales sexualmente dimórficos podrían generar diferencias sexuales en determinadas conductas, si no existe un mecanismo de compensación. Teniendo en cuenta este marco conceptual, en *G. omarorum* es especialmente interesante la comparación sexual de la conducta territorial y sus bases neuroendócrinas así como el análisis de posibles diferencias estacionales en ambos aspectos.

Durante el período reproductivo hembras y machos no presentaron dimorfismo sexual morfológico ni electrofisiológico, y en el ambiente natural los tamaños

territoriales fueron sexualmente monomórficos. Sin embargo, el sexo constituyó un factor relevante para la territorialidad durante el período reproductivo: los esteroides sexuales circulantes (17β-estradiol en hembras y 11-KT en machos) correlacionaron con el tamaño del territorio y en las hembras reproductivas el tamaño territorial depende del índice gonadosomático (Cap. I; Zubizarreta et al. 2020a). Como era esperado, en el período reproductivo emergen determinantes de los territorios con dimorfismo sexual, lo que podría considerarse como diferente base neuroendócrina que tiene como consecuencia una salida conductual sexualmente monomórfica. Durante el período no reproductivo, la territorialidad y su modulación neuroendócrina no mostró diferencias sexuales: a- los tamaños territoriales y sus determinantes no mostraron sesgo por sexo (Cap. I; Zubizarreta et al. 2020a); b- la agresión territorial no presentó dimorfismo sexual en ninguno de sus componentes (Cap. II; Batista et al. 2012; Quintana et al. 2016), y c- la agresión territorial es dependiente de neurosíntesis de estrógenos en ambos sexos, e independiente de acciones androgénicas directas (Cap. II; Jalabert et al. 2015; Zubizarreta et al. 2020b; Valiño et al. en preparación). Sin embargo, cuando se cuantifica el perfil hormonal plasmático y cerebral se hace evidente que la base neuroendócrina presenta diferencias entre hembras y machos. Las hembras presentaron mayores niveles circulantes de androstenediona y testosterona que los machos, y éstos además mostraron 11-KT circulante (Cap. III). Este dimorfismo sexual es el primero evidenciado en *G. omarorum* fuera del período reproductivo, y ratifica la importancia de analizar las bases neuroendócrinas por separado en hembras y machos, aunque la salida conductual sea igual en ambos sexos. La concentración cerebral de estrona no mostró diferencias sexuales, a pesar de que las concentraciones de AE cerebrales y plasmáticas fueron mayores en hembras que en machos (Cap. III). Este resultado dialoga con que el efecto de la inhibición de la aromatasa sea similar en los dos sexos (Jalabert et al. 2015; Zubizarreta et al. 2020b) y plantea la hipótesis de que la síntesis de estrona está limitada por la cantidad de aromatasa activa en condiciones basales, lo que podría considerarse un ejemplo de compensación de diferencias sexuales para generar una salida conductual sexualmente monomórfica.

LA AGRESIÓN TERRITORIAL NO REPRODUCTIVA ES MODULADA POR EFECTOS RÁPIDOS DE ESTRÓGENOS NEUROSINTETIZADOS

Los andrógenos periféricos han sido el principal objeto de estudio en la regulación de la agresión durante el período reproductivo. En machos reproductivos está ampliamente documentado el mantenimiento de la agresión depende de andrógenos gonadales (revisado en Oliveira 2004; Simon y Lu 2006). La relación entre esteroides circulantes y agresión es bidireccional, por lo que en machos de muchas especies las contiendas provocan una elevación de los niveles de andrógenos plasmáticos (Wingfield et al. 1990; revisado y actualizado en Goymann et al. 2019). En *G. omarorum* se confirmó que la agresión territorial fuera del período reproductivo no es regulada por andrógenos, a pesar de que los individuos mostraron niveles circulantes detectables de androstenediona y testosterona en hembras, a los que se suma la 11-KT en machos (Cap. III). Las evidencias que apuntan a la independencia de la acción androgénica directa sobre la agresión no reproductiva son tres. Primero, en machos no se observa un aumento en la 11-KT circulante asociado a las contiendas (Quintana et al. 2016). Segundo, la gonadectomía no afecta la agresión en machos (Jalabert et al. 2015). Tercero, el bloqueo en agudo de los receptores de andrógeno no afecta la agresión territorial de hembras ni de machos no reproductivos (Cap. II, Zubizarreta et al. 2020b; Valiño et al. en preparación).

La regulación rápida por neuroesteroides se ha focalizado casi exclusivamente en el 17β-estradiol actuando de manera rápida no genómica, con acciones iniciadas en la membrana celular. Los estrógenos tienen efectos rápidos que han sido caracterizados en profundidad en el comportamiento reproductivo de machos de múltiples especies de vertebrados, que van de peces a mamíferos (Cornil et al. 2012; Remage-Healey y Bass 2006). Los neuroestrógenos se sintetizan rápidamente y fluctúan frente a determinados estímulos sociales. Por ejemplo, tanto hembras como machos de pinzón cebra muestran un aumento local de estrógenos neurosintetizados en un núcleo análogo a la corteza auditiva secundaria en respuesta al canto de un coespecimen (Remage-Healey et al. 2011; Remage-

Healey et al. 2008). Aunque menos estudiada que la regulación sobre la conducta reproductiva, las acciones estrogénicas rápidas son relevantes en la modulación de la agresión no reproductiva (Heimovics et al. 2015; Trainor et al. 2008). Las características temporales de la inhibición de la aromatasa realizadas en esta tesis apuntaron a evidenciar la existencia de modulación estrogénica rápida sobre la agresión no reproductiva. El drástico efecto de la inhibición de la producción rápida de estrógenos sobre la agresión territorial en hembras y machos no reproductivos de *G. omarorum* (Cap. II, Zubizarreta et al. 2020b, Jalabert et al. 2015) sugieren fuertemente que existen aumentos transitorios en los niveles de estrógenos cerebrales que median la motivación para iniciar la contienda a través de acciones rápidas. Por lo tanto, si se inhibe la producción de estrógenos, se observa una distorsión de diferentes aspectos de la agresión territorial. El sustrato para la síntesis rápida de estrógenos en *G. omarorum* está presente en el cerebro y plasma de individuos no reproductivos, ya que se constató la presencia de andrógenos aromatizables (Cap. III). En aves y mamíferos no reproductivos la DHEA se ha postulado como el precursor circulante para la síntesis cerebral de estrógenos y tiene un rol protagónico en la modulación de la agresión no reproductiva (Demas et al. 2007; Soma et al. 2015). En *G. omarorum* no se detectaron niveles plasmáticos de este andrógeno (Cap. III), lo que descarta su rol como precursor en la neurosíntesis de estrógenos. Un aumento cerebral rápido de estrógenos puede ocurrir por los siguientes mecanismos: *a*- una activación rápida de la aromatasa; *b*- un aumento plasmático rápido en los andrógenos precursores que difundan al cerebro; o *c*- un aumento local de andrógenos neurosintetizados independiente de la periferia. En *G. omarorum* el pico cerebral de estrógenos probablemente no se sostiene por un aumento rápido de andrógenos plasmáticos. Esta afirmación se fundamenta por: 1- el hecho de que la gonadectomía no provoca un cambio en la agresión (Jalabert et al. 2015); 2- la ausencia de una respuesta rápida en la 11-KT circulante (Quintana et al. 2016) y 3- no se detectaron niveles circulantes ni cerebrales de DHEA (Cap. III), que en aves y mamíferos se postula como el precursor de la neurosíntesis de estrógenos que mantiene la agresión no reproductiva (Demas et al. 2007; Heimovics et al. 2016).

Tanto el mecanismo *a* como el *c* podrían sostener un aumento transitorio de estrógenos cerebrales. La actividad de la aromatasa presenta modulación rápida, la cual ha sido bien documentada en el cerebro de aves (Balthazart et al. 2006; de Bournonville et al. 2017; Remage-Healey et al. 2011) y la activación de la enzima es responsable de los cambios transitorios asociados a diversas conductas sociales. En *G. omarorum* la expresión de aromatasa se identificó en el área preóptica de individuos no reproductivos (Eastman et al. 2020) y es posible que la enzima se active rápidamente frente al desafío social que implica la defensa territorial. En base a los resultados aportados por esta tesis no es posible descartar el mecanismo *c*. Evidencia reciente en aves muestra que el aumento transitorio de los neuroestrógenos en respuesta al canto de un coespecimen es precedido por un pico de testosterona neurosintetizada, que se aromatiza localmente muy rápido a E2 (de Bournonville et al. 2020). Evidencia que podría apuntar en esta dirección es que en *G. omarorum* hay andrógenos aromatizables en cerebro (Cap. III), y las enzimas necesarias para la síntesis de andrógenos están presentes en el POA (Eastman et al. 2020).

Además de que hay posibles aumentos transitorios en la producción de estrógenos asociados a las contiendas, la cuantificación de esteroides cerebrales muestra que existe un mantenimiento de niveles hormonales cerebrales basales. En los individuos no reproductivos colectados en la naturaleza en condiciones basales se evidenciaron niveles cerebrales de estrona (Cap. III), lo cual podría implicar posibles efectos estrogénicos a largo plazo. La neurosíntesis constitutiva de estrógenos se ha relacionado con diferentes procesos como por ejemplo el mantenimiento de neurogénesis, y procesos de aprendizaje y memoria (Balthazart et al. 2009; Micevych y Meisel 2017; Tuscher et al. 2016; Woolley 2007). En el marco de la agresión territorial, los niveles basales de estrona podrían favorecer que los individuos no reproductivos estén prontos para iniciar una contienda si existe un desafío social, o podrían reflejar una producción esteroidea sostenida desencadenada por la activación de mecanismos lentos iniciados por acciones genómicas. Por ejemplo, durante un desafío de intrusión territorial puede existir un

aumento transitorio de la neurosíntesis de estrógenos que actúe de manera rápida regulando la motivación para iniciar la contienda, y a la vez iniciar cambios más lentos mediados por acciones genómicas. Evidencia a favor de que en *G. omarorum* la defensa territorial y el mantenimiento del estatus de dominancia/subordinación desencadenan cambios genómicos relacionados a las vías esteroideas fue aportada por Eastman et al. (2020). En dominantes se constató un aumento en la transcripción de aromatasa, mientras que en subordinados un aumento en la expresión enzimas CYP450b1 y DHEA sulfotransferasa que metabolizan estrógenos y andrógenos (Eastman et al., 2020). Tanto la modulación rápida de la motivación para la agresión territorial como los niveles hormonales cerebrales basales que podrían asegurar el mantenimiento del estatus se podrían interpretar como una generalización de la hipótesis de la acción dual de los estrógenos en el control de la conducta. La hipótesis dual propone que los estrógenos neurosintetizados modulan diferentes aspectos del comportamiento sexual de machos actuando a través de mecanismos rápidos y lentos, que implican acciones no genómicas y genómicas respectivamente (Cornil y de Bournonville 2018). Por un lado, provocan la motivación sexual actuando de manera rápida. Por otro lado, los estrógenos afectan el desempeño, o aspecto consumatorio de la conducta (secuencia copulatoria) actuando con una latencia mayor que implica la existencia de mecanismos genómicos (Balthazart y Ball 2007). Si bien no es posible realizar un paralelismo entre los dos componentes de la conducta sexual con la agresión territorial y el mantenimiento del estatus dominante/subordinado, la hipótesis dual de los estrógenos neurosintetizados podría explicar los resultados mostrados en esta tesis y los reportes mencionados en *G. omarorum*.

MODELO INTERPRETATIVO: TERRITORIALIDAD DE *GYMNOTUS OMARORUM* DURANTE EL PERÍODO NO REPRODUCTIVO

En la figura IV.1 se presenta un esquema interpretativo de los eventos y mecanismos que subyacen a la distribución espacial de individuos de *Gymnotus omarorum* en la naturaleza durante el período no reproductivo. En la disputa por un territorio, los individuos llevan a cabo una corta evaluación y se enfrascan en contiendas escaladas que terminan con la emergencia de un dominante y un subordinado. Tanto hembras como machos despliegan agresión territorial, y el resultado de una contienda depende del tamaño corporal: el pez más grande adquiere el territorio en disputa. La agresión territorial es independiente de hormonas gonadales, y de acciones rápidas de andrógenos. La motivación para la adquisición de un territorio y la defensa territorial es dependiente de acciones rápidas de estrógenos neurosintetizados. El desafío territorial produciría un aumento rápido de estrógenos en sitios específicos de la red del comportamiento social. Este pico de neuroestrógenos tendría un efecto rápido actuando a través de mecanismos no genómicos promoviendo la conducta agonística y el establecimiento de la dominancia. En una escala temporal corta, los picos de neuroestrógenos en nodos de la red del comportamiento social estarían asociados con el estatus de dominancia/subordinación y los niveles de agresión. En ausencia de niveles elevados de esteroides circulantes este sería el sello hormonal que habilitaría a largo plazo la existencia de una distribución de territorios estables en poblaciones naturales, donde los niveles de neuroestrógenos correlacionarían con el tamaño territorial.

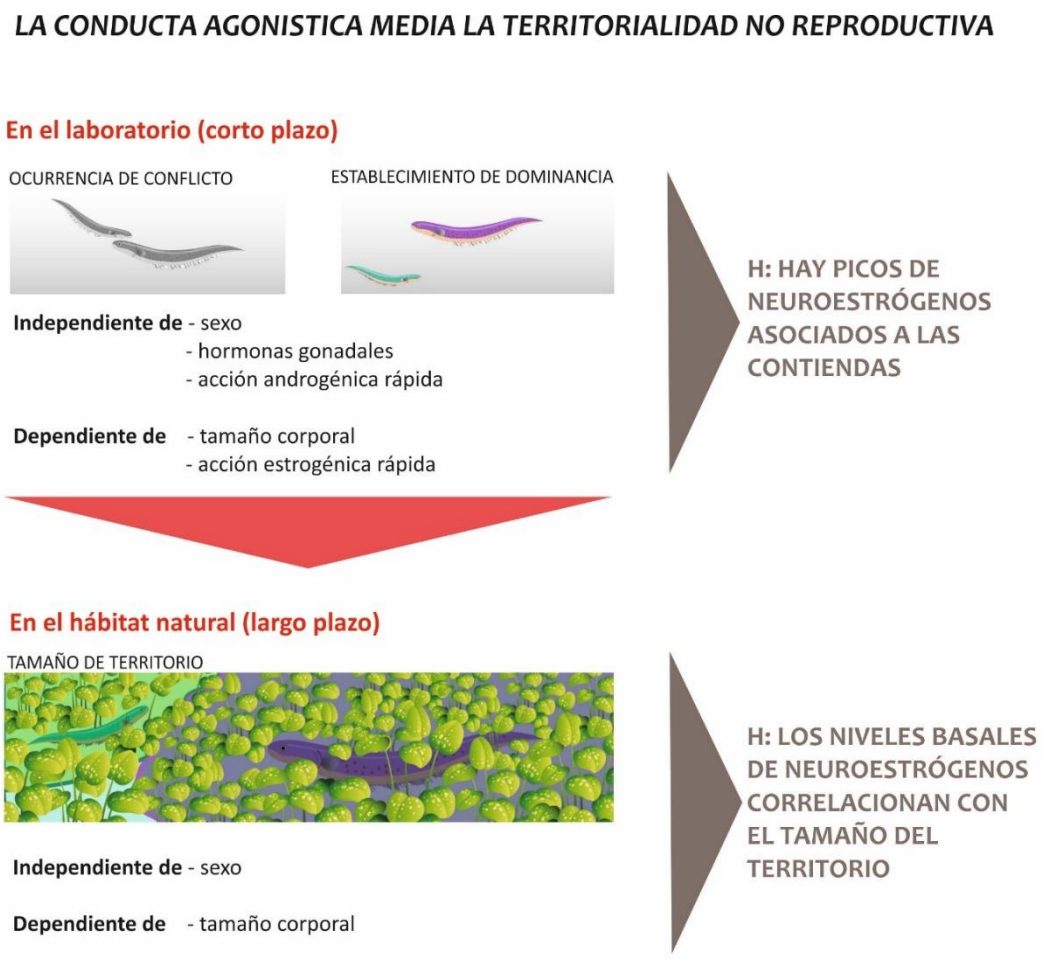

Figura IV.1: Modelo interpretativo territorialidad de *Gymnotus omarorum* durante el período no reproductivo, que conjuga resultados de esta tesis, y dos hipótesis (H) que se sostienen sobre ellas. Modificado de (A. C. Silva et al., 2020).

Gymnotus omarorum, como teleósteo, contribuye a ampliar la perspectiva del estado del arte en el conocimiento de la regulación hormonal de la agresión no reproductiva, actualmente basado en modelos de aves y mamíferos. De esta manera, al ser de la clase de vertebrados más basal y diversa, aporta a revelar estrategias generales en el control de la agresión no reproductiva. La estrategia de modulación estrogénica compartida con aves y mamíferos subraya la relevancia de los estrógenos en la agresión, ya sea por conservación en el mecanismo de regulación o convergencia evolutiva arribando a la misma solución.

CAPÍTULO V. PERSPECTIVAS

La agresión territorial no reproductiva de *Gymnotus omarorum* abre nuevas perspectivas de investigación en la modulación esteroidea de la agresión. En base a los resultados de esta tesis, se abren dos líneas principales: a- demostrar la existencia de cambios rápidos en los niveles cerebrales de estrógenos asociados a las contiendas y niveles cerebrales basales asociados a la distribución espacial estable en la naturaleza; b- evaluar el rol de los esteroides en la plasticidad estacional de la regulación de la agresión y su vínculo con claves ambientales.

A- NEUROSÍNTESIS DE ESTEROIDES ASOCIADOS A LA AGRESIÓN Y A LA DISTRIBUCIÓN DE TERRITORIOS

El modelo interpretativo planteado en la Fig. IV.1 postula dos hipótesis sobre la asociación de los niveles de estrógenos cerebrales con las contiendas (a corto plazo) y con los tamaños territoriales (a largo plazo). Si el desafío territorial produce un aumento rápido de estrógenos en sitios específicos de la red del comportamiento social, en una escala temporal corta, la predicción es que los picos de neuroestrógenos en nodos de la red del comportamiento social estarán asociados al estatus de dominancia/subordinación, y a los niveles de agresión. Por otro lado, la segunda hipótesis postula que los niveles de neuroestrógenos constituirían el sello hormonal que habilitaría a largo plazo la existencia de una distribución de territorios estables en poblaciones naturales. La predicción para este caso es que el tamaño de los territorios no reproductivos correlacionará con los niveles de neuroestrógenos en nodos de la red del comportamiento social.

Para abordar la primera hipótesis se propone un plan que integra el enfoque conductual con la cuantificación hormonal. Para esto se realizarán contiendas diádicas intrasexuales durante el período no reproductivo en el set-up experimental de laboratorio. Después de la resolución del conflicto y la determinación de la dominancia, se dejarán interactuar el pez dominante y el subordinado durante 10

minutos y luego se extraerá cerebro y sangre para posterior cuantificación hormonal. Los niveles de esteroides de dominantes y subordinados se compararán con los de individuos no sometidos a enfrentamientos agonísticos. Para abordar la segunda hipótesis se propone un plan que integra el enfoque ecológico con la cuantificación hormonal. Utilizando la misma metodología que la del Capítulo I, se determinarán los tamaños territoriales durante el período no reproductivo y éstos se correlacionarán con los niveles de esteroides cerebrales y plasmáticos.

Estas actividades imponen la identificación de nodos de la red cerebral del comportamiento social en tejido cerebral congelado para posterior extracción de las áreas por la técnica de Palkovits punch. Asimismo, también será necesaria la puesta a punto de la cuantificación de esteroides en cantidades menores de tejido cerebral.

B- ESTACIONALIDAD EN LA REGULACIÓN DE LA AGRESIÓN PERSISTENTE

La agresión expresada durante todo el año, tanto cuando las hormonas gonadales son altas como cuando están en muy bajos niveles, probablemente sea mantenida por mecanismos que varían estacionalmente. En base a este postulado, la hipótesis a poner a prueba en *G. omarorum* es la siguiente: la regulación de la agresión es dependiente de esteroides todo el año, y alterna la fuente de producción de andrógenos y estrógenos, del cerebro (en el período no reproductivo) a un origen gonadal (en período reproductivo). En el período reproductivo la agresión en machos dependería principalmente de andrógenos circulantes y en menor medida de la neurosíntesis de estrógenos, mientras que en el período no reproductivo los estrógenos sintetizados en el cerebro serían el modulador principal. Por otro lado, la agresión en hembras sería modulada por estrógenos a lo largo de todo el ciclo reproductivo; en el período reproductivo la fuente sería gonadal, mientras que en período no reproductivo los estrógenos serían sintetizados en los distintos núcleos de la red cerebral del comportamiento social.

Para abordar esta hipótesis, se propone un plan que integra un enfoque conductual llevado a cabo en el hábitat natural, con abordajes celulares y moleculares. En una primera instancia se plantea analizar el rol de los andrógenos (T y 11-KT) y el E2 en la conducta agresiva natural de machos y hembras dentro del período reproductivo. Para esto se realizarán contiendas diádicas durante el período reproductivo en un set-up experimental a la orilla de la laguna con el fin de mantener los niveles hormonales reproductivos, que decaen en cautiverio. En paralelo, se caracterizará el perfil esteroideo circulante y cerebral de hembras y machos reproductivos, para compararlo con el ya presentado en esta tesis para el período no reproductivo. Este análisis dialoga con otro abordaje que es la cuantificación génica de aromatasa en núcleos de la red cerebral del comportamiento social en el período reproductivo y no reproductivo, y su correlación con niveles circulantes de andrógenos y estrógenos. Asimismo, en base a los resultados obtenidos, se propone cuantificar la expresión génica de otras enzimas esteroidogénicas y su correlación con precursores androgénicos circulantes, para entender la fuente del sustrato de la aromatasa en el período no reproductivo. Esta actividad impone la puesta a punto de la qPCR para los transcriptos de enzimas esteroidogénicas y receptores a partir de los datos transcriptómicos obtenidos en la especie. Parte de este trabajo forma parte de la tesis de Doctorado de Guillermo Valiño.

Por otro lado, se explorarán los mecanismos que integran las claves ambientales y sociales con los ritmos circanuales. En *G. omarorum* la caracterización estacional de las vías esteroidogénicas cerebrales posicionará esta especie en un lugar inmejorable para analizar el rol de factores ambientales sincronizadores del ciclo anual sobre las bases fisiológicas de la agresión. La melatonina es uno de los principales temporizadores en vertebrados, tanto circadiano como estacional. Se ha demostrado asimismo que cumple un rol fundamental en alternar los mecanismos hormonales que subyacen la agresión que se mantiene durante todo el año. En el hámster siberiano se ha demostrado que los cambios estacionales de melatonina promueven el pasaje de un control endócrino gonadal a uno cerebral (Rendon et al., 2015). Esta línea de trabajo aspira a avanzar en el conocimiento de los mecanismos

que involucran la melatonina como señal neuroendócrina temporizadora de los ritmos estacionales, y en particular su efecto sobre los mecanismos de control de la agresión. Con este propósito se caracterizará la variación estacional de sistemas neuroendócrinos responsables de la modulación de la agresión (compartido con el objetivo anterior), y del sistema melatoninérgico. Mediante qPCR se cuantificará el ARNm de enzimas y receptores de los sistemas androgénicos, estrogénicos y melatoninérgicos en los núcleos del cerebro social. La toma de muestras de plasma y cerebro se hará en el hábitat natural. Esta perspectiva está enmarcada en el Grupo CISC_Cronobiología_883158. Coordinadoras Bettina Tassino y Ana Silva.

FINANCIACIÓN

El desarrollo de esta tesis fue posible gracias a la siguiente financiación:

- Beca de Doctorado Agencia Nacional de Investigación e Innovación.
- Beca de finalización Comisión Académica de Posgrado.
- PEDECIBA alícuota para estudiantes.
- PEDECIBA apoyo para congresos en el exterior.
- PEDECIBA apoyo para pasantía en Universidad de San Pablo.
- Society for Behavioral Neuroendocrinology travel Award para asistir al SBN-2017 en California USA.
- Comisión Sectorial de Investigación Científica pasantía Movilidad e Intercambio Académico para pasantía en University of British Columbia.
- Emerging Leaders of the Americas Program de Canada para pasantía en University of British Columbia.

Los siguientes proyectos financiaron la realización de esta tesis y parte de las líneas de investigación incluidas como perspectivas:

- FCE FCE_1_2011_6180_Bases hormonales de la agresión territorial no reproductiva.
  Responsable Ana Silva.

- FCE_1_2014_1_104272_La revolución estrogénica de la agresión.
  Responsable Ana Silva.

- FCE_1_2017_1_136381_Dimorfismo sexual y variaciones estacionales en los mecanismos de control de la agresión.
  Responsable Laura Quintana. Co-Responsable Ana Silva.

- CISC I+D_Moduación ambiental y social del reloj biológico.
  Responsables Bettina Tassino y Ana Silva.

BIBLIOGRAFÍA

Adams, E. S. (2001). Approaches to the Study of Territory Size and Shape. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *32*(1), 277-303. https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.32.081501.114034

Adkins-Regan, E. (2005). *Hormones and Animal Social Behavior*. Princeton University Press.

Albert, D. J., Jonik, R. H., y Walsh, M. L. (1990). Hormone-dependent aggression in female rats: Testosterone implants attenuate the decline in aggression following ovariectomy. *Physiology y Behavior*, *47*(4), 659-664. https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90074-E

Alexander, R. D. (1974). The evolution of social behavior. *Annual review of ecology and systematics*, *5*(1), 325-383.

Allen, C. R., Garmestani, A. S., Havlicek, T. D., Marquet, P. A., Peterson, G. D., Restrepo, C., Stow, C. A., y Weeks, B. E. (2006). Patterns in body mass distributions: Sifting among alternative hypotheses. *Ecology Letters*, *9*(5), 630-643. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00902.x

Anderson, R. O., Gutreuter, S. J., Nielsen, L., y Johnson, D. (1983). Fisheries techniques. En *Fish Farmin, Handbook* (pp. 237-337). American Fisheries Society, Bethesda Maryland. Brown.

Andersson, E., Borg, B., y Lambert, J. (1988). Aromatase activity in brain and pituitary of immature and mature Atlantic salmon (Salmo salar L.) parr. *General and comparative endocrinology*, *72*(3), 394-401.

Ardanaz, J. L., Silva, A., y Macadar, O. (2001). Temperature sensitivity of the electric organ discharge waveform in Gymnotus carapo. *Journal of Comparative Physiology A*, *187*(11), 853-864. https://doi.org/10.1007/s00359-001-0256-8

Armitage, K. B. (1977). Social variety in the yellow-bellied marmot: A population-behavioural system. *Animal Behaviour*, *25*, 585-593. https://doi.org/10.1016/0003-3472(77)90108-7

Ball, G. F., y Balthazart, J. (2010). Neuroendocrine regulation of reproductive behavior in birds. En *Hormones, Brain and Behavior Online* (pp. 855-897). Elsevier Inc.

Balthazart, J., Baillien, M., y Ball, G. F. (2006). Rapid Control of Brain Aromatase Activity by Glutamatergic Inputs. *Endocrinology*, *147*(1), 359-366. https://doi.org/10.1210/en.2005-0845

Balthazart, J., y Ball, G. F. (2007). Topography in the preoptic region: Differential regulation of appetitive and consummatory male sexual behaviors. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *28*(4), 161-178. https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.05.003

Balthazart, J., Cornil, C. A., Charlier, T. D., Taziaux, M., y Ball, G. F. (2009). Estradiol, a key endocrine signal in the sexual differentiation and activation of reproductive behavior in quail. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, *311*(5), 323-345.

Batista, G., Zubizarreta, L., Perrone, R., y Silva, A. (2012). Non-sex-biased dominance in a sexually monomorphic electric fish: Fight structure and submissive electric signalling. *Ethology*, *118*(4), 398-410. https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2012.02022.x

Blumstein, D. T., Ebensperger, L., Hayes, L., Vásquez, R. A., Ahern, T. H., Burger, J. R., Dolezal, A. G., Dosmann, A., Mariscal, G. G., y Harris, B. N. (2010). Towards an integrative understanding of social behavior: New models and new opportunities. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *4*, 34.

Borg, B. (1994). Androgens in teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, *109*(3), 219-245.

Börger, L., Dalziel, B. D., y Fryxell, J. M. (2008). Are there general mechanisms of animal home range behaviour? A review and prospects for future research. *Ecology Letters*, *11*(6), 637-650. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01182.x

Briffa, M., y Sneddon, L. (2010). Contest behavior. *Evolutionary behavioral ecology*, 246e265.

Brown, J. H., Gillooly, J. F., Allen, A. P., Savage, V. M., y West, G. B. (2004). Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology*, *85*(7), 1771-1789. https://doi.org/10.1890/03-9000

Brown, J. L. (1964). The Evolution of Diversity in Avian Territorial Systems. *The Wilson Bulletin*, *76*(2), 160-169. JSTOR.

Brown, J. L. (1975). *The evolution of behavior*. New York. W. W. Norton.

Brown, J. L., y Orians, G. H. (1970). Spacing Patterns in Mobile Animals. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *1*, 239-262. JSTOR. https://doi.org/10.1146/annurev.es.01.110170.001323

Butchart, S. H. M., Seddon, N., y Ekstrom, J. M. M. (1999). Polyandry and competition for territories in bronze-winged jacanas. *Journal of Animal Ecology*, *68*(5), 928-939. https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.1999.00341.x

Cain, K. E., y Rosvall, K. A. (2014). Next steps for understanding the selective relevance of female-female competition. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *2*, 32.

Caldwell, G., Glickman, S., y Smith, E. (1984). Seasonal aggression independent of seasonal testosterone in wood rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(16), 5255-5257. PubMed. https://doi.org/10.1073/pnas.81.16.5255

Caldwell, J., Shapiro, R., Jirikowski, G., y Suleman, F. (2007). Internalization of sex hormone-binding globulin into neurons and brain cells in vitro and in vivo. *Neuroendocrinology*, *86*(2), 84-93.

Caputi, A. A., y Budelli, R. (2006). Peripheral electrosensory imaging by weakly electric fish. *Journal of Comparative Physiology A*, *192*(6), 587. https://doi.org/10.1007/s00359-006-0100-2

Caputi, A., y Budelli, R. (1995). The electric image in weakly electric fish: I. A data-based model of waveform generation inGymnotus carapo. *Journal of Computational Neuroscience*, *2*(2), 131-147. https://doi.org/10.1007/BF00961884

Chiver, I., Stutchbury, B. J. M., y Morton, E. S. (2014). Seasonal variation in male testosterone levels in a tropical bird with year-round territoriality. *Journal of Field Ornithology*, *85*(1), 1-9. https://doi.org/10.1111/jofo.12044

Clarke, T. A. (1970). Territorial Behavior and Population Dynamics of a Pomacentrid Fish, the Garibaldi, Hypsypops rubicunda. *Ecological Monographs*, *40*(2), 189-212. https://doi.org/10.2307/1942295

Clipperton Allen, A. E., Cragg, C. L., Wood, A. J., Pfaff, D. W., y Choleris, E. (2010). Agonistic behavior in males and females: Effects of an estrogen receptor beta agonist in gonadectomized and gonadally intact mice. *Psychoneuroendocrinology*, *35*(7), 1008-1022. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2010.01.002

Clipperton-Allen, A. E., Almey, A., Melichercik, A., Allen, C. P., y Choleris, E. (2011). Effects of an estrogen receptor alpha agonist on agonistic behaviour in intact and gonadectomized male and female mice. *Psychoneuroendocrinology*, *36*(7), 981-995. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2010.12.010

Comas, V., Langevin, K., Silva, A., y Borde, M. (2019). Distinctive mechanisms underlie the emission of social electric signals of submission in Gymnotus omarorum. *The Journal of Experimental Biology*, *222*(11), jeb195354. https://doi.org/10.1242/jeb.195354

Conover, W. J. (1971). *Practical Nonparametric Statistics*. John Wiley y Sons, Inc.

Cornil, Charlotte A., Leung, C. H., Pletcher, E. R., Naranjo, K. C., Blauman, S. J., y Saldanha, C. J. (2012). Acute and Specific Modulation of Presynaptic Aromatization in the Vertebrate Brain. *Endocrinology*, *153*(6), 2562-2567. https://doi.org/10.1210/en.2011-2159

Cornil, Charlotte Anne, y de Bournonville, C. (2018). Dual action of neuro-estrogens in the regulation of male sexual behavior. *The Proceedings of the 11th International Symposium on Avian Endocrinology*, *256*, 57-62. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.05.002

Crampton, W. G. R. (1998). Effects of anoxia on the distribution, respiratory strategies and electric signal diversity of gymnotiform fishes. *Journal of Fish Biology*, *53*(sA), 307-330. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1998.tb01034.x

Cunningham, R. L., Lumia, A. R., y McGinnis, M. Y. (2012). Androgen Receptors, Sex Behavior, and Aggression. *Neuroendocrinology*, *96*(2), 131-140. https://doi.org/10.1159/000337663

Davey, R. A., y Grossmann, M. (2016). Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *The Clinical Biochemist. Reviews*, *37*(1), 3-15. PubMed.

Davies, N. B. (1976). Food, Flocking and Territorial Behaviour of the Pied Wagtail (Motacilla alba yarrellii Gould) in Winter. *Journal of Animal Ecology*, *45*(1), 235-253. JSTOR. https://doi.org/10.2307/3777

Davies, N. B., y Hartley, I. R. (1996). Food Patchiness, Territory Overlap and Social Systems: An Experiment with Dunnocks Prunella modularis. *Journal of Animal Ecology*, *65*(6), 837-846. JSTOR. https://doi.org/10.2307/5681

Davies, N. B., Krebs, J., y West, S. (2012). *An introduction to behavioural ecology* (4.ª ed.). Wiley Blackwell.

de Bournonville, C., McGrath, A., y Remage-Healey, L. (2020). Testosterone synthesis in the female songbird brain. *Hormones and Behavior*, *121*, 104716. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104716

de Bournonville, C., Smolders, I., Van Eeckhaut, A., Ball, G. F., Balthazart, J., y Cornil, C. A. (2017). Glutamate released in the preoptic area during sexual behavior controls local estrogen synthesis in male quail. *Psychoneuroendocrinology*, *79*, 49-58.

De Vries, G. J. (2004). Minireview: Sex Differences in Adult and Developing Brains: Compensation, Compensation, Compensation. *Endocrinology*, *145*(3), 1063-1068. https://doi.org/10.1210/en.2003-1504

Demas, G. E., Cooper, M. A., Albers, H. E., y Soma, K. K. (2007). Novel Mechanisms Underlying Neuroendocrine Regulation of Aggression: A Synthesis of Rodent, Avian, and Primate Studies. En A. Lajtha y J. D. Blaustein (Eds.), *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology* (pp. 337-372). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-30405-2_8

Dey, C. J., O'Connor, C. M., Gilmour, K. M., Van Der Kraak, G., y Cooke, S. J. (2010). Behavioral and physiological responses of a wild teleost fish to cortisol and androgen manipulation during parental care. *Hormones and Behavior*, *58*(4), 599-605. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.06.016

Diotel, N., Do-Rego, J.-L., Anglade, I., Vaillant, C., Pellegrini, E., Vaudry, H., y Kah, O. (2011). The Brain of Teleost Fish, a Source, and a Target of Sexual Steroids. *Frontiers in Neuroscience*, *5*, 137. https://doi.org/10.3389/fnins.2011.00137

Diotel, N., Page, Y. L., Mouriec, K., Tong, S.-K., Pellegrini, E., Vaillant, C., Anglade, I., Brion, F., Pakdel, F., Chung, B., y Kah, O. (2010). Aromatase in the brain of teleost fish: Expression, regulation and putative functions. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *31*(2), 172-192. https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.01.003

Dunham, A. (2008). Battle of the sexes: Cost asymmetry explains female dominance in lemurs. *Animal Behaviour*, 1435-1439. https://doi.org/doi:10.1016/j.anbehav.2008.06.018

Dunlap, K. D., Smith, G. T., y Yekta, A. (2000a). Temperature Dependence of Electrocommunication Signals and Their Underlying Neural Rhythms in the Weakly Electric Fish, Apteronotus leptorhynchus. *Brain, Behavior and Evolution*, *55*(3), 152-162. https://doi.org/10.1159/000006649

Duque-Wilckens, N., y Trainor, B. C. (2017). *Behavioral Neuroendocrinology of Female Aggression*. Oxford University Press.

https://oxfordre.com/neuroscience/view/10.1093/acrefore/9780190264086.001.0001/acrefore-9780190264086-e-11

Eason, P. K., Cobbs, G. A., y Trinca, K. G. (1999). The use of landmarks to define territorial boundaries. *Animal Behaviour*, *58*(1), 85-91. https://doi.org/10.1006/anbe.1999.1133

Eastman, G., Valiño, G., Radío, S., Young, R. L., Quintana, L., Zakon, H. H., Hofmann, H. A., Sotelo-Silveira, J., y Silva, A. (2020). Brain transcriptomics of agonistic behaviour in the weakly electric fish Gymnotus omarorum, a wild teleost model of non-breeding aggression. *Scientific Reports*, *10*(1), 9496. https://doi.org/10.1038/s41598-020-66494-9

Elliott, J. M. (1990). Mechanisms Responsible for Population Regulation in Young Migratory Trout, Salmo trutta. III. The Role of Territorial Behaviour. *Journal of Animal Ecology*, *59*(3), 803-818. JSTOR. https://doi.org/10.2307/5015

Emlen, S. T., y Oring, L. W. (1977). Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. *Science*, *197*(4300), 215-223.

Fleming, A. S., Phillips, A., Rydall, A., y Levesque, L. (1988). Effects of photoperiod, the pineal gland and the gonads on agonistic behavior in female golden hamsters (Mesocricetus auratus). *Physiology y Behavior*, *44*(2), 227-234. https://doi.org/10.1016/0031-9384(88)90143-6

Fowler, C. D., Freeman, M. E., y Wang, Z. (2003). Newly proliferated cells in the adult male amygdala are affected by gonadal steroid hormones. *Journal of neurobiology*, *57*(3), 257-269.

Fox, H. E., White, S. A., Kao, M. H. F., y Fernald, R. D. (1997). Stress and Dominance in a Social Fish. *The Journal of Neuroscience*, *17*(16), 6463. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-16-06463.1997

Fuxjager, M. J., Trainor, B. C., y Marler, C. A. (2017). What can animal research tell us about the link between androgens and social competition in humans? *Hormones and Human Competition*, *92*, 182-189. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.11.014

Garcia-Segura, L. M. (2008). Aromatase in the brain: Not just for reproduction anymore. *Journal of neuroendocrinology*, *20*(6), 705-712.

Gavassa, S., Silva, A. C., Gonzalez, E., y Stoddard, P. K. (2012). Signal modulation as a mechanism for handicap disposal. *Animal Behaviour*, *83*(4), 935-944. https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2012.01.012

Gavassa, S., Silva, A. C., y Stoddard, P. K. (2011). Tight hormonal phenotypic integration ensures honesty of the electric signal of male and female Brachyhypopomus gauderio. *Hormones and Behavior*, *60*(4), 420-426. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.07.009

Gill, S. A., Alfson, E. D., y Hau, M. (2007). Context matters: Female aggression and testosterone in a year-round territorial neotropical songbird (Thryothorus leucotis). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *274*(1622), 2187-2194. https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0457

Gonçalves, D., Alpedrinha, J., Teles, M., y 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*(4), 534-541. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.02.003

Goodson, J. L., y Kabelik, D. (2009). Dynamic limbic networks and social diversity in vertebrates: From neural context to neuromodulatory patterning. *Hormones y Social Behavior*, *30*(4), 429-441. https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2009.05.007

Goymann, W., Moore, I. T., y Oliveira, R. F. (2019). Challenge Hypothesis 2.0: A Fresh Look at an Established Idea. *BioScience*, *69*(6), 432-442. https://doi.org/10.1093/biosci/biz041

Grant, J. W. A. (1997). *Territoriality. Behavioural ecology of teleost fishes*. Oxford: Oxford University Press.

Grebe, S. K., y Singh, R. J. (2011). LC-MS/MS in the Clinical Laboratory—Where to From Here? *The Clinical Biochemist. Reviews*, *32*(1), 5-31. PubMed.

Gwinner, E., Rödl, T., y Schwabl, H. (1994). Pair Territoriality of Wintering Stonechats: Behaviour, Function and Hormones. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *34*(5), 321-327. JSTOR.

Hammer, Ø., Harper, D. A., y Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, *4*(1), art 4.

Harding, C. (1992). Hormonal modulation of neurotransmitter function and behavior in male songbirds. *Poultry science reviews*, *4*(4), 261-273.

Hardy, I. C. W., y Briffa, M. (2013). *Animal Contests*. Cambridge University Press. https://books.google.com.uy/books?id=aQlCAQAAQBAJ

Hau, M., Stoddard, S. T., y Soma, K. K. (2004). Territorial aggression and hormones during the non-breeding season in a tropical bird. *Hormones and Behavior*, *45*(1), 40-49. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2003.08.002

Heike Pröhl. (2005). Territorial Behavior in Dendrobatid Frogs. *Journal of Herpetology*, *39*(3), 354-365. https://doi.org/10.1670/162-04A.1

Heimovics, S. A., Prior, N. H., Ma, C., y Soma, K. K. (2016). Rapid Effects of an Aggressive Interaction on Dehydroepiandrosterone, Testosterone and Oestradiol Levels in the Male Song Sparrow Brain: A Seasonal Comparison. *Journal of Neuroendocrinology*, *28*(2). https://doi.org/10.1111/jne.12345

Heimovics, Sarah A., Ferris, J. K., y Soma, K. K. (2015). Non-invasive administration of 17β-estradiol rapidly increases aggressive behavior in non-breeding, but not breeding, male song

sparrows. *Hormones and Behavior*, *69*, 31-38. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.11.012

Heimovics, Sarah A., Merritt, J. R., Jalabert, C., Ma, C., Maney, D. L., y Soma, K. K. (2018). Rapid effects of 17β-estradiol on aggressive behavior in songbirds: Environmental and genetic influences. *SI: Fast effects of steroids*, *104*, 41-51. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.03.010

Heimovics, Sarah A., Trainor, B. C., y Soma, K. K. (2015). Rapid Effects of Estradiol on Aggression in Birds and Mice: The Fast and the Furious. *Integrative and Comparative Biology*, *55*(2), 281-293. https://doi.org/10.1093/icb/icv048

Hirschenhauser, K., y Oliveira, R. F. (2006). Social modulation of androgens in male vertebrates: Meta-analyses of the challenge hypothesis. *Animal Behaviour*, *71*(2), 265-277. https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2005.04.014

Huang, W.-S., Greene, H. W., Chang, T.-J., y Shine, R. (2011). Territorial behavior in Taiwanese kukrisnakes (Oligodon formosanus). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(18), 7455. https://doi.org/10.1073/pnas.1101804108

Huffman, L. S., O'Connell, L. A., y Hofmann, H. A. (2013). Aromatase regulates aggression in the African cichlid fish Astatotilapia burtoni. *Physiology y Behavior*, *112-113*, 77-83. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.02.004

Huntingford, F. A., y Turner, A. K. (1987). The consequences of animal conflict. En F. A. Huntingford y A. K. Turner (Eds.), *Animal Conflict* (pp. 227-250). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-3145-9_9

Hurd, P. L. (2006). Resource holding potential, subjective resource value, and game theoretical models of aggressiveness signalling. *Journal of Theoretical Biology*, *241*(3), 639-648. https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2006.01.001

Jalabert, C., Munley, K. M., Demas, G. E., y Soma, K. K. (2018). *Aggressive behavior*.

Jalabert, C., Quintana, L., Pessina, P., y Silva, A. (2015). Extra-gonadal steroids modulate non-breeding territorial aggression in weakly electric fish. *Hormones and Behavior*, *72*, 60-67. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.05.003

Jalabert, C., Ma, C., Soma, K.K. (2020) Profiling of systemic and brain steroids in male songbirds: seasonal changes in neurosteroids. Journal of Neuroendocrinology. En prensa.

Jasnow, A. M., Huhman, K. L., Bartness, T. J., y 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(2), 102-110. https://doi.org/10.1006/hbeh.2000.1604

Kazuyoshi Tsutsui, y Takeshi Yamazaki. (1995). Avian neurosteroids. I. Pregnenolone biosynthesis in the quail brain. *Brain Research*, *678*(1), 1-9. https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00116-8

Keeley, E. R. (2000). An experimental analysis of territory size in juvenile steelhead trout. *Animal Behaviour*, *59*(3), 477-490. https://doi.org/10.1006/anbe.1999.1288

Kim, S. B., Kanno, A., Ozawa, T., Tao, H., y Umezawa, Y. (2007). Nongenomic Activity of Ligands in the Association of Androgen Receptor with Src. *ACS Chemical Biology*, *2*(7), 484-492. https://doi.org/10.1021/cb7000439

Kime, D. E. (1993). 'Classical' and 'non-classical' reproductive steroids in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, *3*(2), 160-180. https://doi.org/10.1007/BF00045230

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

Kohda, M., Shibata, J., Awata, S., Gomagano, D., Takeyama, T., Hori, M., y Heg, D. (2008). Niche differentiation depends on body size in a cichlid fish: A model system of a community

structured according to size regularities. *Journal of Animal Ecology*, *77*(5), 859-868. https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2008.01414.x

La, V. T., y Cooke, S. J. (2011). Advancing the Science and Practice of Fish Kill Investigations. *Reviews in Fisheries Science*, *19*(1), 21-33. https://doi.org/10.1080/10641262.2010.531793

Laredo, S. A., Villalon Landeros, R., Dooley, J. C., Steinman, M. Q., Orr, V., Silva, A. L., Crean, K. K., Robles, C. F., y Trainor, B. C. (2013). Nongenomic effects of estradiol on aggression under short day photoperiods. *Hormones and Behavior*, *64*(3), 557-565. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.06.002

Liere, P., Cornil, C. A., de Bournonville, M. P., Pianos, A., Keller, M., Schumacher, M., y Balthazart, J. (2019). Steroid profiles in quail brain and serum: Sex and regional differences and effects of castration with steroid replacement. *Journal of Neuroendocrinology*, *31*(2), e12681. https://doi.org/10.1111/jne.12681

Logan, C. A., y Wingfield, J. C. (1990). Autumnal territorial aggression is independent of plasma testosterone in mockingbirds. *Hormones and Behavior*, *24*(4), 568-581. https://doi.org/10.1016/0018-506X(90)90042-V

Lorenzi, V., Earley, R. L., y Grober, M. S. (2012). Differential Responses of Brain, Gonad and Muscle Steroid Levels to Changes in Social Status and Sex in a Sequential and Bidirectional Hermaphroditic Fish. *PLOS ONE*, *7*(12), e51158. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051158

Maher, C. M., y Lott, D. F. (2000). A Review of Ecological Determinants of Territoriality within Vertebrate Species. *The American Midland Naturalist*, *143*(1), 1-29. https://doi.org/10.1674/0003-0031(2000)143[0001:AROEDO]2.0.CO;2

Maher, C. R., y Lott, D. F. (1995). Definitions of territoriality used in the study of variation in vertebrate spacing systems. *Animal behaviour*, *49*(6), 1581-1597.

Markham, M. R., Ban, Y., McCauley, A. G., y Maltby, R. (2016). Energetics of Sensing and Communication in Electric Fish: A Blessing and a Curse in the Anthropocene? *Integrative and Comparative Biology*, *56*(5), 889-900. https://doi.org/10.1093/icb/icw104

Marroni, S., Iglesias, C., Mazzeo, N., Clemente, J., Teixeira de Mello, F., y Pacheco, J. P. (2014). Alternative food sources of native and non-native bivalves in a subtropical eutrophic lake. *Hydrobiologia*, *735*(1), 263-276. https://doi.org/10.1007/s10750-013-1714-3

Mayer, A. D., y Rosenblatt, J. S. (1987). Hormonal factors influence the onset of maternal aggression in laboratory rats. *Hormones and behavior*, *21*(2), 253-267.

McCullagh, P., y Nelder, J. A. (1989). *Generalized linear models* (2nd ed.). Chapmann and Hall.

McEwen, B. S., y Milner, T. A. (2017). Understanding the broad influence of sex hormones and sex differences in the brain. *Journal of Neuroscience Research*, *95*(1-2), 24-39. https://doi.org/10.1002/jnr.23809

McEwen, B. S., y Wingfield, J. C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior*, *43*(1), 2-15. https://doi.org/10.1016/S0018-506X(02)00024-7

McLeod, A., y Xu, C. (2011). *bestglm: Best Subset GLM*.

Merritt, J. R., Davis, M. T., Jalabert, C., Libecap, T. J., Williams, D. R., Soma, K. K., y Maney, D. L. (2018). Rapid effects of estradiol on aggression depend on genotype in a species with an estrogen receptor polymorphism. *Hormones and behavior*, *98*, 210-218. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2017.11.014

Metcalfe, N. B., Van Leeuwen, T. E., y Killen, S. S. (2016). Does individual variation in metabolic phenotype predict fish behaviour and performance? *Journal of Fish Biology*, *88*(1), 298-321. https://doi.org/10.1111/jfb.12699

Micevych, P. E., Hammer, R. P., y Hammer Jr, R. P. (2005). *Neurobiological effects of sex steroid hormones*. Cambridge University Press.

Micevych, P. E., y Meisel, R. L. (2017). Integrating neural circuits controlling female sexual behavior. *Frontiers in systems neuroscience*, *11*, 42.

Migliaro, A., Moreno, V., Marchal, P., y Silva, A. (2018). Daily changes in the electric behavior of weakly electric fish naturally persist in constant darkness and are socially synchronized. *Biology Open*, *7*(12), bio036319. https://doi.org/10.1242/bio.036319

Milla, S., Wang, N., Mandiki, S., y Kestemont, P. (2009). Corticosteroids: Friends or foes of teleost fish reproduction? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular y Integrative Physiology*, *153*(3), 242-251.

Moller, P. (1995). *Electric fishes: History and behavior* (Vol. 17). Springer.

Monaghan, E. P., y Glickman, S. E. (1992). Hormones and aggressive behavior. *Behavioral endocrinology*, *134*, 692–694.

Moorcroft, P. R., Lewis, M. A., y Crabtree, R. L. (2006). Mechanistic home range models capture spatial patterns and dynamics of coyote territories in Yellowstone. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *273*(1594), 1651-1659. https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3439

Moore, M. C., y 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*(2), 225-232. https://doi.org/10.1016/0016-6480(87)90170-5

Moraes, G., Avilez, I. M., Altran, A. E., y Barbosa, C. C. (2002). Biochemical and hematological responses of the banded knife fish Gymnotus carapo (Linnaeus, 1758) exposed to environmental hypoxia. *Brazilian Journal of Biology*, *62*, 633-640. https://doi.org/10.1590/s1519-69842002000400011

Morales, J. M., Moorcroft, P. R., Matthiopoulos, J., Frair, J. L., Kie, J. G., Powell, R. A., Merrill, E. H., y Haydon, D. T. (2010). Building the bridge between animal movement and population dynamics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *365*(1550), 2289-2301. https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0082

Nelson, R. J. (2005). *An introduction to behavioral endocrinology, 3rd ed.* Sinauer Associates.

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

Newman, A. E. M., Zanette, L. Y., Clinchy, M., Goodenough, N., y Soma, K. K. (2013). Stress in the wild: Chronic predator pressure and acute restraint affect plasma DHEA and corticosterone levels in a songbird. *Stress*, *16*(3), 363-367. https://doi.org/10.3109/10253890.2012.723076

Newman, Amy E. M., Pradhan, D. S., y Soma, K. K. (2008). Dehydroepiandrosterone and Corticosterone Are Regulated by Season and Acute Stress in a Wild Songbird: Jugular Versus Brachial Plasma. *Endocrinology*, *149*(5), 2537-2545. https://doi.org/10.1210/en.2007-1363

Nolen, Z. J., Allen, P. E., y Miller, C. W. (2017). Seasonal resource value and male size influence male aggressive interactions in the leaf footed cactus bug, Narnia femorata. *Behavioural Processes*, *138*, 1-6. https://doi.org/10.1016/j.beproc.2017.01.020

O'Connell, L. A., y Hofmann, H. A. (2012). Evolution of a Vertebrate Social Decision-Making Network. *Science*, *336*(6085), 1154. https://doi.org/10.1126/science.1218889

Odreitz, U., y Sefc, K. M. (2015). Territorial competition and the evolutionary loss of sexual size dimorphism. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *69*(4), 593-601. https://doi.org/10.1007/s00265-014-1870-0

Oliveira, R. F. (2004). Social Modulation of Androgens in Vertebrates: Mechanisms and Function. En *Advances in The study of behavior, Vol 34.* (pp. 165-239). Elsevier Academic Press. https://doi.org/10.1016/S0065-3454(04)34005-2

Oliveira, R. F. (2009). Social behavior in context: Hormonal modulation of behavioral plasticity and social competence. *Integrative and Comparative Biology*, *49*(4), 423-440. https://doi.org/10.1093/icb/icp055

Osório, R., Rosa, I. L., y Cabral, H. (2006). Territorial defence by the Brazilian damsel Stegastes fuscus (Teleostei: Pomacentridae). *Journal of Fish Biology*, *69*(1), 233-242. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01095.x

Pasmanik, M., y Callard, G. V. (1985). Aromatase and 5α-reductase in the teleost brain, spinal cord, and pituitary gland. *General and Comparative Endocrinology*, *60*(2), 244-251. https://doi.org/10.1016/0016-6480(85)90320-X

Pedraja, F., Perrone, R., Silva, A., y Budelli, R. (2016). Passive and active electroreception during agonistic encounters in the weakly electric fish Gymnotus omarorum. *Bioinspiration y Biomimetics*, *11*(6), 065002. https://doi.org/10.1088/1748-3190/11/6/065002

Perrone, R., Pedraja, F., Valiño, G., Tassino, B., y Silva, A. (2019). Non-breeding territoriality and the effect of territory size on aggression in the weakly electric fish, Gymnotus omarorum. *Acta Ethologica*, *22*(2), 79-89. https://doi.org/10.1007/s10211-019-00309-7

Perrone, R., y Silva, A. C. (2018). Status-Dependent Vasotocin Modulation of Dominance and Subordination in the Weakly Electric Fish Gymnotus omarorum. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *12*, 1. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00001

Peters, R. (1983). *The ecological implications of body size*. Cambridge University Press. https://scholar.google.com/scholar?hl=enyas_sdt=0%2C5yq=Peters+RH.+1983.+The+ecological+implications+of+body+size.+Cambridge+University+Press%2C+USAybtnG=

Pfaff, D. W., y Joëls, M. (2017). *Hormones, brain and behavior* (3.ª ed.). Academic Press.

Piper, W. H., Mager, J. N., Walcott, C., Furey, L., Banfield, N., Reinke, A., Spilker, F., y Flory, J. A. (2015). Territory settlement in common loons: No footholds but age and assessment are important. *Animal Behaviour*, *104*, 155-163. https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2015.03.013

Pouso, P., Quintana, L., Bolatto, C., y Silva, A. C. (2010). Brain androgen receptor expression correlates with seasonal changes in the behavior of a weakly electric fish, Brachyhypopomus gauderio. *Hormones and Behavior*, *58*(5), 729-736. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.07.005

Pouso, P., Radmilovich, M., y Silva, A. (2017). An immunohistochemical study on the distribution of vasotocin neurons in the brain of two weakly electric fish, Gymnotus omarorum and Brachyhypopomus gauderio. *Tissue and Cell*, *49*(2, Part B), 257-269. https://doi.org/10.1016/j.tice.2017.02.003

Pradhan, Devaleena S, Solomon-Lane, T. K., Willis, M. C., y Grober, M. S. (2014). A mechanism for rapid neurosteroidal regulation of parenting behaviour. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *281*(1786), 20140239.

Pradhan, Devaleena S., Yu, Y., y Soma, K. K. (2008). Rapid estrogen regulation of DHEA metabolism in the male and female songbird brain. *Journal of Neurochemistry*, *104*(1), 244-253. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04953.x

Pradhan, D.S., Connor, K. R., Pritchett, E. M., y Grober, M. S. (2014). Contextual modulation of androgen effects on agonistic interactions. *Hormones and Behavior*, *65*(1), 47-56. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.11.006

Quintana, L., Silva, A., Berois, N., y Macadar, O. (2004). Temperature induces gonadal maturation and affects electrophysiological sexual maturity indicators in Brachyhypopomus

pinnicaudatus from a temperate climate. *Journal of Experimental Biology*, *207*(11), 1843. https://doi.org/10.1242/jeb.00954

Quintana, L., Zubizarreta, L., Jalabert, C., Batista, G., Perrone, R., y Silva, A. (2016). *Building the case for a novel teleost model of non-breeding aggression and its neuroendocrine control*. *110*(3, Part B), 224-232. https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2016.11.009

R Core Team. (2012). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing.

Rege, J., Garber, S., Conley, A. J., Elsey, R. M., Turcu, A. F., Auchus, R. J., y Rainey, W. E. (2019). Circulating 11-oxygenated androgens across species. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *190*, 242-249. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.04.005

Remage-Healey, L., Dong, S. M., Chao, A., y Schlinger, B. A. (2011). Sex-specific, rapid neuroestrogen fluctuations and neurophysiological actions in the songbird auditory forebrain. *Journal of Neurophysiology*, *107*(6), 1621-1631. https://doi.org/10.1152/jn.00749.2011

Remage-Healey, Luke. (2014). Frank Beach Award Winner: Steroids as neuromodulators of brain circuits and behavior. *Hormones and behavior*, *66*(3), 552-560.

Remage-Healey, Luke, y Bass, A. H. (2004). Rapid, Hierarchical Modulation of Vocal Patterning by Steroid Hormones. *The Journal of Neuroscience*, *24*(26), 5892. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1220-04.2004

Remage-Healey, Luke, y Bass, A. H. (2006). From social behavior to neural circuitry: Steroid hormones rapidly modulate advertisement calling via a vocal pattern generator. *Hormones and Behavior*, *50*(3), 432-441. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2006.05.007

Remage-Healey, Luke, Coleman, M. J., Oyama, R. K., y Schlinger, B. A. (2010). Brain estrogens rapidly strengthen auditory encoding and guide song preference in a songbird.

Proceedings of the National Academy of Sciences, *107*(8), 3852. https://doi.org/10.1073/pnas.0906572107

Remage-Healey, Luke, Dong, S., Maidment, N. T., y Schlinger, B. A. (2011). Presynaptic Control of Rapid Estrogen Fluctuations in the Songbird Auditory Forebrain. *The Journal of Neuroscience*, *31*(27), 10034. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0566-11.2011

Remage-Healey, Luke, Maidment, N. T., y Schlinger, B. A. (2008). Forebrain steroid levels fluctuate rapidly during social interactions. *Nature Neuroscience*, *11*(11), 1327-1334. https://doi.org/10.1038/nn.2200

Rendon, N. M., Amez, A. C., Proffitt, M. R., Bauserman, E. R., y Demas, G. E. (2017). Aggressive behaviours track transitions in seasonal phenotypes of female Siberian hamsters. *Functional Ecology*, *31*(5), 1071-1081. https://doi.org/10.1111/1365-2435.12816

Rendon, N. M., Rudolph, L. M., Sengelaub, D. R., y Demas, G. E. (2015). The agonistic adrenal: Melatonin elicits female aggression via regulation of adrenal androgens. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *282*(1819), 20152080. https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2080

Renn, S. C. P., Fraser, E. J., Aubin-Horth, N., Trainor, B. C., y Hofmann, H. A. (2012). Females of an African cichlid fish display male-typical social dominance behavior and elevated androgens in the absence of males. *Hormones and Behavior*, *61*(4), 496-503. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.01.006

Richer-de-Forges, M. M., Crampton, W. G. R., y Albert, J. S. (2009). A New Species of Gymnotus (Gymnotiformes, Gymnotidae) from Uruguay: Description of a Model Species in Neurophysiological Research. *Copeia*, *2009*(3), 538-544. JSTOR.

Ros, A. F. H., Vullioud, P., Bruintjes, R., Vallat, A., y Bshary, R. (2014). Intra- and interspecific challenges modulate cortisol but not androgen levels in a year-round territorial

damselfish. *The Journal of Experimental Biology*, *217*(10), 1768. https://doi.org/10.1242/jeb.093666

Rosvall, K. A., Bergeon Burns, C. M., Barske, J., Goodson, J. L., Schlinger, B. A., Sengelaub, D. R., y Ketterson, E. D. (2012). Neural sensitivity to sex steroids predicts individual differences in aggression: Implications for behavioural evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *279*(1742), 3547-3555. https://doi.org/10.1098/rspb.2012.0442

Rosvall, Kimberly A. (2011). Intrasexual competition in females: Evidence for sexual selection? *Behavioral Ecology*, *22*(6), 1131-1140. https://doi.org/10.1093/beheco/arr106

Rosvall, Kimberly A. (2013). Proximate perspectives on the evolution of female aggression: Good for the gander, good for the goose? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *368*(1631), 20130083. https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0083

Rosvall, Kimberly A., Bentz, A. B., y George, E. M. (2019). How research on female vertebrates contributes to an expanded challenge hypothesis. *Hormones and Behavior*, 104565. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2019.104565

Rubenstein, D. R., y Alcock, J. (2018). *Animal Behavior* (11.ª ed.). Oxford University Press.

Rubenstein, D. R., y Wikelski, M. (2005). Steroid hormones and aggression in female Galápagos marine iguanas. *Hormones and Behavior*, *48*(3), 329-341. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.04.006

Salazar, V. L., y Stoddard, P. K. (2008). Sex differences in energetic costs explain sexual dimorphism in the circadian rhythm modulation of the electrocommunication signal of the gymnotiform fish Brachyhypopomus pinnicaudatus. *Journal of Experimental Biology*, *211*(6), 1012. https://doi.org/10.1242/jeb.014795

Scaia, M. F., Morandini, L., Noguera, C., Trudeau, V. L., Somoza, G. M., y Pandolfi, M. (2018). Can estrogens be considered as key elements of the challenge hypothesis? The case of

intrasexual aggression in a cichlid fish. *Physiology y Behavior*, *194*, 481-490. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.06.028

Schlinger, B. A. (2015). Steroids in the avian brain: Heterogeneity across space and time. *Journal of Ornithology*, *156*(1), 419-424. https://doi.org/10.1007/s10336-015-1184-7

Schlinger, B. A., y Callard, G. V. (1990). Aromatization mediates aggressive behavior in quail. *General and Comparative Endocrinology*, *79*(1), 39-53. https://doi.org/10.1016/0016-6480(90)90086-2

Schlinger, B. A., Remage-Healey, L., y Rensel, M. (2014). Establishing regional specificity of neuroestrogen action. *General and comparative endocrinology*, *205*, 235-241.

Schulz, R., y Blüm, V. (1991). Extragonadal 17β-hydroxysteroid dehydrogenase activity in rainbow trout. *General and comparative endocrinology*, *82*(2), 197-205.

Scotti, M.-A. L., Place, N. J., y Demas, G. E. (2007). Short-day increases in aggression are independent of circulating gonadal steroids in female Siberian hamsters (Phodopus sungorus). *Hormones and Behavior*, *52*(2), 183-190. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.03.029

Shuster, S. M., y Wade, M. J. (2003). *Mating systems and strategies* (Vol. 61). Princeton University Press.

Silva, A. C., Perrone, R., Zubizarreta, L., Batista, G., y 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*(13), 2412. https://doi.org/10.1242/jeb.082180

Silva, A. C., Zubizarreta, L., y Quintana, L. (2020). A Teleost Fish Model to Understand Hormonal Mechanisms of Non-breeding Territorial Behavior. *Frontiers in Endocrinology*, *11*, 468. https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00468

Silva, A., Perrone, R., y Macadar, O. (2007). Environmental, seasonal, and social modulations of basal activity in a weakly electric fish. *Includes a Special Section on Chronobiology Aspects of the Sleep--Wake Cycle and Thermoreregulation*, *90*(2), 525-536. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.11.003

Silva, A., Quintana, L., Galeano, M., y Errandonea, P. (2003). Biogeography and Breeding in Gymnotiformes from Uruguay. *Environmental Biology of Fishes*, *66*(4), 329-338. https://doi.org/10.1023/A:1023986600069

Simon, N. G., y Lu, S.-F. (2006). Androgens and aggression. En *Biology of aggression* (pp. 211-230). Oxford University Press, USA.

Sink, T. D., Lochmann, R. T., y Fecteau, K. A. (2008). Validation, use, and disadvantages of enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of cortisol in channel catfish, largemouth bass, red pacu, and golden shiners. *Fish Physiology and Biochemistry*, *34*(1), 95-101. https://doi.org/10.1007/s10695-007-9150-9

Smiley, K. O., Ladyman, S. R., Gustafson, P., Grattan, D. R., y Brown, R. S. (2019). Neuroendocrinology and Adaptive Physiology of Maternal Care. *Neuroendocrine Regulation of Behavior*, 161-210.

Smith, D. C. (1985). Home range and territory in the striped plateau lizard (Sceloporus virgatus). *Animal Behaviour*, *33*(2), 417-427. https://doi.org/10.1016/S0003-3472(85)80066-X

Smith, J. M., y Parker, G. A. (1976). The logic of asymmetric contests. *Animal Behaviour*, *24*(1), 159-175. https://doi.org/10.1016/S0003-3472(76)80110-8

Soma, K. (2006). Testosterone and aggression: Berthold, birds and beyond. *Journal of neuroendocrinology*, *18*(7), 543-551.

Soma, K. K., Tramontin, A. D., y Wingfield, J. C. (2000). Oestrogen regulates male aggression in the non–breeding season. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *267*(1448), 1089-1096. https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1113

Soma, Kiran K., Rendon, N. M., Boonstra, R., Albers, H. E., y Demas, G. E. (2015). DHEA effects on brain and behavior: Insights from comparative studies of aggression. *DHEA (dehydroepiandrosterone) and sex steroid formation (intracrinology)*, *145*, 261-272. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.05.011

Soma, Kiran K., Scotti, M.-A. L., Newman, A. E. M., Charlier, T. D., y Demas, G. E. (2008). Novel mechanisms for neuroendocrine regulation of aggression. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *29*(4), 476-489. https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.12.003

Soma, Kiran K, Sullivan, K. A., Tramontin, A. D., Saldanha, C. J., Schlinger, B. A., y Wingfield, J. C. (2000). Acute and chronic effects of an aromatase inhibitor on territorial aggression in breeding and nonbreeding male song sparrows. *Journal of Comparative Physiology A*, *186*(7-8), 759-769.

Soma, Kiran K., Sullivan, K., y 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*(3), 442-453. https://doi.org/10.1006/gcen.1999.7334

Soma, Kiran K., y Wingfield, J. C. (2001). Dehydroepiandrosterone in Songbird Plasma: Seasonal Regulation and Relationship to Territorial Aggression. *General and Comparative Endocrinology*, *123*(2), 144-155. https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7657

Soma, M., Kim, J., Kato, A., y Kawato, S. (2018). Src Kinase Dependent Rapid Non-genomic Modulation of Hippocampal Spinogenesis Induced by Androgen and Estrogen. *Frontiers in Neuroscience*, *12*, 282. https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00282

Taves, M. D., Schmidt, K. L., Ruhr, I. M., Kapusta, K., Prior, N. H., y Soma, K. K. (2010). Steroid concentrations in plasma, whole blood and brain: Effects of saline perfusion to remove blood contamination from brain. *PLoS One*, *5*(12), e15727.

Thomas, C. D., y Kunin, W. E. (1999). The spatial structure of populations. *Journal of Animal Ecology*, *68*(4), 647-657. https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.1999.00330.x

Tobiansky, D. J., Korol, A. M., Ma, C., Hamden, J. E., Jalabert, C., Tomm, R. J., y Soma, K. K. (2017). Testosterone and Corticosterone in the Mesocorticolimbic System of Male Rats: Effects of Gonadectomy and Caloric Restriction. *Endocrinology*, *159*(1), 450-464. https://doi.org/10.1210/en.2017-00704

Tobias, J. A., Gamarra-Toledo, V., García-Olaechea, D., Pulgarín, P. C., y Seddon, N. (2011). Year-round resource defence and the evolution of male and female song in suboscine birds: Social armaments are mutual ornaments. *Journal of Evolutionary Biology*, *24*(10), 2118-2138. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02345.x

Tobias, Joseph A., Montgomerie, R., y Lyon, B. E. (2012). The evolution of female ornaments and weaponry: Social selection, sexual selection and ecological competition. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *367*(1600), 2274-2293. https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0280

Trainor, B. C., Kyomen, H. H., y Marler, C. A. (2006). Estrogenic encounters: How interactions between aromatase and the environment modulate aggression. *Frontiers in neuroendocrinology*, *27*(2), 170-179. https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2005.11.001

Trainor, B. C., Lin, S., Finy*, M. S., Rowland, M. R., y 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*(23), 9840. https://doi.org/10.1073/pnas.0701819104

Trainor, B. C., Sima Finy, M., y Nelson, R. J. (2008). Rapid effects of estradiol on male aggression depend on photoperiod in reproductively non-responsive mice. *Hormones and Behavior*, *53*(1), 192-199. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.09.016

Trivers, R. L. (1996). *Parental investment and sexual selection.*

Trujillo-Cenóz, O., Echagüe, J. A., y Macadar, O. (1984). Innervation pattern and electric organ discharge waveform in Gymnotus carapo (Teleostei; Gymnotiformes). *Journal of Neurobiology*, *15*(4), 273-281. https://doi.org/10.1002/neu.480150404

Tuscher, J. J., Luine, V., Frankfurt, M., y Frick, K. M. (2016). Estradiol-mediated spine changes in the dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex of ovariectomized female mice depend on ERK and mTOR activation in the dorsal hippocampus. *Journal of Neuroscience*, *36*(5), 1483-1489.

Violle, C., Enquist, B. J., McGill, B. J., Jiang, L., Albert, C. H., Hulshof, C., Jung, V., y Messier, J. (2012). The return of the variance: Intraspecific variability in community ecology. *Trends in Ecology y Evolution*, *27*(4), 244-252. https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.11.014

Vitousek, M. N., Johnson, M. A., Donald, J. W., Francis, C. D., Fuxjager, M. J., Goymann, W., Hau, M., Husak, J. F., Kircher, B. K., y Knapp, R. (2018). HormoneBase, a population-level database of steroid hormone levels across vertebrates. *Scientific data*, *5*, 180097.

Vullioud, P., Bshary, R., y 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*(3), 430-438. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.06.007

Wauters, L., y Dhondt, A. A. (1992). Spacing behaviour of red squirrels, Sciurus vulgaris: Variation between habitats and the sexes. *Animal Behaviour*, *43*(2), 297-311. https://doi.org/10.1016/S0003-3472(05)80225-8

Wei, R., Wang, J., Su, M., Jia, E., Chen, S., Chen, T., y Ni, Y. (2018). Missing value imputation approach for mass spectrometry-based metabolomics data. *Scientific reports*, *8*(1), 1-10.

West-Eberhard, M. J. (1983). Sexual Selection, Social Competition, and Speciation. *The Quarterly Review of Biology*, *58*(2), 155-183. https://doi.org/10.1086/413215

White, E. P., Ernest, S. K. M., Kerkhoff, A. J., y Enquist, B. J. (2007). Relationships between body size and abundance in ecology. *Trends in Ecology y Evolution*, *22*(6), 323-330. https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.03.007

Whittingham, L. A., Kirkconnell, A., y Ratcliffe, L. M. (1992). Differences in Song and Sexual Dimorphism between Cuban and North American Red-Winged Blackbirds (Agelaius phoeniceus). *The Auk*, *109*(4), 928-933. https://doi.org/10.2307/4088178

Wingfield, J. C., y Hahn, T. P. (1994). Testosterone and territorial behaviour in sedentary and migratory sparrows. *Animal Behaviour*, *47*(1), 77-89. https://doi.org/10.1006/anbe.1994.1009

Wingfield, J. C., Hegner, R. E., Dufty, Alfred M., y Ball, G. F. (1990). The «Challenge Hypothesis»: Theoretical Implications for Patterns of Testosterone Secretion, Mating Systems, and Breeding Strategies. *The American Naturalist*, *136*(6), 829-846. https://doi.org/10.1086/285134

Wingfield, J. C., y Monk, D. (1994). Behavioral and Hormonal Responses of Male Song Sparrows to Estradiol-Treated Females during the Non-breeding Season. *Hormones and Behavior*, *28*(2), 146-154. https://doi.org/10.1006/hbeh.1994.1012

Woodley, S. K., y Moore, M. C. (1999). Ovarian Hormones Influence Territorial Aggression in Free-Living Female Mountain Spiny Lizards. *Hormones and Behavior*, *35*(3), 205-214. https://doi.org/10.1006/hbeh.1999.1514

Woodward, G., Ebenman, B., Emmerson, M., Montoya, J. M., Olesen, J. M., Valido, A., y Warren, P. H. (2005). Body size in ecological networks. *Trends in Ecology y Evolution*, *20*(7), 402-409. https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.04.005

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

Wudy, S. A., Schuler, G., Sánchez-Guijo, A., y Hartmann, M. F. (2018). The art of measuring steroids: Principles and practice of current hormonal steroid analysis. *Sulfated Steroids in Reproduction*, *179*, 88-103. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.09.003

Yoder, K. M., y Vicario, D. S. (2012). To modulate and be modulated: Estrogenic influences on auditory processing of communication signals within a socio-neuro-endocrine framework. *Behavioral neuroscience*, *126*(1), 17.

Zubizarreta, L., Quintana, L., Hernández, D., Teixeira de Mello, F., Meerhoff, M., Massaaki Honji, R., Guimarães Moreira, R., y Silva, A. (2020). Seasonal and social factors associated with spacing in a wild territorial electric fish. *PLOS ONE*, *15*(6), e0228976. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228976

Zubizarreta, L., Silva, A. C., y Quintana, L. (2020). The estrogenic pathway modulates non-breeding female aggression in a teleost fish. *Physiology y Behavior*, *220*, 112883. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.112883

Zubizarreta, L., Stoddard, P. K., y Silva, A. (2015a). Aggression Levels Affect Social Interaction in the Non-Breeding Territorial Aggression of the Weakly Electric Fish, Gymnotus omarorum. *Ethology*, *121*(1), 8-16. https://doi.org/10.1111/eth.12299

Zubizarreta, L., Stoddard, P. K., y Silva, A. (2015b). Aggression Levels Affect Social Interaction in the Non-Breeding Territorial Aggression of the Weakly Electric Fish, Gymnotus omarorum. *Ethology*, *121*(1), 8-16. https://doi.org/10.1111/eth.12299

Zuur, A., Ieno, E. N., y Smith, G. M. (2007). *Analyzing Ecological Data*. Springer.

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Seasonal and social factors associated with spacing in a wild territorial electric fish

Lucía Zubizarreta[1,2], Laura Quintana[2], Daniel Hernández[3], Franco Teixeira de Mello[4], Mariana Meerhoff[4,5], Renato Massaaki Honji[6], Renata Guimarães Moreira[7], Ana Silva[2,8]*

1 Laboratorio de Neurofisiología Celular y Sináptica, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, **2** Unidad Bases Neurales de la Conducta, Departamento de Neurofisiología Celular y Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay, **3** Laboratorio de Control Ambiental, Polo Educativo Tecnológico Arrayanes, CETP-UTU, Maldonado, Uruguay, **4** Departamento de Ecología y Gestión Ambiental, Centro Universitario Regional del Este, Universidad de la República, Maldonado, Uruguay, **5** Department of BioScience, Aarhus University, Silkeborg, Denmark, **6** Centro de Biologia Marinha, Rodovia Manoel Hipólito do Rego, Universidade de São Paulo (CEBIMar/USP), São Sebastião, SP, Brazil, **7** Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão, São Paulo, SP, Brazil, **8** Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

* asilva@fcien.edu.uy

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Zubizarreta L, Quintana L, Hernández D, Teixeira de Mello F, Meerhoff M, Massaaki Honji R, et al. (2020) Seasonal and social factors associated with spacing in a wild territorial electric fish. PLoS ONE 15(6): e0228976. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228976

Editor: Melissa J. Coleman, Claremont Colleges, UNITED STATES

Received: January 24, 2020

Accepted: May 22, 2020

Published: June 15, 2020

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228976

Copyright: © 2020 Zubizarreta et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Raw data are available from the https://osf.io/dashboard database Seasonal and social factors associated

Abstract

In this study, we focused on the seasonal variation of the determinants of territory size in the weakly electric fish *Gymnotus omarorum*. This species is a seasonal breeder that displays year-round territorial aggression. Female and male dyads exhibit indistinguishable non-breeding territorial agonistic behavior and body size is the only significant predictor of contest outcome. We conducted field surveys across seasons that included the identification of individual location, measurements of water physico-chemical variables, characterization of individual morphometric and physiological traits, and their correlation to spatial distribution. *G. omarorum* tolerates a wide range of dissolved oxygen concentration, and territory size correlated positively with dissolved oxygen in both seasons. In the non-breeding season, territory size was sexually monomorphic and correlated only with body size. In the breeding season, territory size no longer correlated with body size but differed between sexes: (i) the overall spatial arrangement was sexually biased, (ii) territory size depended on gonadal hormones in both sexes, which was expected for males, but not previously reported in females, (iii) female territory size showed a positive relationship with gonadal size, and (iv) females showed relatively larger territories than males. This study demonstrates seasonal changes in the determinants of territory size and thus contributes to the understanding of the mechanisms underlying the behavioral plasticity natural territorial behavior.

Introduction

The mechanisms underlying behavioral plasticity, by which animals respond to dynamic environmental and social contexts, are not fully understood [1]. The study of the modulation of territorial behavior in wild species is especially suited for this aim. In territorial behavior, animals first detect the environmental and social clues that determine territory quality, then

with spacing in a wild territorial electric fish (DOI 10.17605/OSF.IO/65D8A).

Funding: This research was funded by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Fondo Clemente Estable grants to AS (ANII_FCE_6180; FCE_4272) and LQ (ANII_FCE_136381). Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas gave support to LZ, MM, FTM, LQ and AS and Universidad de la República gave support to AS, MM and FTM.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

compare this information to their individual requirements and fighting abilities, and finally decide whether to compete over an area. Therefore, the distribution of territorial animals in space provides insights into how animals integrate individual traits with environmental and social factors. Variation in the ability or motivation to obtain and defend a territory can generate differences in territory size because traits such as body mass, sex, and reproductive state are known to influence resource holding potential and resource value [2–6]. Within a population, body size is associated with territory size in most species, as it directly determines metabolic requirements. Moreover, body size strongly impacts contest outcome and territory size [7–10]. In species that display territoriality in both sexes, asymmetries in fighting abilities and motivational factors may cause sex differences in territory size. For example, in red squirrels (*Sciurus vulgaris*), males often hold larger territories than females although this species is sexually monomorphic in body size [11]. In stripped plateau lizards (*Sceloporus virgatus*), females are more territorial than males for motivational reasons [12].

Many species show territorial behavior only during the breeding season [13]. On the other hand, some species show robust territorial aggression all year round even though they are seasonal breeders. Non-breeding territoriality is found in diverse taxa, including birds [14–17], mammals [18–20], reptiles [21], and fish [22,23]. These species offer a valuable opportunity to study the seasonality of environmental features and individual traits, and their relation to territory size in the natural habitat. During the breeding season, male territorial aggression depends largely on gonadal steroids across vertebrates [24–26] and, in particular, androgen levels have been related to territory size in the wild [27–30]. By contrast, in breeding females, there are few studies on the association between circulating estrogen (E_2) levels and territorial aggression in free-living conditions [31–33], and, to our knowledge, there are no studies reporting the association between circulating E_2 and territory size.

The South American weakly electric fish, *Gymnotus omarorum* [34], is a seasonal breeder that displays male and female territorial aggression all year and thus is an interesting model system to study the seasonal control of territoriality and its sex differences [35]. Previous laboratory results showed that this species presents a remarkably robust non-breeding territorial aggression (described initially in [22]). In these well-characterized agonistic behavioral displays, fish modulate their electric organ discharge (EOD) to signal a submissive [36–38] or dominant status that persists for at least 36 hours [39]. Under experimental laboratory conditions, male-male [40] and female-female [41] dyads that display non-breeding territorial behavior have no differences in contest outcome, temporal dynamics of the agonistic encounter, levels of aggression, or submissive signaling [35]. Moreover, the only significant predictor of contest outcome is body size [22], and none of the features of agonistic encounters depend on circulating gonadal hormones [40].

In this study, we evaluated seasonal variations in the ecological, morphometric, and physiological correlates of territory size in free-living *Gymnotus omarorum*. Based on previous results, we predicted that, in the non-breeding season when gonads are regressed and circulating gonadal hormones are low, territory size would be sexually monomorphic and explained mostly by body size. For fish in the breeding season, when motivational aspects of territoriality may be confounded with the reproductive drive, we expected territory size and/or its determinants to be sexually dimorphic.

Materials and methods

Study location and sampling seasons

Fieldwork was performed in the Laguna de los Cisnes, Uruguay (205 ha, 34˚ 48′ S, 55˚ 18′ W), which consists of a three-part interconnected shallow system of freshwater (maximum depth 5

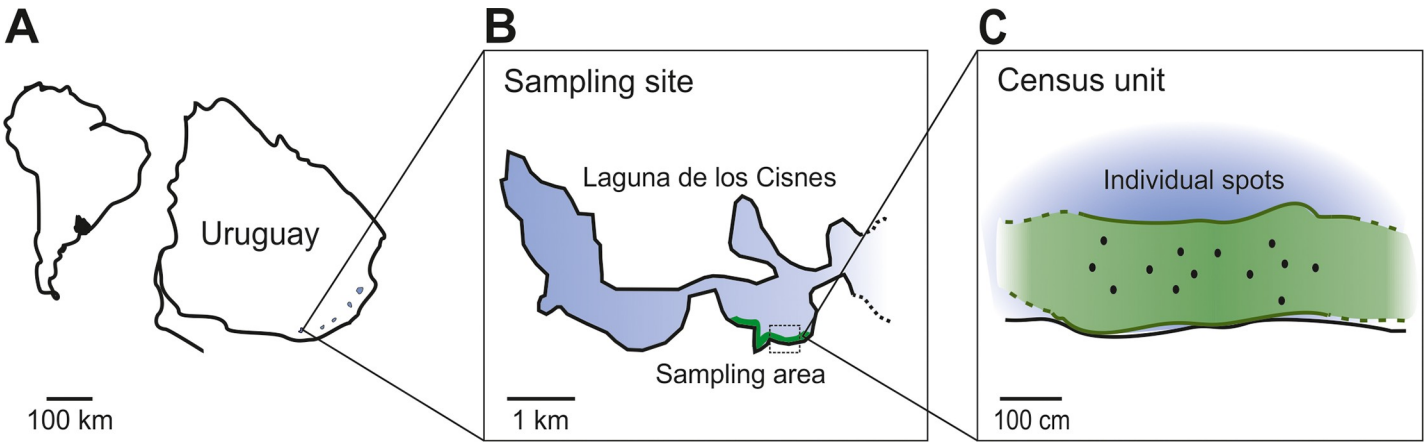

Fig 1. Study site and sampling method. A. The study site is located in Maldonado, Uruguay, in Laguna de los Cisnes. B. The shores of the lake have water hyacinths creating extensive floating mats that constitute the sampling area. C. Census unit illustrating individual spots. Fish location in individual spots was achieved by carrying out an electric census (Survey 1). Once a fish was located, water dissolved O_2 concentration, temperature, and fish EOD rate were measured in each spot. In Survey 2, individual spots were revisited in sequence, fish were collected, and individual traits measured.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228976.g001

m) with no inputs of salt or brackish water (Fig 1A, [42]). The study species, *Gymnotus omarorum*, is the sole species of weakly electric fish present in the study area. The littoral area of the lake is blanketed by a dense strip (5–40 m width) of free-floating aquatic macrophytes that cover the sampling area (Fig 1B), with *G. omarorum* typically resting among the roots of these plants [34].

Following Quintana et al. (2004), who identified the breeding season for weakly electric fish species in this region from December to February (austral summer), we collected field data during December, corresponding to the early-breeding season before the appearance of offspring [43], and from June to August (austral winter), corresponding to the non-breeding season.

Sampling

Sampling area was homogeneous in depth, distance to shore, and vegetation composition. The sampling area was divided into adjacent areas referred to as census units (Fig 1B and 1C, defined below), which were each studied on different days, without repeating sites. Sampling was performed during the day, which is the resting phase in this species [44], in two periods: the first one (Survey 1) during the morning (0800-1200h), and the second one (Survey 2) in the afternoon (1300-1800h).

All research procedures complied with ASAP/ABS Guidelines for the Use of Animals in Research and were approved by the Institutional Ethical Committee (Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Comisión Honoraria de Experimentación Animal, Exp: 240011-002308-14).

Field survey 1: Electric census and environmental variables

To achieve an initial estimate of the spatial arrangement of individuals, we performed an electric census during the resting phase of the animals and measured the distance between each fish and its nearest neighbor (distance to the nearest neighbor, DNN) in the two seasons. To calculate DNN, we considered each focal fish distance to the nearest neighbor. DNN was used as a proxy of territory size. Although this is a simplified approach, animals which present territorial aggression display a decrease in defense as distance increases from center points (10,

reviewed in [45]). This study was carried out during the resting phase of *G. omarorum* and fish have been shown to display site fidelity, which suggests they are located in the central parts of their territory. We performed the electric census by locating individual fish by means of an audio amplifier connected to a pair of electrodes, as described elsewhere [46] and individual fish were localized by their EODs when the sound is maximal (detection range is 60 cm). Monitoring the EOD rate allowed us to confirm that fish remain undisturbed during the measurement of parameters since EOD rate increases transiently when fish are alerted by novel stimuli (reviewed in [47]). To perform the electric census, two experienced researchers waded up to 1.2 m depth in the water, to slowly and carefully access areas 1 m away from individual fish. Once a fish was located in an individual spot, the plant above it was tagged (Fig 1C). Water conductivity, dissolved oxygen concentration (O_2, mg/l) and temperature (T,˚C) were measured 30 cm below the surface (using TDSu Testr 3, Cole Parmer for conductivity, and Oxy-Ward, Handy Polaris for O_2 and T). After taking physico-chemical measurements, the EOD of each fish was recorded *in situ* for 10 s through two electrodes lowered into the vicinity of the animal and connected to an amplifier located on the shore of the lake (World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL. DAM-50, AC-coupled). After amplification, EOD signals were recorded on a portable computer, captured by the audio card, and stored for further analysis. To normalize the potential effect of water temperature on EOD rate, values were corrected to a constant 20˚C using the Q10 value of 1.5 as calculated for electric fish, from the equation: Q10 = EOD rate x T / EOD rate x (T + 10) [48,49].

During each sampling day, the measurement of physico-chemical water parameters and EOD rate was conducted for all the fish located within a census unit. A census unit was defined as the area with all fish detected by 12 AM, or the area where we detected a group of fish surrounded by at least 6 m of water uninhabited by the species (Fig 1C). Field survey 1 was performed both, during the breeding and non-breeding seasons.

Field survey 2: Quantification of individual traits

In addition to environmental variables, individual morphological and physiological traits can influence spatial distribution and vary seasonally. Therefore, based on Survey 1, we characterized individual traits of captured fish in both seasons, and then analyzed their correlation with spatial distribution. Individual spots were revisited in sequence, and each fish located under the tagged plants was collected using a net, without disturbing nearby tagged sites. Netting desorganize plants, thus if the first netting was unsuccessful no other attempts were made in that site and fish was reported as "not recovered". Fish were weighed, measured for length, sacrificed by quick decapitation and their gonads were visually inspected for sex determination. In the breeding season, fish were anesthetized immediately after netting by immersion in a fast-acting eugenol solution (1.2 mg/l, first dissolved in alcohol 70%) and blood was collected from the caudal vein with a heparinized syringe within 3 min of capture, which is the time range usually used to avoid a stress response due to manipulation [50–52]. Blood was placed in tubes on ice in the field and later centrifuged (3000rpm, 10 min) in the laboratory and stored at -80˚C. Dissected gonads were stored in dry ice in the field, and then weighed in the laboratory for gonadosomatic index (GSI) calculation ([Gonad Weight / Total Tissue Weight] x 100 [53]).

Hormone assays

17-β Estradiol (E_2) levels were quantified in breeding females, and 11-Ketotestosterone (11-KT) in breeding males by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using commercial kits (IBL International, Hamburg, Germany for E_2 and Cayman Chemical Company, MI,

USA for 11-KT). The analyses were performed according to the manufacturer's instructions and a standard curve was run for each ELISA plate. In all cases, samples were assayed in duplicate and analyses were performed on samples whose coefficients of variation were below 20% [54]. Intra-assay variation was 3.95% for E_2 (detection limit: 25 pg/ml) and 6.2% for 11-KT (detection limit: 1.56 pg/ml). Pilot assays using three different dilutions of 8 samples (4 samples per sex) were performed to establish the appropriate working dilutions, which were 1:2 for breeding female E_2 and 1:30 for breeding male 11-KT. The assays were validated with standards provided in the kit, indicating that each assay effectively detects *G. omarorum* E_2 and 11-KT.

Data analysis and statistics

All data were subjected first to D'Agostino & Pearson normality test. If data fit a Gaussian distribution, they were analyzed with parametric tests; otherwise non-parametric comparisons were used. Parametric, non-parametric statistical analyses, and simple linear regressions were carried out with PAST [55], and generalized linear models (GLMs) and Binomial tests with software R [56] using RStudio interface.

Data analysis was performed in three steps. The first step of analysis used data from Survey 1 to explore environmental heterogeneity. Environmental variables (O_2 and T) were compared between seasons by Mann-Whitney *U* test. To analyze O_2 and T heterogeneity we calculated the coefficient of variation (CV, SD/mean*100) for each census unit and then the mean CV and standard deviation per season. Finally, we performed a linear regression between two individual traits, DNNs and EOD basal rate, and O_2 content, both in the breeding and non-breeding seasons (Fig 2).

The second step of the analysis was based on the dataset obtained in Survey 2, which entailed fish collection. We explored whether individual morphometric and physiological traits correlated with DNN in both the non-breeding and breeding seasons. Individual traits (body size and EOD rate), DNN, and DNN relative to body length were compared between sexes within each season by Student t-tests (Table 1). Because body weight and body length were strongly correlated (R = 0.91, N = 47), and because we had more measurements of body length than of body weight, we used body length as an indicator of body size throughout. Body length, EOD rate, and DNN were compared seasonally by Student t-test for females and males together.

To examine the effects of individual traits (see below) on DNN as the dependent variable, weused GLMs; [57], within each season analyzed separately. For the breeding season, we first ran a model with body length, EOD rate, and sex as explanatory variables. Because the initial model was non-significant, we ran one model for females with body length, EOD rate, and circulating E_2 as explanatory variables, and a second model for males with body length and EOD rate as explanatory variables (Table 2). For the non-breeding season, the model included females and males together, and the explanatory variables were body length, EOD rate, and sex (Table 3). For each season separately, initial models contained all single effects and pairwise interactions of the explanatory variables.

To select the most parsimonious GLM, we used the command bestglm [58] for a maximum of three simultaneous variables, and considered up to second order interactions. Initial models were simplified by the stepwise deletion of the least significant terms in a model and compared successive steps of model simplification by the Akaike information criterion (AIC), deleting a term whenever there was a difference of more than two units between alternative models until arriving to the most parsimonious model that could be fitted. The selection of the best model included the AIC criterion as well as the number and statistical significance of the estimated

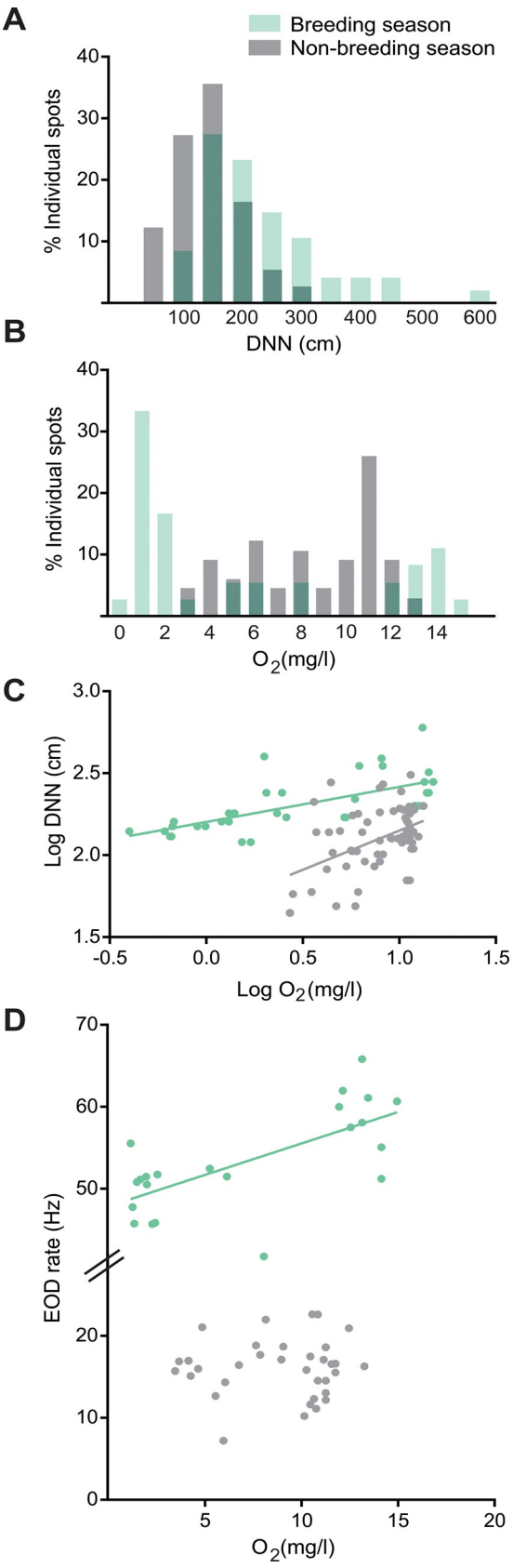
A
Breeding season
Non-breeding season
% Individual spots
DNN (cm)
B
% Individual spots
O_2(mg/l)
C
Log DNN (cm)
Log O_2(mg/l)
D
EOD rate (Hz)
O_2(mg/l)

Fig 2. Fish spatial distribution based on environmental variables (Survey 1). The breeding season is represented in green and the non-breeding season in gray; dark green sections implies overlap of both seasons. A. Frequency distribution versus DNN(in cm). B. Frequency distribution versus O_2 concentration (in mg/l) measured at 30 cm from the surface in each individual spot. C. Linear regression of DNN and O_2 concentration in individual spots (Log transformed). Breeding season: $R^2 = 0.44$, p = 1 exp -4, N = 35; non-breeding season: $R^2 = 0.21$, p = 1 exp-4, N = 50. D. Linear regression of EOD rate and water oxygen concentration in individual spots. Breeding season: $R^2 = 0.47$, p = 5 exp-4, N = 22; non-breeding season: $R^2 = 1$ exp-3, p = 0.54, N = 39.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228976.g002

parameters, discarding models with improvements in the AIC but non-significant parameters. All models were subjected to the customary residual analysis [59].

The final step of analysis aimed to address three points. The first point was to further evaluate how sexually dimorphic traits, such as gonad size and sexual hormones, impacted on DNN particularly during breeding (Fig 3). To do this, we compared DNN relative to body size between non-breeding and breeding season separately for each sex. In addition, to analyze the relative importance of gonadal mass on individual spacing, we performed linear regressions of DNN versus GSI, and body weight–gonad weight, both in breeding females and males. The second point was to analyze whether oxygen concentration, besides affecting DNN, showed association with morphological (GSI) and physiological individual traits (EOD rate and E_2 levels). The third point was to evaluate whether the sex of the nearest neighbor differed from an expected random distribution, and for that we used Binomial tests [60]. For the analysis, the focal fish was only considered if the nearest neighbor was captured and its sex confirmed. The proportion of sexes expected for a random distribution was deduced from the empirical sex ratio observed in each season (Fig 4).

Results

In both seasons, individual *Gymnotus omarorum* were typically located in water depths of ~ 30 cm among the dense roots of extensive floating mats of vegetation along the littoral area across seasons (Fig 1B; i.e., in the breeding season during the austral summer, and in the non-breeding season during the austral winter). The free-floating water hyacinth *Eichhornia crassipes* dominated both surface and underwater areas accounting for 86% of the total subaquatic biomass. Associated vegetation was composed of submerged *Egeria densa* and *Miriophyllum aquaticum*, free-floating *Salvinia auriculata*, and the rooted but partly emergent *Ludwigia elegans*, and *Hydrocotyle criptocarpa*. This vegetation, with the same composition, was present all year, although overall coverage was lower during the non-breeding season.

As expected in the subtropical region, water temperature and oxygen concentration showed significant differences across seasons. Water temperature was higher during the breeding than during the non-breeding season (27.3 ± 0.1˚C, N = 36 vs 11.3 ± 0.5˚C, N = 60; p = 1 exp-4,

Table 1. Sexual comparison of individual traits and DNN in the breeding season and in the non-breeding season (Survey 2). Individual traits: Body length and EOD rate corrected by water temperature. Distance to the nearest neighbor (DNN in cm), and relative DNN (DNN/body length). Values are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM), and statistical comparisons were performed by t-test.

	Body size (cm)		EOD rate $_{temp}$		DNN (cm)		DNN / body length	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
A- Breeding season	22.4 ± 0.5 n = 13	24.5 ± 0.9 n = 15	41.0 ± 1.1 n = 13	39.3 ± 0.9 n = 17	220 ± 20 n = 13	230 ± 30 n = 18	9.8 ± 0.8 n = 13	9.9 ± 1.4 n = 17
	♀ vs ♂ p = 0.2		♀ vs ♂ p = 0.3		♀ vs ♂ p = 0.8		♀ vs ♂ p = 0.9	
B- Non-breeding season	16.9 ± 0.9 n = 26	17.4 ± 0.8 n = 27	20.0 ± 1.2 n = 18	19.3 ± 0.95 n = 18	113 ± 10 n = 23	120 ± 10 n = 23	7.0 ± 0.6 n = 23	7.8 ± 0.7 n = 23
	♀ vs ♂ p = 0.7		♀ vs ♂ p = 0.6		♀ vs ♂ p = 0.5		♀ vs ♂ p = 0.4	

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228976.t001

Table 2. GLM models that presented the best adjustment to explain DNN in females during the breeding season with data obtained in Survey 2. Model intercept and explanatory variables are expressed as Mean (SD). For each parameter, the value is shown in bold if statistically significant ($p<0.05$), in italic if marginal ($p<0.1$), and expressed as NS if non-significant. Model 1 and Model 2 did not present significant differences by the Akaike information criterion (AIC).

Model	Intercept	Circulating E_2	EOD rate	N	P model	Adjusted R2	AIC
M1	**452** (141)	**0.14** (0.03)	*-0.51* (2.7)	13	0.02	0.44	20.24
M2	**188** (18)	**0.1** (0.04)	NS	13	0.03	0.31	22.21

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228976.t002

Mann Whitney *U* test), whereas O_2 concentration was significantly lower in the breeding compared to the non-breeding season (5.6 ± 0.9 mg/l, N = 36, vs 8.4 ± 0.4 mg/l, N = 65; p = 4 exp-3, Mann Whitney *U* test). By contrast, water conductivity remained consistent (< 150 μS/cm) throughout the year.

Field survey 1: Fish spatial distribution and environmental variables

Our first step of analysis aimed to relate environmental data to individual spacing and EOD rates of fish detected by electrical census. Fish occurred under the central area of the floating mats, and absent from the edge near the open water (Fig 1C). In both seasons, fish were distributed evenly, and not aggregated with other conspecifics. The distribution of DNNs was asymmetrical, skewed with a mode at 150 cm (Fig 2A). The DNN mean value was significantly higher in the breeding season than in the non-breeding season (230 ± 15 cm, t-test, T = 5.9, p = 1 exp-4, N = 47 vs 140 ± 7 cm, N = 73).

Water temperature showed low variability among individual spots within each census unit (breeding season mean T CV = 2.0 ± 2.4%, non-breeding season mean T CV = 6.5 ± 5.5%). In contrast, O_2 concentration showed high variability within each census unit (breeding season mean O_2 CV = 20.4 ± 9.3%, non-breeding season mean O_2 CV = 25.9 ± 14.6%). Consequently, we explored whether O_2 may contribute to fish spatial patterns. During the breeding season, the distribution of O_2 concentration ranged from 0 to 15 mg/l and was positively skewed (Fig 2B, green), with a higher frequency of low values (mode at 1 mg/l). However, during the non-breeding season, O_2 distribution was negatively skewed, showing a single mode at 11 mg/l (Fig 2B, gray). Oxygen concentration and DNN showed a positive and significant association both in the breeding (R^2 = 0.44, p = 1 exp -4, N = 31, Fig 2C green) and in the non-breeding season (R^2 = 0.21, p = 1 exp -4, N = 50, Fig 2C gray). Interestingly, O_2 showed a positive linear relationship with individual EOD rate during the breeding but not the non-breeding season (breeding: R^2 = 0.47, p = 5 exp -4, N = 22, Fig 2D green; non-breeding: R^2 = 1 exp -3, p = 0.54, N = 39, Fig 2D gray).

Field survey 2: Fish spatial distribution based on individual traits

The second step of analysis explored the impact of individual morphological and physiological characteristics of fish on DNN in both the non-breeding and breeding seasons. Across census units, 71 ± 5.8% of fish located under tagged sites in Survey 1 were recovered in Survey 2. There were no sexual differences in body length, EOD rate, DNN, nor DNN relative to body length, in both the breeding and the non-breeding seasons (Table 1). During breeding, females showed mean circulating E_2 levels of 293.7 ± 97.7 pg/ml and males had mean circulating

Table 3. GLM model that presented the best adjustment to explain the distance to the nearest neighbor (DNN) in both sexes during the non-breeding season with data obtained in Survey 2. Model intercept and explanatory variable are expressed as Mean (SD). For each parameter the value is shown in bold if statistically significant ($p<0.05$).

Intercept	Body size	N	P model	Adjusted R2	AIC
36.4 (34)	**5.2** (2)	48	0.01	0.11	79.75

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228976.t003

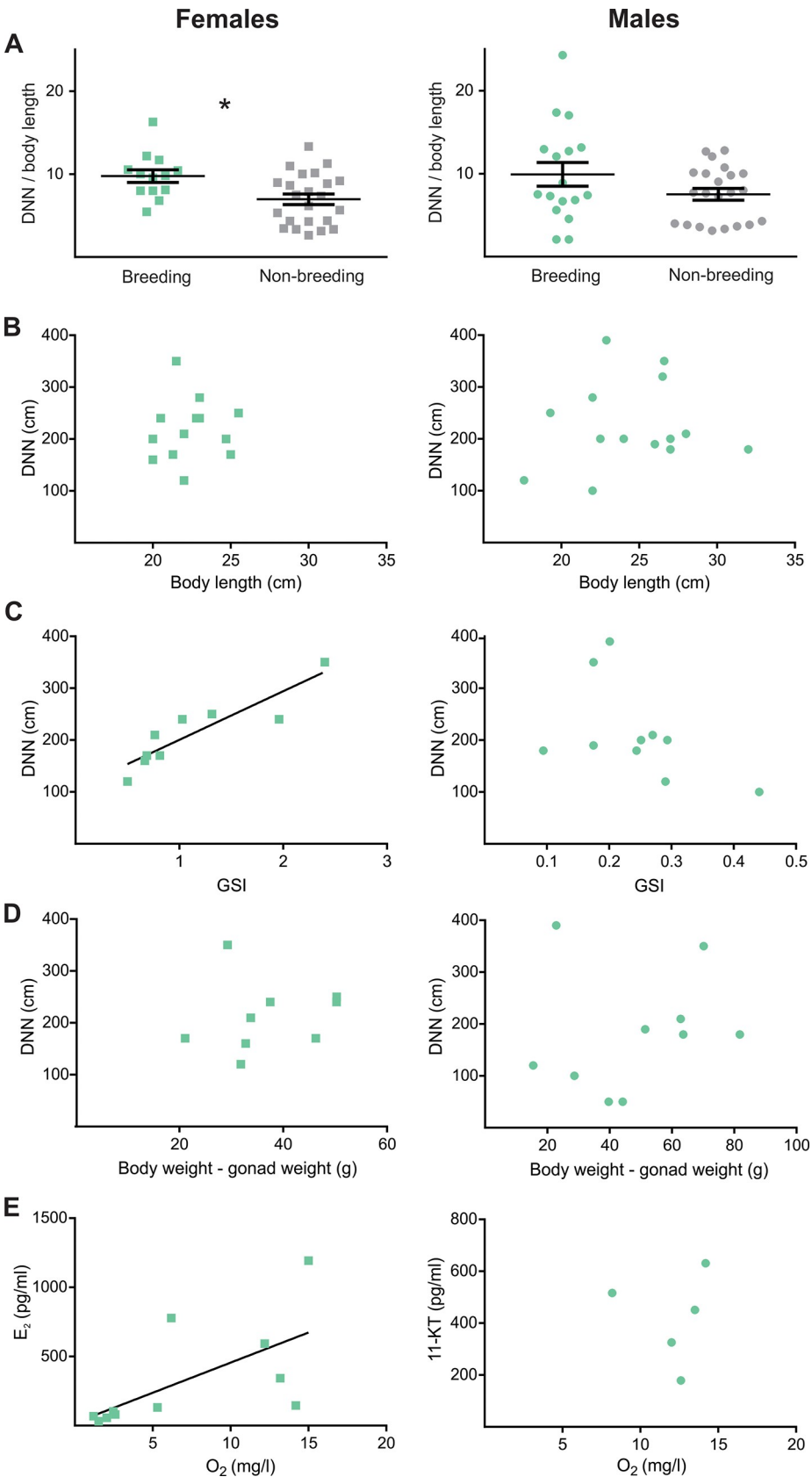
Females
Males
A
DNN / body length
20
10
*
Breeding
Non-breeding
B
DNN (cm)
400
300
200
100
20
25
30
35
Body length (cm)
C
GSI
1
2
3
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
D
Body weight - gonad weight (g)
20
40
60
80
100
E
E_2 (pg/ml)
1500
1000
500
O_2 (mg/l)
5
10
15
20
11-KT (pg/ml)
800
600
400
200

Fig 3. Emergence of sex dimorphism during the breeding season. The plots show values for females (left panels, represented as squares) and males (right panels, represented as circles), from data obtained in Survey 2 (Step 3 of analysis). **A**- Relative DNN (cm / cm body length). Dots represent individual values, and in A and B horizontal lines represent mean values, and error bars represent SEM. For each sex, breeding values are shown in the left (green) and non-breeding values in the right (grey). * indicate statistically significance ($p < 0.05$) t-test. **B**- Linear regression between body size (cm) and DNN (cm) in the breeding season. Females: p = 0.8, R^2 = 7 exp-3, N = 13; males p = 0.7, R^2 = 0.01, N = 15. **C**- Linear regression between GSI and DNN (cm) in the breeding season. Females: p = 1 exp-3, R^2 = 0.8, N = 9; males: p = 0.14, R^2 = 0.25, N = 10. **D**- Linear regression between body weight–gonad weight (g) and DNN (cm) in the breeding season. Females: p = 0.7, R2 = 0.02, N = 9; males: p = 0.6, R^2 = 0.03, N = 10. **E**- Linear regression between water O_2 concentration (mg/l) and E_2 (pg/ml) in breeding females: p = 0.03, R^2 = 0.41, N = 11. The same relation is shown for 11-KT in breeding males with no statistical test due to small sample size (N = 5).

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228976.g003

11-KT levels of 399.1 ± 140.9 pg/ml. Mean adult body size was significantly larger in the breeding season than in the non-breeding season (t-test, T = 6.6, p = 1 exp-4, N breeding = 28, N non-breeding = 53). In addition, EOD rate was higher (t-test, T = 18.8, p = 1 exp-4, N breeding = 30, N non-breeding = 36), DNN was larger (t-test, T = 5.6, p = 1 exp-4, N breeding = 31, N non-breeding = 46) and relative DNN (DNN/body length) was also larger during the breeding season (t-test, T = 2.7, p = 9 exp-3, N breeding = 30, N non-breeding = 46).

We evaluated the determinants of DNN separately in the breeding and non-breeding seasons. Because the first GLM including breeding females and males, with body length, EOD rate, and sex as explanatory variables was not significant, we separated sexes into two different models and included circulating E_2 levels as an explanatory variable for females. We obtained two significant models in females, both equivalent according to the AIC criterion (Table 2). In the model with the best adjustment (model 1), DNN showed a positive correlation with circulating E_2, and a marginal negative correlation with EOD rate. In model 2, EOD rate was not a significant explanatory variable for DNN, and only E_2 had a significant positive correlation.

For males, we found no correlation between the independent variables tested and DNN. Although androgen levels were not included in the model (due to a low number of valid samples), it is worth mentioning that circulating 11-KT levels showed a positive trend with DNN, although the dataset was too small for sufficiently powerful statistical analysis. In the non-breeding season, individual traits were the same for males and females, thus we were able to include both sexes in a single GLM to test the influence of individual traits on DNN. We explored if individual sex, body size, and EOD rate correlated with DNN, and found that body size, but not sex nor EOD rate, correlated positively with DNN (Table 3).

To assess sexual differences in territorial features during breeding, we performed a third step of analysis. We compared relative territory size between seasons and evaluated the relationship between individual and environmental traits. Although both absolute and relative DNN were larger in the breeding season in both sexes, an analysis in which males and females were separated showed that this seasonal difference is only significant in females (Females: breeding 9.8 ± 0.8, N = 13 vs non-breeding 7.0 ± 0.6, N = 23; t-test, T = 2.7, p = 0.01, Males: breeding 9.9 ± 1.4, N = 17 vs non-breeding 7.5 ± 0.7, N = 22; t-test, T = 1.4, p = 0.12, Fig 3A). In accordance with the breeding GLM results, body size showed no association with DNN in the breeding season in either sex (Females: p = 0.8, R^2 = 7 exp-3, N = 13. Males: p = 0.7, R^2 = 0.01, N = 15; Fig 3B). With respect to the relative importance of gonadal maturity on spacing, we found that GSI was significantly higher in the breeding than in the non-breeding season in females (Females: 1.1 ± 0.22% N = 9 vs 0.6 ± 0.09% N = 11; t-test, T = 2.3, p = 0.02,. Males: 0.24 ± 0.03% N = 10 vs 0.23 ± 0.03, N = 16; t-test, T = 0.3, p = 0.87); and as expected GSI showed a positive relationship with E_2 in breeding females (p = 2 exp-3, R^2 = 0.76, N = 9, data not shown). In addition, GSI showed a positive relationship with DNN only in breeding females (Females: p = 1 exp-3, R^2 = 0.8, N = 9. Males: p = 0.14, R^2 = 0.25, N = 10, Fig 3C); and DNN showed no relation with body weight after the subtraction of gonad weight in breeding

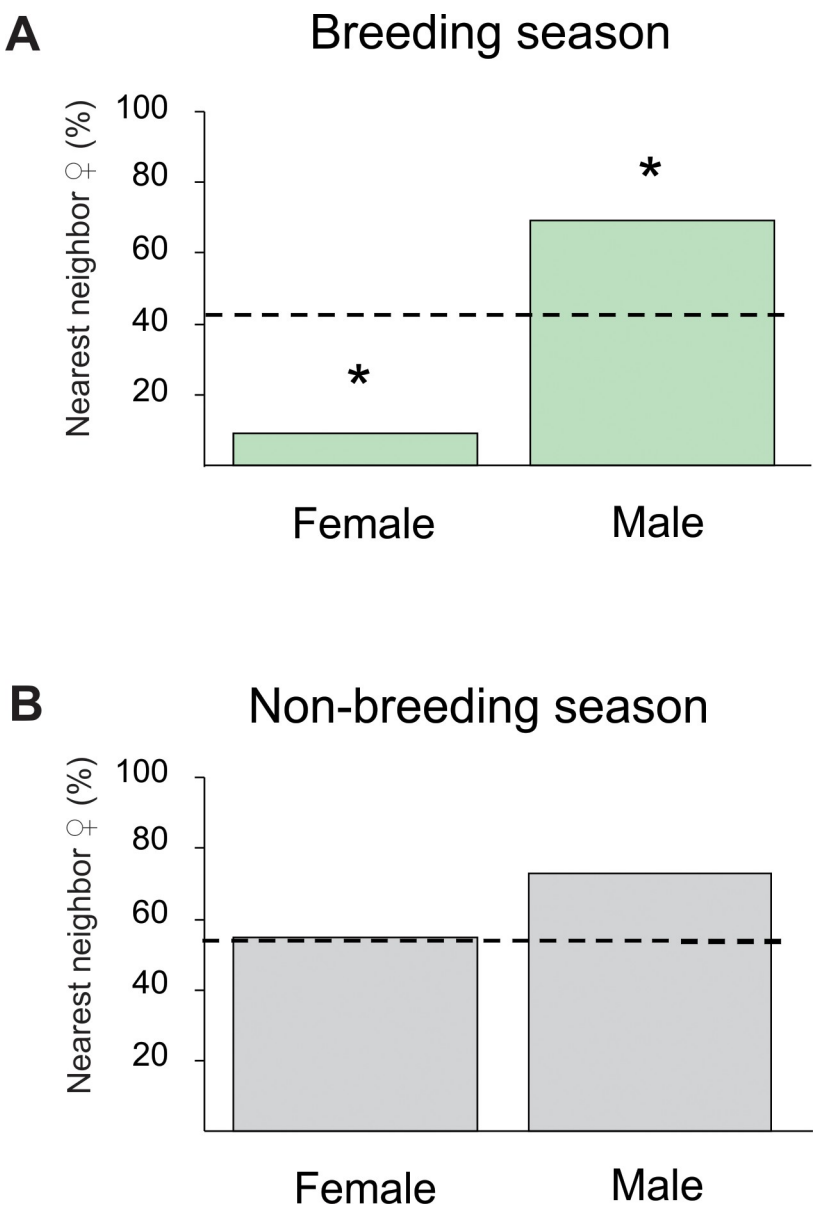

Fig 4. Seasonality in the spatial distribution of sexes (from data obtained in Survey 2). Sex of the nearest neighbor (expressed in percentage) when the focal fish is a female or a male, both in the breeding season (A, top), and in the non-breeding season (B, bottom). Dashed line represents the expected percentage to have a female as nearest neighbor for a random distribution, according to the empirical sex ratio (41% in the breeding season, and 50.9% in the non-breeding season). * indicates statistical significance ($p < 0.05$) according to the binomial exact test.

https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228976.g004

(Females: $p = 0.7$, $R^2 = 0.02$, $N = 9$. Males: $p = 0.6$, $R^2 = 0.03$, $N = 10$; Fig 3D). Further, water O_2 content showed a positive relationship with circulating E_2 in breeding females ($p = 0.03$, $R^2 = 0.41$, $N = 11$, Fig 3E) and O_2 showed a marginal relationship with female GSI ($p = 0.08$, $R^2 = 0.5$, $N = 7$, data not shown); while male 11-KT showed no association with O_2, although the dataset was too small for statistical analysis ($N = 5$, Fig 3E).

In the breeding season, fish were distributed non-randomly according to sex. The percentage of females with a female as the nearest neighbor was significantly lower than the random distribution ($p = 0.03$, $N = 11$; Binomial exact test, Fig 4A), and the percentage of females with a

male as the nearest neighbor was significantly higher than random ($p = 0.04$, $N = 16$; Binomial exact test, Fig 4A). By contrast, in the non-breeding season, the spatial configuration of the population was random with respect to sex. The probability of having a female as the nearest neighbor did not differ significantly from the random distribution for both females ($p = 0.82$, $N = 20$; Binomial exact test, Fig 4B) and males ($p = 0.12$, $N = 15$; Binomial exact test, Fig 4B).

Discussion

This study examined seasonal and sexual differences in the determinants of territory size in a teleost species. First, we found that *Gymnotus omaroum* has a spatial distribution in the natural habitat consistent with territoriality across seasons and that O_2 concentration had a significant positive correlation with territory size both in the breeding and in the non-breeding season. In addition, we found that: a) In the non-breeding season, territory size was sexually monomorphic and determined partially by individual body size; and b) there was a seasonal emergence of sexual dimorphism in relative territory size and in its determinants.

In many species, body mass is strongly associated with a variety of physiological and ecological attributes (e.g., home range and metabolic rate) and is key to understanding how animals use the environment [61–64]. The distribution of differently sized animals can be shaped by behavioral interactions such as resource defense [65]. These ideas, put forth initially to analyze interspecific interactions [66], can be also applied to interpret distribution of individuals of the same species, as in this study. We found that body size predicted DNN in the non-breeding season but not in the breeding season (Tables 2 and 3). This suggests that, during reproduction, other physiological, behavioral, and motivational aspects may override body size in predicting DNN, a proxy for territory size.

Oxygen is a limiting physico-chemical variable in aquatic ecosystems, and hypoxia has been related to fish mortality [67]. Interestingly, *Gymnotus* has been shown to tolerate a wide range of dissolved O_2 concentrations and can survive in hypoxic environments [68]. *Gymnotus* can breathe air at the water surface and has metabolic adaptations that compensate for any potential damages hypoxia may cause [69]. In our study, individual locations showed O_2 concentration correlated with territory size in both seasons (Fig 2C). This suggests that higher levels of dissolved O_2 may enable fish to defend large territories because their capacity for aerobic respiration is enhanced. Interestingly, O_2 concentration correlated positively with EOD rate only during the breeding season, when EOD rate was significantly higher and O_2 content was significantly lower (Fig 2). This is consistent with the metabolic requirement of EOD production [70], which can be specially demanding when EOD rate is high, in the challenging environment of summer hypoxia.

Non-breeding spacing: Body size dependent and sex independent

In teleosts, year round territoriality has been examined mostly in populations of coral reef communities (for example *Stegastes fuscus*, [71]). Here, we evaluated the seasonal spatial organization in a subtropical freshwater fish in the field and found that spatial distribution during winter was consistent with territoriality. Why would *Gymnotus* defend non-breeding territories? The acquisition and maintenance of territories are known to be mediated by agonistic behavior [72]. In particular, previous reports of laboratory experiments demonstrated that *Gymnotus omarorum* exhibits non-breeding agonistic behavior that mediates territory access [39] and that body size is the main determinant of the fight outcome [22].

The generation of the EOD in electric fish imposes a high basal metabolic cost [70], which requires an additional constant need to forage. In line with this, we found that larger fish hold larger territories, in both males and females (Table 3). Body size is sexually monomorphic in

this species and behavioral experiments showed that agonistic behavior is non-sex-biased [22,35]. Here, we confirmed that non-breeding males and females hold sexually monomorphic territory sizes in the wild (Table 1), probably to cope with energetic requirements that are not expected to differ by sex during winter.

Electric fish use electric communication signals as behavioral displays. Since the EOD encodes information about body size and physiological state [73–77], a fish may maintain territory boundaries in the wild by remotely assessing the EOD of neighbors. EOD rate signals dominant status when fish are kept in close quarters after conflict resolution, but not when allowed to distance themselves [39]. Thus, we expected no correlation between EOD rate and territory size in the field, and this was confirmed by our data (Table 3). Dominance status based on EOD rate may be needed to reinforce submission when a subordinate individual is unable to escape from the dominant as in confined laboratory conditions. However, under the population densities observed in this study, dominance status is not expected.

Breeding spacing: The emergence of sexual dimorphism in territory determinants

While competition for reproductive opportunities is usually sexually dimorphic, competition over non-sexual resources is usually equal between males and females [78,79]. Moreover, many species with male and female territoriality are sexually monomorphic in body size and signal traits [80–82]. Consistent with this pattern, we found that during the breeding season both absolute and relative territory sizes were sexually monomorphic, which parallels the lack of sex dimorphism in body size (Table 1). However, during breeding, body size did not correlate with territory size (Fig 3B), suggesting that other factors beyond body size influence habitat resource acquisition and maintenance.

Interestingly, a closer analysis (Step 3) showed that although there were no sex differences in relative territory size in each season (Table 1), they emerged when comparing between seasons. Females seemed to use relatively larger territories in the breeding season compared to the non-breeding season (Fig 3A). This result can be interpreted in the context of energetic cost. Female GSI was higher in the breeding season and correlated positively to circulating E_2. Moreover, GSI was also an excellent predictor of female territory size (Fig 3C). This suggests that females may establish relatively larger territories in the breeding season related to foraging needs imposed by ovarian maturation. In line with this, circulating E_2 positively correlated with territory size in females (Table 2), a result obtained in both breeding female GLM models. EOD rate, on the other hand, is less reliable in its influence upon territory size, as it presented a marginal correlation to territory in only one GLM model.

Steroid hormones are strong modulators of behavioral plasticity [1] as hormones are used to orchestrate organismal-level physiological and behavioral responses to social cues [83,84]. In females, the fact that both GSI and E_2 correlated with territory size, combined with reports in which E_2 promotes female aggression [85–87], suggests that ovarian E_2 modulates territorial behavior in *G. omarorum*. We hypothesize that E_2 secretion integrates female metabolic requirements with the social environment, through the expression of territorial behavior. A closer look at the relationship between water O_2 concentration and female individual traits, shows that O_2 levels correlate positively with circulating E_2 (Fig 3E) and marginally with GSI. These data allow us to further speculate that breeding females compete for territories with high O_2, which would allow them to better confront energetically expensive processes. In males, we identified a positive trend between circulating 11-KT and territory size, which, although not statistically significant, may be expected given the well documented relationship between androgens and male territoriality [24–26].

The fact that individual body size was larger in the breeding than in the non-breeding season, most likely depends on the physical growth inherent to *G. omarorum* life history. However, we cannot assume that the non-breeding and breeding population remain demographically unchanged. Although this study was not conceived to track population seasonal changes, differences in fish size between seasons may reflect demographic changes. For example, large mature fish may displace smaller adults not only to exploit valuable territories for their own use, but also to access sites where offspring have higher survival as observed, for example, in the cichlid *Lobochilotes labiatus* [88].

Motivation for territory defense in the breeding season may involve not only the value of the territory *per se* (territory size, O_2 concentration) but also the sex of the nearest neighbor. The results presented in Fig 4 suggest that *G. omarorum* can assess territory features and use this information to shift positions seasonally. In the non-breeding season individual fish had a closest neighbor that was random with respect to sex, whereas in the breeding season, it was significantly more likely to have an opposite-sex closest neighbor (Fig 4). This evidence supports the idea that the sex of the nearest neighbor becomes a relevant factor for territory value, but only during the breeding season. This can be considered a good example of behavioral plasticity by which individuals respond differently to the same social stimulus (e.g., sex of the nearest neighbor), depending on variations in their internal state (sexually dimorphic hormones).

Concluding remarks

Gymnotus omarorum offers the opportunity to analyze seasonal changes in year-round territoriality. We found no differences in absolute nor relative territory size between sexes across the year. In the non-breeding season, only body size and water O_2 concentration influenced territory size. By contrast, in the breeding season, sex became relevant for territorial behavior: a) the sex of neighbors became important; b) territory size was related to gonadal hormones in both sexes, which was expected for males, but not previously reported in females; and c) breeding females used relatively larger territories than non-breeding females, which reflects particular female metabolic demands related to ovarian maturation. This study helps bridge the gap between behavioral plasticity of natural territorial behavior and its underlying mechanisms.

Acknowledgments

We are very grateful to Adriana Migliaro, Rossana Perrone, Carlos Passos, Federico Reyes, and Bettina Tassino for their useful discussions during the BERTA Workshop, Cerro del Toro, Piriápolis, Uruguay. We also thank the anonymous reviewers for their constructive suggestions that greatly improved this article.

Author Contributions

Conceptualization: Lucía Zubizarreta, Laura Quintana, Mariana Meerhoff, Ana Silva.

Data curation: Lucía Zubizarreta.

Formal analysis: Lucía Zubizarreta, Daniel Hernández.

Funding acquisition: Laura Quintana, Franco Teixeira de Mello, Mariana Meerhoff, Ana Silva.

Investigation: Lucía Zubizarreta, Laura Quintana, Ana Silva.

Methodology: Lucía Zubizarreta, Laura Quintana, Franco Teixeira de Mello, Mariana Meerhoff, Renato Massaaki Honji, Renata Guimarães Moreira, Ana Silva.

Project administration: Laura Quintana, Ana Silva.

Resources: Lucía Zubizarreta, Laura Quintana, Mariana Meerhoff, Ana Silva.

Supervision: Laura Quintana, Mariana Meerhoff, Ana Silva.

Visualization: Lucía Zubizarreta.

Writing – original draft: Lucía Zubizarreta, Laura Quintana, Ana Silva.

Writing – review & editing: Lucía Zubizarreta, Laura Quintana, Daniel Hernández, Franco Teixeira de Mello, Mariana Meerhoff, Renato Massaaki Honji, Renata Guimarães Moreira, Ana Silva.

References

1. Oliveira RF. Social behavior in context: Hormonal modulation of behavioral plasticity and social competence. Integr Comp Biol. 2009 Jul 21; 49(4):423–40. https://doi.org/10.1093/icb/icp055 PMID: 21665831
2. Smith JM, Parker GA. The logic of asymmetric contests. Anim Behav. 1976 Feb 1; 24(1):159–75.
3. Hurd PL. Resource holding potential, subjective resource value, and game theoretical models of aggressiveness signalling. J Theor Biol. 2006 Aug 7; 241(3):639–48. https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2006.01.001 PMID: 16469335
4. Piper WH, Mager JN, Walcott C, Furey L, Banfield N, Reinke A, et al. Territory settlement in common loons: no footholds but age and assessment are important. Anim Behav. 2015 Jun 1; 104:155–63.
5. Metcalfe NB, Van Leeuwen TE, Killen SS. Does individual variation in metabolic phenotype predict fish behaviour and performance? J Fish Biol. 2016 Jan; 88(1):298–321. https://doi.org/10.1111/jfb.12699 PMID: 26577442
6. Nolen ZJ, Allen PE, Miller CW. Seasonal resource value and male size influence male aggressive interactions in the leaf footed cactus bug, Narnia femorata. Behav Processes. 2017 May 1; 138:1–6. https://doi.org/10.1016/j.beproc.2017.01.020 PMID: 28167199
7. Elliott JM. Mechanisms Responsible for Population Regulation in Young Migratory Trout, Salmo trutta. III. The Role of Territorial Behaviour. J Anim Ecol. 1990; 59(3):803–18.
8. Butchart SHM, Seddon N, Ekstrom JMM. Polyandry and competition for territories in bronze-winged jacanas. J Anim Ecol. 1999; 68(5):928–39.
9. Keeley ER. An experimental analysis of territory size in juvenile steelhead trout. Anim Behav. 2000 Mar 1; 59(3):477–90. https://doi.org/10.1006/anbe.1999.1288 PMID: 10715169
10. Adams ES. Approaches to the Study of Territory Size and Shape. Annu Rev Ecol Syst. 2001 Nov 1; 32(1):277–303.
11. Wauters L, Dhondt AA. Spacing behaviour of red squirrels, Sciurus vulgaris: variation between habitats and the sexes. Anim Behav. 1992 Feb 1; 43(2):297–311.
12. Smith DC. Home range and territory in the striped plateau lizard (Sceloporus virgatus). Anim Behav. 1985 May 1; 33(2):417–27.
13. Adkins-Regan E. Hormones and Animal Social Behavior. Princeton University Press; 2005. 431 p.
14. Logan CA, Wingfield JC. Autumnal territorial aggression is independent of plasma testosterone in mockingbirds. Horm Behav. 1990 Dec 1; 24(4):568–81. https://doi.org/10.1016/0018-506x(90)90042-v PMID: 2286368
15. Gwinner E, Rödl T, Schwabl H. Pair Territoriality of Wintering Stonechats: Behaviour, Function and Hormones. Behav Ecol Sociobiol. 1994; 34(5):321–7.
16. Wingfield JC, Monk D. Behavioral and Hormonal Responses of Male Song Sparrows to Estradiol-Treated Females during the Non-breeding Season. Horm Behav. 1994 Jun 1; 28(2):146–54. https://doi.org/10.1006/hbeh.1994.1012 PMID: 7927281
17. Soma KK, Sullivan K, Wingfield J. Combined Aromatase Inhibitor and Antiandrogen Treatment Decreases Territorial Aggression in a Wild Songbird during the Nonbreeding Season. Gen Comp Endocrinol. 1999 Sep 1; 115(3):442–53. https://doi.org/10.1006/gcen.1999.7334 PMID: 10480996
18. Caldwell G, Glickman S, Smith E. Seasonal aggression independent of seasonal testosterone in wood rats. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984 Aug; 81(16):5255–7. https://doi.org/10.1073/pnas.81.16.5255 PMID: 6591190

19. Jasnow AM, Huhman KL, Bartness TJ, Demas GE. Short-Day Increases in Aggression Are Inversely Related to Circulating Testosterone Concentrations in Male Siberian Hamsters (Phodopus sungorus). Horm Behav. 2000 Sep 1; 38(2):102–10. https://doi.org/10.1006/hbeh.2000.1604 PMID: 10964524

20. Demas GE, Cooper MA, Albers HE, Soma KK. Novel Mechanisms Underlying Neuroendocrine Regulation of Aggression: A Synthesis of Rodent, Avian, and Primate Studies. In: Lajtha A, Blaustein JD, editors. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2007 [cited 2019 Nov 15]. p. 337–72. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-30405-2_8

21. Moore MC, Marler CA. Effects of testosterone manipulations on nonbreeding season territorial aggression in free-living male lizards, Sceloporus jarrovi. Gen Comp Endocrinol. 1987 Feb 1; 65(2):225–32. https://doi.org/10.1016/0016-6480(87)90170-5 PMID: 3817446

22. Batista G, Zubizarreta L, Perrone R, Silva A. Non-sex-biased dominance in a sexually monomorphic electric fish: fight structure and submissive electric signalling. Ethology. 2012 Apr 1; 118(4):398–410.

23. Vullioud P, Bshary R, Ros AFH. Intra- and interspecific aggression do not modulate androgen levels in dusky gregories, yet male aggression is reduced by an androgen blocker. Horm Behav. 2013 Aug 1; 64 (3):430–8. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.06.007 PMID: 23838629

24. Monaghan EP, Glickman SE. Hormones and aggressive behavior. Behav Endocrinol. 1992; 134:692–694.

25. Nelson RJ. An introduction to behavioral endocrinology, 3rd ed. Sunderland, MA, US: Sinauer Associates; 2005. xvii, 822. (An introduction to behavioral endocrinology, 3rd ed.).

26. Simon NG, Lu S-F. Androgens and aggression. In: Biology of aggression. Oxford University Press, USA; 2006. p. 211–30.

27. Watson A, Parr R. Hormone Implants Affecting Territory Size and Aggressive and Sexual Behaviour in Red Grouse. Ornis Scand Scand J Ornithol. 1981; 12(1):55–61.

28. Cardwell JR, Liley NR. Androgen control of social status in males of a wild population of stoplight parrotfish, Sparisoma viride (Scaridae). Horm Behav. 1991 Mar 1; 25(1):1–18. https://doi.org/10.1016/0018-506x(91)90035-g PMID: 2045087

29. Sinervo B, Miles DB, Frankino WA, Klukowski M, DeNardo DF. Testosterone, Endurance, and Darwinian Fitness: Natural and Sexual Selection on the Physiological Bases of Alternative Male Behaviors in Side-Blotched Lizards. Horm Behav. 2000 Dec 1; 38(4):222–33. https://doi.org/10.1006/hbeh.2000.1622 PMID: 11104640

30. Mougeot F, Redpath SM, Moss R, Matthiopoulos J, Hudson PJ. Territorial behaviour and population dynamics in red grouse Lagopus lagopus scoticus. I. Population experiments. J Anim Ecol. 2003 Nov 1; 72(6):1073–82.

31. Woodley SK, Moore MC. Ovarian Hormones Influence Territorial Aggression in Free-Living Female Mountain Spiny Lizards. Horm Behav. 1999 Jun 1; 35(3):205–14. https://doi.org/10.1006/hbeh.1999.1514 PMID: 10373333

32. Rubenstein DR, Wikelski M. Steroid hormones and aggression in female Galápagos marine iguanas. Horm Behav. 2005 Sep; 48(3):329–41. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.04.006 PMID: 15916763

33. Pärn H, Lindström KM, Sandell M, Amundsen T. Female Aggressive Response and Hormonal Correlates—An Intrusion Experiment in a Free-Living Passerine. Behav Ecol Sociobiol. 2008; 62(10):1665–77.

34. Richer-de-Forges MM, Crampton WGR, Albert JS. A New Species of Gymnotus (Gymnotiformes, Gymnotidae) from Uruguay: Description of a Model Species in Neurophysiological Research. Copeia. 2009; 2009(3):538–44.

35. Quintana L, Zubizarreta L, Jalabert C, Batista G, Perrone R, Silva A. Building the case for a novel teleost model of non-breeding aggression and its neuroendocrine control. Journal of Physiology-Paris. 2016 Oct 1; 110(3, Part B):224–32.

36. Silva AC, Perrone R, Zubizarreta L, Batista G, Stoddard PK. Neuromodulation of the agonistic behavior in two species of weakly electric fish that display different types of aggression. J Exp Biol. 2013 Jul 1; 216(13):2412.

37. Zubizarreta L, Stoddard PK, Silva A. Aggression Levels Affect Social Interaction in the Non-Breeding Territorial Aggression of the Weakly Electric Fish, Gymnotus omarorum. Ethology. 2015 Jan 1; 121 (1):8–16.

38. Perrone R, Silva AC. Status-Dependent Vasotocin Modulation of Dominance and Subordination in the Weakly Electric Fish Gymnotus omarorum. Front Behav Neurosci. 2018; 12:1. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00001 PMID: 29403366

39. Perrone R, Pedraja F, Valiño G, Tassino B, Silva A. Non-breeding territoriality and the effect of territory size on aggression in the weakly electric fish, Gymnotus omarorum. Acta Ethologica. 2019 Jun 1; 22 (2):79–89.

40. Jalabert C, Quintana L, Pessina P, Silva A. Extra-gonadal steroids modulate non-breeding territorial aggression in weakly electric fish. Horm Behav. 2015 Jun 1; 72:60–7. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.05.003 PMID: 25989595

41. Zubizarreta L, Silva AC, Quintana L. The estrogenic pathway modulates non-breeding female aggression in a teleost fish. Physiol Behav. 2020 Jun 1; 220:112883. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.112883 PMID: 32199998

42. Marroni S, Iglesias C, Mazzeo N, Clemente J, Teixeira de Mello F, Pacheco JP. Alternative food sources of native and non-native bivalves in a subtropical eutrophic lake. Hydrobiologia. 2014 Sep 1; 735(1):263–76.

43. Quintana L, Silva A, Berois N, Macadar O. Temperature induces gonadal maturation and affects electrophysiological sexual maturity indicators in Brachyhypopomus pinnicaudatus from a temperate climate. J Exp Biol. 2004 May 1; 207(11):1843.

44. Migliaro A, Moreno V, Marchal P, Silva A. Daily changes in the electric behavior of weakly electric fish naturally persist in constant darkness and are socially synchronized. Biol Open. 2018 Dec 15; 7(12): bio036319. https://doi.org/10.1242/bio.036319 PMID: 30341102

45. Brown JL, Orians GH. Spacing Patterns in Mobile Animals. Annu Rev Ecol Syst. 1970; 1:239–62.

46. Silva A, Quintana L, Galeano M, Errandonea P. Biogeography and Breeding in Gymnotiformes from Uruguay. Environ Biol Fishes. 2003 Apr 1; 66(4):329–38.

47. Moller P. Electric fishes: history and behavior. Vol. 17. Springer; 1995.

48. Dunlap KD, Smith GT, Yekta A. Temperature Dependence of Electrocommunication Signals and Their Underlying Neural Rhythms in the Weakly Electric Fish, Apteronotus leptorhynchus. Brain Behav Evol. 2000; 55(3):152–62. https://doi.org/10.1159/000006649 PMID: 10899709

49. Silva A, Perrone R, Macadar O. Environmental, seasonal, and social modulations of basal activity in a weakly electric fish. Incl Spec Sect Chronobiol Asp Sleep—Wake Cycle Thermoreregulation. 2007 Feb 28; 90(2):525–36.

50. Fox HE, White SA, Kao MHF, Fernald RD. Stress and Dominance in a Social Fish. J Neurosci. 1997 Aug 15; 17(16):6463. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-16-06463.1997 PMID: 9236253

51. Dunlap KD, Smith GT, Yekta A. Temperature Dependence of Electrocommunication Signals and Their Underlying Neural Rhythms in the Weakly Electric Fish, Apteronotus leptorhynchus. Brain Behav Evol. 2000; 55(3):152–62. https://doi.org/10.1159/000006649 PMID: 10899709

52. Salazar VL, Stoddard PK. Sex differences in energetic costs explain sexual dimorphism in the circadian rhythm modulation of the electrocommunication signal of the gymnotiform fish Brachyhypopomus pinnicaudatus. J Exp Biol. 2008 Mar 15; 211(6):1012.

53. Anderson RO, Gutreuter SJ, Nielsen L, Johnson D. Fisheries techniques. In: Fish Farmin, Handbook. American Fisheries Society, Bethesda Maryland. Brown; 1983. p. 237–337.

54. Sink TD, Lochmann RT, Fecteau KA. Validation, use, and disadvantages of enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of cortisol in channel catfish, largemouth bass, red pacu, and golden shiners. Fish Physiol Biochem. 2008 Mar; 34(1):95–101. https://doi.org/10.1007/s10695-007-9150-9 PMID: 18649027

55. Hammer Ø, Harper DA, Ryan PD. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontol Electron. 2001; 4(1):art 4.

56. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2012.

57. Zuur A, Ieno EN, Smith GM. Analyzing Ecological Data. Springer; 2007. 686 p.

58. McLeod A, Xu C. bestglm: Best Subset GLM. 2011.

59. McCullagh P, Nelder JA. Generalized linear models. 2nd ed. London New York: Chapmann and Hall; 1989.

60. Conover WJ. Practical Nonparametric Statistics. USA: John Wiley & Sons, Inc; 1971.

61. Peters R. The ecological implications of body size [Internet]. Cambridge University Press; 1983 [cited 2019 Nov 12]. Available from: https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Peters+RH.+1983.+The+ecological+implications+of+body+size.+Cambridge+University+Press%2C+USA&btnG=

62. Brown JH, Gillooly JF, Allen AP, Savage VM, West GB. Toward a metabolic theory of ecology. Ecology. 2004 Jul 1; 85(7):1771–89.

63. Woodward G, Ebenman B, Emmerson M, Montoya JM, Olesen JM, Valido A, et al. Body size in ecological networks. Trends Ecol Evol. 2005 Jul 1; 20(7):402–9. https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.04.005 PMID: 16701403

64. White EP, Ernest SKM, Kerkhoff AJ, Enquist BJ. Relationships between body size and abundance in ecology. Trends Ecol Evol. 2007 Jun 1; 22(6):323–30. https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.03.007 PMID: 17399851

65. Allen CR, Garmestani AS, Havlicek TD, Marquet PA, Peterson GD, Restrepo C, et al. Patterns in body mass distributions: sifting among alternative hypotheses. Ecol Lett. 2006 May 1; 9(5):630–43. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00902.x PMID: 16643307

66. Violle C, Enquist BJ, McGill BJ, Jiang L, Albert CH, Hulshof C, et al. The return of the variance: intraspecific variability in community ecology. Trends Ecol Evol. 2012 Apr 1; 27(4):244–52. https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.11.014 PMID: 22244797

67. La VT, Cooke SJ. Advancing the Science and Practice of Fish Kill Investigations. Rev Fish Sci. 2011 Jan 3; 19(1):21–33.

68. Crampton WGR. Effects of anoxia on the distribution, respiratory strategies and electric signal diversity of gymnotiform fishes. J Fish Biol. 1998; 53(sA):307–30.

69. Moraes G, Avilez IM, Altran AE, Barbosa CC. Biochemical and hematological responses of the banded knife fish Gymnotus carapo (Linnaeus, 1758) exposed to environmental hypoxia. Braz J Biol. 2002; 62:633–40. https://doi.org/10.1590/s1519-69842002000400011 PMID: 12659013

70. Markham MR, Ban Y, McCauley AG, Maltby R. Energetics of Sensing and Communication in Electric Fish: A Blessing and a Curse in the Anthropocene? Integr Comp Biol. 2016; 56(5):889–900. https://doi.org/10.1093/icb/icw104 PMID: 27549201

71. Osório R, Rosa IL, Cabral H. Territorial defence by the Brazilian damsel Stegastes fuscus (Teleostei: Pomacentridae). J Fish Biol. 2006 Jul 1; 69(1):233–42.

72. Börger L, Dalziel BD, Fryxell JM. Are there general mechanisms of animal home range behaviour? A review and prospects for future research. Ecol Lett. 2008 Jun 1; 11(6):637–50. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01182.x PMID: 18400017

73. Gavassa S, Silva AC, Stoddard PK. Tight hormonal phenotypic integration ensures honesty of the electric signal of male and female Brachyhypopomus gauderio. Horm Behav. 2011 Sep 1; 60(4):420–6. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.07.009 PMID: 21802421

74. Pedraja F, Perrone R, Silva A, Budelli R. Passive and active electroreception during agonistic encounters in the weakly electric fish Gymnotus omarorum. Bioinspir Biomim. 2016 Oct 21; 11(6):065002. https://doi.org/10.1088/1748-3190/11/6/065002 PMID: 27767014

75. Caputi A, Budelli R. The electric image in weakly electric fish: I. A data-based model of waveform generation inGymnotus carapo. J Comput Neurosci. 1995 Jun 1; 2(2):131–47. https://doi.org/10.1007/BF00961884 PMID: 8521283

76. Caputi AA, Budelli R. Peripheral electrosensory imaging by weakly electric fish. J Comp Physiol A. 2006 Feb 25; 192(6):587.

77. Gavassa S, Silva AC, Gonzalez E, Stoddard PK. Signal modulation as a mechanism for handicap disposal. Anim Behav. 2012 Apr 1; 83(4):935–44. https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2012.01.012 PMID: 22665940

78. West-Eberhard MJ. Sexual Selection, Social Competition, and Speciation. Q Rev Biol. 1983 Jun 1; 58(2):155–83.

79. Tobias JA, Montgomerie R, Lyon BE. The evolution of female ornaments and weaponry: social selection, sexual selection and ecological competition. Philos Trans R Soc B Biol Sci. 2012 Aug 19; 367(1600):2274–93.

80. Whittingham LA, Kirkconnell A, Ratcliffe LM. Differences in Song and Sexual Dimorphism between Cuban and North American Red-Winged Blackbirds (Agelaius phoeniceus). The Auk. 1992; 109(4):928–33.

81. Tobias JA, Gamarra-Toledo V, García-Olaechea D, Pulgarín PC, Seddon N. Year-round resource defence and the evolution of male and female song in suboscine birds: social armaments are mutual ornaments. J Evol Biol. 2011 Oct 1; 24(10):2118–38. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02345.x PMID: 21707816

82. Odreitz U, Sefc KM. Territorial competition and the evolutionary loss of sexual size dimorphism. Behav Ecol Sociobiol. 2015 Apr 1; 69(4):593–601. https://doi.org/10.1007/s00265-014-1870-0 PMID: 25798023

83. McEwen BS, Wingfield JC. The concept of allostasis in biology and biomedicine. Horm Behav. 2003 Jan 1; 43(1):2–15. https://doi.org/10.1016/s0018-506x(02)00024-7 PMID: 12614627

84. Hirschenhauser K, Oliveira RF. Social modulation of androgens in male vertebrates: meta-analyses of the challenge hypothesis. Anim Behav. 2006 Feb 1; 71(2):265–77.

85. Albert DJ, Jonik RH, Walsh ML. Hormone-dependent aggression in female rats: Testosterone implants attenuate the decline in aggression following ovariectomy. Physiol Behav. 1990 Apr 1; 47(4):659–64. https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90074-e PMID: 2385636

86. Rendon NM, Amez AC, Proffitt MR, Bauserman ER, Demas GE. Aggressive behaviours track transitions in seasonal phenotypes of female Siberian hamsters. Funct Ecol. 2017 May 1; 31(5):1071–81. https://doi.org/10.1111/1365-2435.12816 PMID: 28757672

87. Scaia MF, Morandini L, Noguera C, Trudeau VL, Somoza GM, Pandolfi M. Can estrogens be considered as key elements of the challenge hypothesis? The case of intrasexual aggression in a cichlid fish. Physiol Behav. 2018 Oct 1; 194:481–90. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.06.028 PMID: 29935215

88. Kohda M, Shibata J, Awata S, Gomagano D, Takeyama T, Hori M, et al. Niche differentiation depends on body size in a cichlid fish: a model system of a community structured according to size regularities. J Anim Ecol. 2008 Sep 1; 77(5):859–68. https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2008.01414.x PMID: 18624738

Journal of Physiology - Paris xxx (2016) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Physiology - Paris

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphysparis

Building the case for a novel teleost model of non-breeding aggression and its neuroendocrine control

Laura Quintana [a,*], Lucía Zubizarreta [a,b], Cecilia Jalabert [a,1], Gervasio Batista [a,2], Rossana Perrone [a], Ana Silva [a,c]

[a] Unidad Bases Neurales de la Conducta, Departamento de Neurofisiología Celular y Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Avda. Italia 3318, 11600 Montevideo, Uruguay
[b] Laboratorio de Neurofisiología Celular y Sináptica, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, General Flores 2125, Montevideo, Uruguay
[c] Laboratorio de Neurociencias, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:
Received 1 July 2016
Received in revised form 16 September 2016
Accepted 23 November 2016
Available online xxxx

Keywords:
Agonistic behavior
Territorial aggression
Submission signals
Estradiol
Aromatase
Gonadal steroids
Female aggression
Electric fish
Gymnotus omarorum

ABSTRACT

In vertebrates, aggression has been traditionally associated with high levels of circulating androgens in breeding males. Nevertheless, the centrality of androgens as primary modulators of aggression is being reconsidered in at least in two particular cases: (1) territorial aggression outside the breeding season, and (2) aggression by females. We are developing the weakly electric fish, *Gymnotus omarorum*, as a novel, advantageous model system to address these two alternative forms of aggression. This species displays a short, escalated contest, after which a clear hierarchical status emerges. Subordination of individuals involves three sequential decisions: interruptions of their electric discharges, retreats, and chirps. These decisions are influenced by both size asymmetry between contenders and aggression levels of dominants. Both females and males are aggressive, and do not differ in fighting ability nor in the value placed on the resource. Aggression is completely independent of gonadal hormones: dominance status is unrelated to circulating androgen and estrogen levels, and gonadectomy in males does not affect aggression. Nevertheless, estrogenic pathways participate in the modulation of this non-breeding aggression. Our results parallel those put forth in other taxa, heightening the value of *G. omarorum* as a model to identify commonalities in neuroendrocrine strategies of vertebrate aggression control.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Agonistic behavior is the social behavior related to animal conflict and it has shaped sociality across evolution (King, 1973; Lorenz, 1963). It arises in the confrontation between conspecific individuals over limited resources (mates, food, shelter, territory), and it is resolved when one individual keeps the resource (dominant) and the other loses it (subordinate). Despite the universal occurrence of agonistic behavior, it always follows the same stages (evaluation, contest, and post-resolution) and usually includes aggressive displays during the contest phase to settle the conflict (Nelson, 2006; Summers and Winberg, 2006). Animals make a balance of costs and benefits in search of maximal fitness payoffs to make their decision of fighting or giving up. These decisions are the output of the profound evaluation process inherent to agonistic behavior and arise from the assessment of differences in the fighting ability and resource value between contenders (Maynard Smith and Parker, 1976; Morris et al., 1995; Parker and Rubenstein, 1981).

Understanding the control of aggression has been a longstanding aim of biology. The strong foundation of current knowledge is mostly built on studies on reproductive male aggression, which often requires gonadal androgens. Correlation between aggression and circulating androgens has been supported by castration–hormone replacement experiments (Balthazart, 1983; Borg, 1994; Demas et al., 2007; Huffman et al., 2012; Nelson, 2005; O'Connell et al., 2013; Uhrich, 1938; Wingfield and Hahn, 1994; Wingfield et al., 1990). Testosterone (T) partially affects aggression directly and also through its aromatization into estradiol (E) (Borg, 1994; Huffman et al., 2013; Matsumoto et al., 2003; O'Connell et al., 2013; Schlinger and Callard, 1990; Silverin et al., 2004;

* Corresponding author.
E-mail addresses: laura.quintana@gmail.com, lquintana@iibce.edu.uy (L. Quintana), lzubizarreta@fmed.edu.uy (L. Zubizarreta), ceciliajalabert@gmail.com (C. Jalabert), gervasio.batista@phd.einstein.yu.edu (G. Batista), rperrone@iibce.edu.uy (R. Perrone), asilva@iibce.edu.uy (A. Silva).
[1] Present address at: Department of Zoology, University of British Columbia, 2329 West Mall, Vancouver, BC, Canada.
[2] Present address at: Department of Neuroscience, Albert Einstein College of Medicine, 1300 Morris Park Avenue Bronx, NY, USA.

http://dx.doi.org/10.1016/j.jphysparis.2016.11.009
0928-4257/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Quintana, L., et al. Building the case for a novel teleost model of non-breeding aggression and its neuroendocrine control. J. Physiol. (2016), http://dx.doi.org/10.1016/j.jphysparis.2016.11.009

Toda et al., 2001). In addition to the changes of plasma hormone levels throughout the annual cycle, acute modifications in brain hormone levels can be produced by social behavior in a region-specific manner and with a rapid time course (Remage-Healey et al., 2008). Steroids can exert their neuromodulatory effects through nuclear hormone receptors and thus affect gene transcription on the scale of hours-days producing enduring effects associated with the breeding cycle (Etgen and Pfaff, 2010); or steroids can rapidly affect behavior in seconds-minutes by modifying neuronal excitability through non-genomic effects (Hayden-Hixson and Ferris, 1991; Lambert et al., 2003; Woolley, 2007).

Although androgens are clearly crucial modulators of male aggression in many vertebrates, the centrality of androgens as the main modulators of aggression needs to be revisited in at least two particular cases: (1) territorial aggression dissociated from the breeding season, and (2) aggression by females. Investigating aggression across sexes and seasons may lead to a more comprehensive understanding of its underlying neuroendocrine mechanisms.

Territorial aggression is generally associated with high androgen levels, but it may also occur when gonads are regressed and circulating androgen levels are low. This has been reported in birds (Gwinner et al., 1994; Logan and Wingfield, 1990; Soma et al., 1999; Wingfield, 1994; Wingfield et al., 1997), mammals (Caldwell et al., 1984; Demas et al., 2007; Jasnow et al., 2000), reptiles (Moore and Marler, 1987), and fish (Batista et al., 2012; Vullioud et al., 2013). Moreover, aggression can persist after castration (Christenson et al., 1973; Davis, 1957; Demas et al., 1999; Garrett and Campbell, 1980; Tiefer, 1970). Research on aggression outside breeding conditions, has brought forth the roles of non gonadal steroids in the control of this behavior. In the well-studied Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*) adrenocortical steroids are key modulators. Circulating dehydroepiandrosterone (DHEA), an adrenal androgen which can be converted into active sex steroids in the rodent brain (Tsutsui et al., 2000; Agis-Balboa et al., 2007), is elevated under short day treatment (Demas et al., 2004). It is proposed that DHEA converts to an active steroid influencing aggression (Scotti et al., 2009). This alternative hormonal control of aggression has also been reported in birds. Song sparrows (*Melospiza melodia*) also display non-breeding aggression that correlates to high circulating DHEA (Soma and Wingfield, 2001; reviewed in Soma et al., 2015) which can be converted into T and E in the brain (Pradhan et al., 2010). In particular, estrogens have been reported to have a pivotal role in the regulation of non-breeding aggression in the song sparrow (Soma et al., 2000b). These brain derived estrogens most probably act mainly through non-genomic mechanisms (Hau et al., 2000; Schlinger et al., 1992; Soma and Wingfield, 1999; Soma et al., 2000a,b; Trainor and Nelson, 2012).

Females, just like their male counterparts, sometimes use aggression to defend territories or other resources (Floody, 1983; Jaeger et al., 1982; LaPrade and Graves, 1982; Woodley and Moore, 1999; Yasukawa and Searcy, 1982). Aside from maternal aggression (Lonstein and Gammie, 2002; Rosenblatt et al., 1963), female aggressive behavior has received much less attention, with relatively little emphasis on its hormonal control. The few attempts to link circulating sex steroid hormones with female aggression have led to conflicting results: plasma T and/or E concentrations in females are associated with aggression in some species of birds (Gill et al., 2007; Langmore et al., 2002; Rosvall, 2013), mammals (Albert et al., 1992; Razzoli et al., 2003), reptiles (Rubenstein and Wikelski, 2005; Woodley and Moore, 1999), and fish (Desjardins et al., 2006); but not in other birds (Elekonich and Wingfield, 2000), mammals (Davis and Marler, 2003), and fish (Hay and Pankhurst, 2005). These results do not rule out a role of T and/or E in specific brain regions influencing aggression, as circulating precursors may be involved. Studies in the highly territorial female Siberian hamsters have shown that they display increased aggression outside of breeding (Scotti and Demas, 2007) and that DHEA is a key candidate for the regulation of aggression (Rendon and Demas, 2016). Females show increased aggression in short-day context, and interestingly, melatonin has been shown to coordinate a seasonal switch from gonadal to adrenal regulation of aggression (Rendon et al., 2015).

South American weakly electric fish (Order Gymnotiformes), are an important model to understand the neural basis of behavior. They produce and perceive electric organ discharges (EOD), which serve two critical functions: to sense objects in the environment, as the EOD is a self-generated carrier signal (active electrolocation) and to interact socially (electrocommunication) (reviewed in Caputi et al., 2005). The circuits generating the EOD have key elements in common with other vertebrate communication systems in that they are basically modified motor control systems: the organ that produces the signal, just like those in the birdsong and fish vocalization systems, is muscle-derived; it is innervated by spinal motor nuclei which, in turn, receive input from the hindbrain (reviewed in Bass, 1986). A key component of the system, the medullary pacemaker nucleus, fires spontaneously and controls the timing of each EOD, in a one-to-one fashion, in all weakly electric fish (reviewed in Caputi et al., 2005).

Non-breeding territorial aggression has been examined in only two teleost species: *Stegastes nigricans* (Ros et al., 2014; Vullioud et al., 2013) and *Gymnotus omarorum*. We have developed *G. omarorum* as a valuable model species to study the hormonal control of this form of aggression (Batista et al., 2012; Jalabert et al., 2015; Silva et al., 2013; Zubizarreta et al., 2012, 2015). This species has several strong advantages: its non-breeding territorial aggression is well characterized, males and females display equal levels of aggression and this aggression depends upon non-gonadal estrogenic pathways rather than gonadal hormones.

2. Behavioral characterization of non-breeding aggression in *Gymnotus omarorum*

Gymnotus omarorum displays a clear-cut example of pure territorial aggression (Batista et al., 2012; Silva et al., 2013; Zubizarreta et al., 2015). During the non-breeding season, when gonads are regressed and no reproductive motivation is expected to drive competence, males and females of this sexually monomorphic species fiercely defend territories in intrasexual and intersexual encounters. We have developed a careful behavioral protocol to describe this non-breeding territorial aggression.

We staged dyadic agonistic encounters between non-breeding adults *Gymnotus omarorum* in a behavioral arena in which space is the only resource animals fight for (Batista et al., 2012). Fish with the same previous experience and residence time were placed in equal-sized compartments separated by a removable glass gate. When the gate was lifted, all fish (in same-sex and opposite sex dyads) engaged in rapid agonistic encounters that were usually resolved in < 3 min with the establishment of a clear dominant-subordinate status (Fig. 1A). During conflicts, contenders evaluate the costs and benefits of continuing the fight or retreating, although it is not always possible to have clear evidence of this decision-making process. Taking advantage of the electric channel of communication, subordinates of *G. omarorum* make three distinct and consecutive decisions to signal their submission across phases (Fig. 1A): (1) subordinates first interrupt their EOD to hide from the dominant, (2) they then stop attacking and retreat, and (3) finally, they emit transient high-rate electric signals termed chirps This sequence of behaviors enable the subordinate to be more explicit in signaling its surrender.

Please cite this article in press as: Quintana, L., et al. Building the case for a novel teleost model of non-breeding aggression and its neuroendocrine control. J. Physiol. (2016), http://dx.doi.org/10.1016/j.jphysparis.2016.11.009

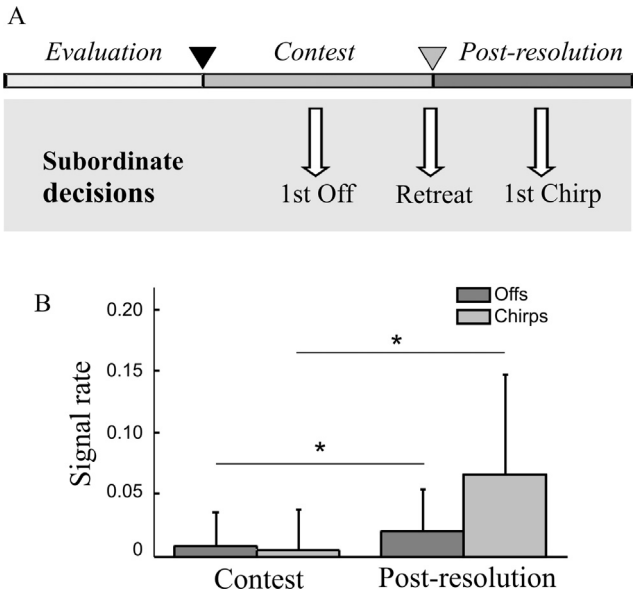

Fig. 1. Characteristics of *Gymnotus omarorum* agonistic behavior, and decisions of the subordinate fish. (A) Temporal structure of agonistic encounters. Agonistic behavior can be divided into three different stages: evaluation phase, from gate removal (time 0) to the occurrence of the first attack (black triangle); contest phase, from the occurrence of the first attack to conflict resolution (gray triangle); and post-resolution phase, 10 min after conflict resolution. In the shaded area, the decisions made by the subordinate fish are illustrated by arrows, in order of appearance: first, the EOD interruption, second the retreat, and third the emission of the first chirp in the post resolution phase. (B) Distribution of electric submission signals in different stages of agonistic behavior. Off rate and chirp rate increased from the contest to the post-resolution phase. Off and chirp rates were calculated dividing the number of offs and chirps produced in each phase by the duration of the phase in seconds. Values are expressed as medians, error bars represent interquartile range (IQR). IQR. *$p < 0.05$, Wilcoxon test, N = 25 and N = 21 respectively. Modified from Batista et al. (2012).

After the foundational work of Black-Cleworth (1970) on the agonistic behavior of *Gymnotus carapo*, more recent studies have reported distinctive agonistic electric displays, either produced by dominants or subordinates, in several species of South American electric fish (Fugère et al., 2011; Hagedorn and Zelick, 1989; Hupé and Lewis, 2008; Perrone et al., 2009; Triefenbach and Zakon, 2008; Westby, 1975a,b). Some electric signals have been interpreted as threats, such as abrupt rate changes (*G. carapo*, Black-Cleworth, 1970), and chirps (*Apteronotus leptorhynchus*, Triefenbach and Zakon, 2008; *Brachyhypopomus pinnicaudatus*, Perrone et al., 2009). On the other hand, cessations in the emission of electric signals (offs) have been recognized as general submissive displays in several species (Batista et al., 2012; Black-Cleworth, 1970; Westby, 1975a; Zubizarreta et al., 2012). In *G. omarorum,* only transient subordination electric signals, offs and chirps, have been identified (Batista et al., 2012). These signals are emitted in a sequential pattern of subordination that provides one of the best understood examples of the electric dialogue in electric fish. As expected for a graded signal of intention, offs are first emitted before contest resolution and gradually increase in rate and duration during the post-resolution phase (Fig. 1B). After resolution, the pattern of electric signaling changes; the subordinate continues to emit more frequent and longer duration offs and adds the emission of chirps as more unambiguous submission signals (Fig. 1B). As a continuous signal electrical subordination, the EOD rate of subordinates decreases after resolution (Silva et al., 2013) yielding a hierarchical EOD rate rank between dominants and subordinates as observed in other gymnotiform species (Fugère et al., 2011; Hagedorn and Heiligenberg, 1985; Hagedorn and Zelick, 1989; Silva et al., 2013; Westby, 1975a). In summary, *G. omarorum* employs different electric submission displays that decrease ambiguity in subordination signaling, and evince a complex decision-making process.

Aggression within agonistic encounters is usually a ritualized behavior, intended to demonstrate the power of one contender over the other and provide information to determine which one will win the contest rather than to cause injury or death. As part of the mutual evaluation among contenders during the agonistic encounter, aggression leads to displacing, or dominating another individual (Nelson, 2006). Contenders begin by displaying a relatively low cost aggressive behavior and only increase the intensity of interaction if they cannot settle (Jennings and Gammell, 2013). Once in contest, animals usually use progressively greater aggression to challenge the decision of their contender to escalate the fight and to drive them to subordination (Enquist and Leimar, 1983). As the contest escalates, variation in the performance of aggressive behaviors influences the decisions made by contenders to solve the conflict, thus influencing contest dynamics. In many agonistic interactions, non-aggressive displays are enough to evaluate relative fighting ability between contenders without the costs of engaging in injurious fights (Enquist et al., 1990; Koops and Grant, 1993; Pratt et al., 2003).

In *Gymnotus omarorum*, individuals immediately perform direct evaluation of fighting ability through aggression rather than remotely evaluating the contender through electrocommunication signals (Zubizarreta et al., 2015). This is remarkable and unexpected since (a) passive and active electric images of *G. omarorum* differ between contenders, so this information could be used remotely to evaluate the fighting ability of the adversary (Pedraja et al., 2016), and (b) electric fish encode body size in their EOD amplitudes (Gavassa et al., 2013). After the onset of this staged contest, both individuals perform aggressive displays (bites, nudges, nips and jaw locks) until the subordinate fish stops attacking and retreats. During this short phase of contest, dominants display higher levels of aggression than subordinates (Fig. 2A). On the other hand, the attack rates of both contenders are strongly correlated, suggesting an escalation in the conflict (Fig. 2B). In the experimental tank, in which subordinates cannot flee, the dominant fish persists in attacking the defeated contender after the contest resolution, forcing the emission of more unambiguous signals of surrender.

Theoretical models predict that the evaluation of fighting ability is important in defining different characteristics of agonistic encounters (Maynard Smith and Parker, 1976). Body size is the most common predictor of fighting ability across taxa, influencing the outcome (Jennions and Backwell, 1996; Umbers et al., 2012), timing (Enquist et al., 1990; Junior and Peixoto, 2013), and intensity of fights (Morris et al., 1995). If resource value is symmetric among contestants, contest outcome is expected to depend only on fighting ability asymmetries. Indeed, in *Gymnotus omarorum,* body size is the most important proxy of fighting ability, and hence, body mass difference between contenders is the only predictor of contest outcome; i.e., the heavier fish wins (Batista et al., 2012). Interestingly, size asymmetry also influences the three decisions of the subordinate: (1) electrical hiding (offs): body mass asymmetry is correlated negatively with first off latency; (2) retreat: body mass asymmetry is correlated negatively with contest duration; and (3) post-resolution chirping: body mass asymmetry is marginally correlated negatively with first chirp latency (Table 4 in Batista et al., 2012). In addition to body size, the intensity of aggression is also an indicator of fighting ability in *G. omarorum* (Zubizarreta et al., 2015). First, since aggression levels correlate with body mass, overt aggression is an indirect indicator of fighting ability (Zubizarreta et al., 2015). Secondly, the intensity of aggressive encounters may also be evaluated directly by contenders in decision-making. When subordinates are subjected to

Please cite this article in press as: Quintana, L., et al. Building the case for a novel teleost model of non-breeding aggression and its neuroendocrine control. J. Physiol. (2016), http://dx.doi.org/10.1016/j.jphysparis.2016.11.009

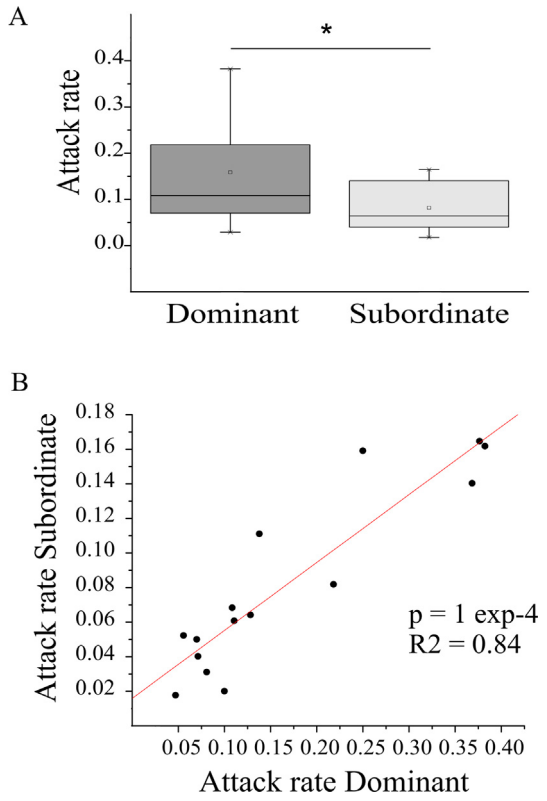

Fig. 2. Aggression levels of dominants and subordinates. (A) Box plot representation of differences in the attack rate between dominant and subordinate fish. Dominant fish displayed significantly higher aggression compared to subordinates. *p = 3 exp-5, Wilcoxon matched pairs test, N = 15. Modified from Zubizarreta et al. (2015). (B) During the contest phase, there was a significant positive correlation between the attack rate of dominants and subordinates. R2 = 0.84, p = 1 exp-4, N = 15. Modified from Zubizarreta et al. (2015). In both A and B, attack rate was calculated dividing the number of attacks by contest duration time in seconds and is expressed in attacks/s. Box plot in this figure and throughout: horizontal line represents median value; length of the box represents interquartile range, small square represents the mean value, crosses show minimum and maximum values.

more intense aggression during the contest phase, they more quickly signal submission with shorter latencies in producing offs (first decision), retreats (second decision), and chirps (third decision) (Fig. 3). Furthermore, the fact that the dominant attack rate is correlated negatively with contest duration (Zubizarreta et al., 2015), indicates that the intensity of aggression is evaluated directly between contenders, and that subordinates assess how hard they are attacked when signaling submission.

3. Aggression displayed by both males and females

Female contests, although less studied, follow the same general phases of agonistic encounters. However, sex differences in fighting ability, or life history (e.g., energy dedicated to reproduction), may cause males and females to differentially value contested resources or to employ sex-specific decision-making strategies during contests (Wofford et al., 2015). For example, in Texas cichlids *Herichthys cyanoguttatum* (Draud et al., 2004) males and females both show intrasexual aggression with the same behavioral repertoire. However, contest outcome is related to body size in males but not in females, suggesting female contests may be decided more often by the value of the contested resource than by asymmetries in their fighting ability. On the other hand, in Convict cichlids *Amatitlania nigrofasciata*, behavioral repertoires differed between sexes, but the outcome was influenced by body size in contests of either sex (Arnott and Elwood, 2009). The non-breeding territorial aggression of the sexually monomorphic *Gymnotus omarorum* provides a very clean example to test predictions of sex influence on contest outcome. *G. omarorum* is not expected to show dimorphic fighting ability as the sexes do not differ in body size. Indeed, Batista et al. (2012) demonstrated that contest outcome in *G. omarorum* is only influenced by body weight asymmetry, and that the individual sex and the sex-composition of the dyads (same or opposite sex) had no significant influence. Thus, we conclude that sexual asymmetries in resource value, if any, do not influence the outcome of agonistic contests in non-breeding conditions in this species.

During the breeding season, the asymmetry between sexes in resource value is undeniable even for territorial species with sexually monomorphic fighting abilities (Alexander, 1974). On the other hand, the fact that animals are in the non-breeding season does not itself imply that both sexes give equal value to territory. Sexual differences in the time structure and/or the intensity of fights may reflect sexual differences in decision-making, even in the absence of reproductive motivation. To further evaluate sex differences, we compared the dynamics of agonistic behavior in male-male and female-female dyads, focusing on the decisions made by subordinates, and the intensity of both aggression and submission. Males and females make the same behavioral decisions: potential subordinates produce offs in their electric signals (first decision), retreat repeatedly (second decision, Table 1) and chirp (third decision). Moreover, there were no sex differences in fight intensity, (i.e., attack rates of dominant and subordinate fish were not significantly different between sexes), or submission levels, (i.e., the rate of off and chirps were not significantly different between sexes) (Table 1). Therefore, both male and female non-breeding intrasexual contests in *Gymnotus omarorum* shared the same behavioral repertoire including the same sequential electric signaling of submission in which both males and females make the same decisions. Overall, we present strong evidence that both sexes not only have symmetric fighting abilities, but also give the same value to the resource they are fighting for during the non-breeding season.

Although male and female *Gymnotus omarorum* display indistinguishable non-breeding intrasexual aggression, they may differ in the underlying mechanisms, even if the same modulators are involved. In our studies on neuroendocrine mechanisms underlying non-breeding aggression, we must work with previously identified males and females, which is difficult to determine non-invasively as this species presents no morphological or electrophysiological sexual dimorphism (Richer-de-Forges et al., 2009). We validated a method of sex identification by visual inspection of gonads through a surgical incision, and then compared agonistic encounters between fish that were not identified prior to the experiment (intact) and those that were sexually identified (ID). There was no significant difference between the behavior of ID fish and intact fish in any of the variables studied, be it between males or between females. Morevoer, ID fish showed no differences in aggressive behavior between sexes (Table 1). This validation allowed us to improve our experimental design and to focus on the hormonal control mechanisms of intrasexual aggression. Given the scarcity of studies on female aggression, we believe *G. omarorum* will be an advantageous model system to contribute to the understanding of the control of vertebrate aggression.

4. Non breeding aggression is independent of gonadal hormones

Behaviors that are expressed similarly in different phases of the annual reproductive cycle probably do not have the same hormone

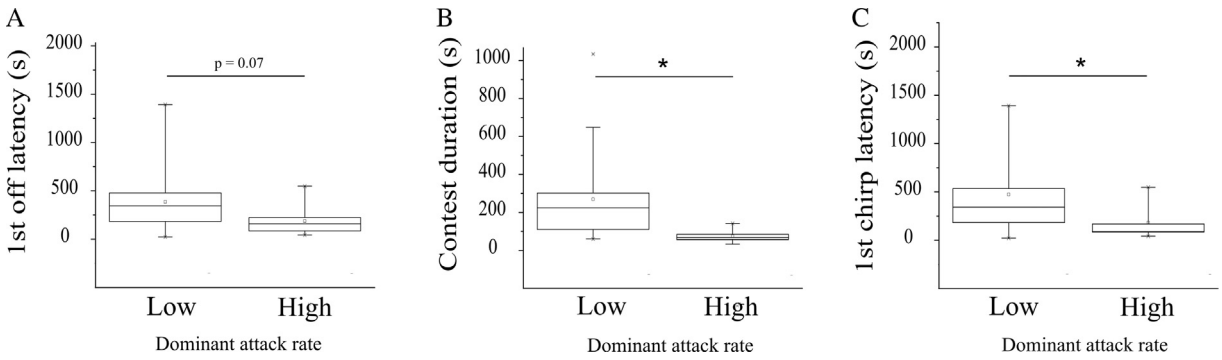

Fig. 3. Influence of dominant aggression levels on the decisions made by the subordinate fish. (A) Box plot representations of the subordinate's first decision (off emission) in two different conditions of dominant attack rate. When the subordinate fish was confronted with a higher dominant attack rate it decreased its latency to the first off, p = 0.075, Mann Whitney U test, Low N = 17, High N = 7. Modified from Zubizarreta et al. (2015). (B) Box plot representation of the subordinate's second decision (retreat) in two different conditions of dominant attack rate. When the subordinate fish was confronted with a higher dominant attack rate it decreased the contest duration, p = 0.001, Mann Whitney U test, Low N = 23, High N = 9. Modified from Zubizarreta et al. (2015). (C) Box plot representation of the subordinate's third decision (chirp emission) in two different conditions of dominant attack rate. When the subordinate fish was confronted with a higher dominant attack rate it decreased its latency to the first chirp latency, p = 0.048, Mann Whitney U test, Low N = 18, High N = 7. Modified from Batista et al. (2012). In A, B and C, attack rate was calculated dividing the number of attacks by contest duration time in seconds. In this representation, low aggression levels are attack rates < 0.2 attacks/s; and high aggression levels are attack rates from 0.2 to 0.4 attacks/s. Box plot description in legend of Fig. 2.

Table 1
Comparison of male and female intrasexual dyads in both intact and surgically identified (ID) contenders in their behavioral decisions, intensity of aggression and submission levels. Male-male and female-female dyadic encounters were performed before sexual identification of the fish (intact fish). ID male-male and ID female-female dyadic encounters were performed with fish with a previous gonadal inspection by surgical incision (ID fish). Values are expressed as medians, errors are expressed as median absolute deviation (MAD) between brackets, n values are shown below the MADs. Statistical comparison shows there is no significant difference between any of the groups, (overall comparison, Kruskal–Wallis test, p values in bottom row). Attack rate was calculated dividing the number of attacks by contest duration time in seconds, and is expressed in attacks per second. Off and chirp rate were calculated dividing the number of offs and chirps produced in the post-resolution phase by the duration of this phase in seconds. Latencies to first off and first chirp, and contest duration, are expressed in seconds. Absence of values is due to insufficient n.

Dyad	Latency off	Contest duration	Attack rate dominant	Attack rate subordinate	Off rate	Chirp rate
Male-male	38	78	0.21	0.11	0.02	0.05
	(20)	(21)	(0.16)	(0.05)	(0.02)	(0.043)
	7	9	9	9	9	9
Female-female	78	152	0.11	0.07	0.01	0.003
	(49)	(97)	(0.025)	(0.046)	(0.01)	(0.003)
	6	7	7	7	7	7
ID male-male	175	114	0.12	0.06	0.014	0
	(35)	(52)	(0.08)	(0.039)	(0.007)	(0)
	6	6	6	6	6	6
ID female-female	45	172	0.15	0.08	0.017	0.06
	(16)	(133)	(0.07)	(0.04)	(0.017)	(0.06)
	6	5	5	5	5	5
Overall comparison (p)	0.1	0.79	0.7	0.49	0.9	0.6

control mechanisms. Aggression, which is correlated to high circulating androgens during the breeding context, may be sustained by novel mechanisms after gonadal regression, ensuring robust aggressive behavior but avoiding the costs associated with prolonged high androgen levels (reviewed in Wingfield et al., 1990; Nelson, 2005). In this sense, the dependence of non breeding territorial aggression on estrogens raises the question the source of the steroids involved.

To evaluate commonalities in the underlying mechanisms of non-breeding aggression, we analyzed aggression in relation to gonadal hormones in *Gymnotus omarorum* by measuring the steroid response to dominance and by comparing agonistic behavior of castrated and intact males. Specifically, we measured circulating steroids in adults with no social stimuli and in those which had recently won an agonistic same-sex encounter. Plasma 11KT (the main gonadal androgen in teleosts) levels were similar in dominant and isolated males (Fig. 4A, Batista, 2011; Jalabert et al., 2015). Furthermore, plasma estrogen levels in dominant females, although variable, did not differ from those in isolated females (Fig. 4B, Zubizarreta et al., 2016).

Across vertebrates, the relationship between dominance and androgen levels in males is under constant revision. The Challenge Hypothesis predicts that agonistic encounters transiently increase circulating androgens, from breeding levels to a maximum physiological level (Wingfield et al., 1990). More recent studies have found that androgen levels can be transiently increased even in absence of social challenge, in response to the perceived outcome of an interaction, and that this increase likely modulates behavioral expression in subsequent social interactions (Oliveira and Oliveira, 2014; Oliveira, 2009). Our results are expected for animals in the non-breeding season, which have overall low levels of gonadal hormones. Studies in aggressive non-breeding males report an absence of circulating androgenic response to social challenge in many teleost species (Batista, 2011; Jalabert et al., 2015; Landys et al., 2007; Ros et al., 2014; Vullioud et al., 2013). Moreover, reports in non-breeding females also show no changes in plasma androgens (Vullioud et al., 2013) or estrogens (Hau et al., 2004) in response to social challenge. On the whole, aggression in the non-breeding season does not correlate with plasma concentrations of sex steroids.

To rule out the participation of all gonadal hormones in the control of aggression, we compared dyads of castrated males with those of intact males (Jalabert et al., 2015). Both gonadectomized (GDX) and sham gonadectomized (SH) dyads engaged in short,

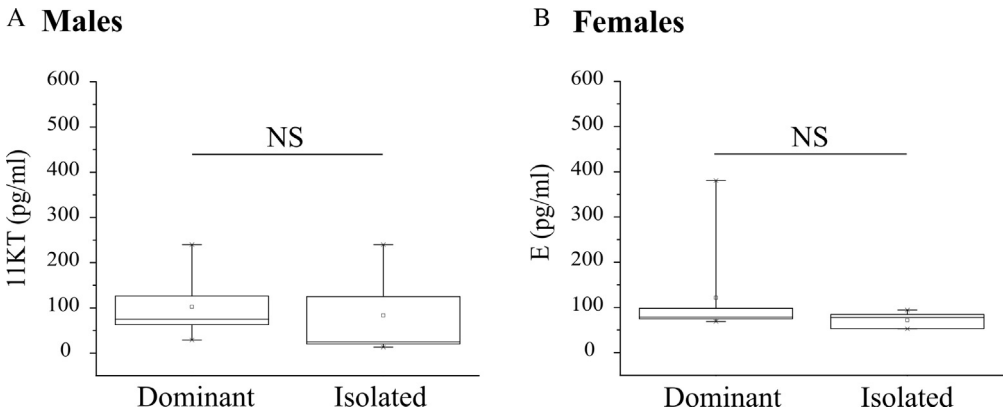

Fig. 4. Levels of circulating sex steroids hormones and dominance in males and females. (A) Box plot representation of circulating levels of 11-Ketotestosterone levels (pg/ml). Dominant 11KT levels did not differ from control (isolated) in males, p = 0.4, Mann Whitney U test, N = 6 in dominants and controls. Modified from Jalabert et al. (2015). (B) Box plot representation of circulating levels of 17-B Estradiol (pg/ml). Dominant E levels did not differ from control (isolated) in females, p = 0.19, Mann Whitney U test, dominants N = 7, controls N = 7. In A and B, dominants animals were bled 10 min after conflict resolution and isolated animals were subjected to the same manipulations as dominants. Plasmatic levels of 11KT and E were measured using enzyme linked immunoassay kits (Cayman Chemical Co. for 11KT, and IBL International for E). Box plot description in legend of Fig. 2.

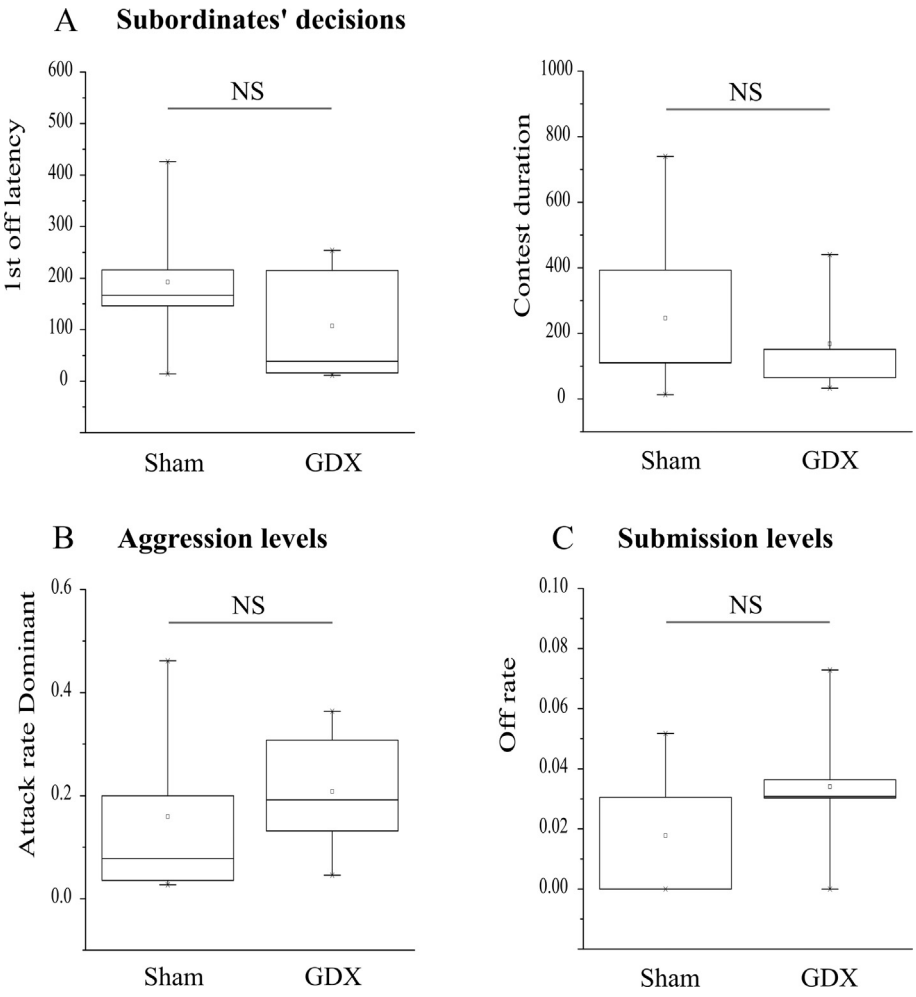

Fig. 5. Effects of gonadectomy on male-male agonistic behavior. (A) Box plot representation of the decisions made by the subordinate fish. Gonadectomized fish (GDX) showed no significant difference in comparison to control sham-gonadectomized (Sham) fish in their latency to the first off, p = 0.54 Mann Whitney U test, nor in their contest duration, p = 0.97, Mann Whitney U test, Sham N = 6, GDX N = 5. Latency and duration are expressed in seconds. (B) Box plot representation of aggression levels. Gonadectomy had no effect on dominant attack rate, p = 0.53 Mann Whitney U test, Sham N = 6, GDX N = 5. Attack rate was calculated dividing the number of attacks by contest duration time in seconds and it is expressed in attacks/s. (C) Box plot representation of submission levels. Gonadectomy does not affect off rate, p = 0.27 Mann Whitney U test, Sham N = 6, GDX N = 5. Off rate was calculated dividing the number of EOD interruptions by the duration of the post resolution phase, and it is expressed in offs/s. Modified from Jalabert et al. (2015). Box plot description in legend of Fig. 2.

Please cite this article in press as: Quintana, L., et al. Building the case for a novel teleost model of non-breeding aggression and its neuroendocrine control. J. Physiol. (2016), http://dx.doi.org/10.1016/j.jphysparis.2016.11.009

aggressive contests, typical for the species. The subordinate fish displayed the electric (EOD interruptions) and locomotor (retreats) signals of submission with no difference in timing between treatment groups (Fig. 5A). The intensity of displays was also equally expressed: attack rate of dominant GDX fish showed no significant difference in comparison to SH (Fig. 5B), while the off rate displayed by subordinate fish was also indistinguishable between GDX and SH individuals (Fig. 5C). This proves that non-breeding aggression in males is independent of all gonadal hormones (Jalabert et al., 2015).

5. First report on the role of estradiol in teleost non-breeding aggression

Aggression has been shown to be estrogen-dependent in non-breeding birds and aromatase, which converts androgen to estradiol, is highly expressed in brain regions underlying social behavior (Soma et al., 2003; Wacker et al., 2010). The source of androgen substrate for brain aromatase could be adrenal DHEA, shown to have a key role in regulation of aggression in the aforementioned well-studied Siberian hamster and song sparrow models (reviewed in Soma et al., 2015). Alternatively, *de novo* brain synthesis of steroids may also regulate non-breeding aggression, as key enzymes have been identified in the brains of birds (Tsutsui et al., 2003; Tsutsui and Yamazaki, 1995; Tsutsui, 2011) and mammals (Corpechot et al., 1981).

In our studies of *Gymnotus omarorum* we showed that aggression depends on normal aromatase activity. We analyzed agonistic behavior in dyads in which the potentially dominant contender, the one with the heaviest body weight, was injected with the inhibitor of aromatase, Fadrozole (FAD) (Jalabert et al., 2015). After FAD administration, agonistic behavior was distorted, and dominance could no longer be predicted by body size asymmetry (prediction that can be made for the control group injected with the vehicle solution). In one third of the cases, dominant–subordinate ranks did not emerge, as fights were not resolved, and in other cases the outcome was reversed. In all, large males became dominant in only one fourth of the contests. Aromatase inhibition also significantly decreased the aggression levels of potential dominants. The fast effect of the inhibition on the aggression suggests that the underlying mechanisms involve rapid estrogenic non-genomic signaling mechanisms (Cornil and Charlier, 2010), as has been reported in non-breeding aggressive behavior in mammals and birds (reviewed in Trainor and Nelson, 2012). There is not yet data on the source of estrogens regulating non-breeding aggression in this species. Teleosts have the capability of producing DHEA (reviewed in Tokarz et al., 2015) and low circulating levels of DHEA have been reported in the eel *Anguila japonica*(Matsubara et al., 2005). Moreover, zebrafish (*Danio rerio*) has been reported to have brain steroidogenic enzymes which enable not only the possibility of converting circulating precursors to active sex steroids, but also *de novo* synthesis from cholesterol (Diotel et al., 2011).

Steroid hormones in the breeding season have multiple roles. They coordinate physiological and behavior functions and their levels are, in turn, modulated by social performance. The adaptive function of the social modulation of androgen levels may be to fine tune the expression of androgen-dependent behavior according to the perceived social environment (Oliveira and Oliveira, 2014). In the non-breeding season, animals do not display reproductive behavior and face less diversity of social information to process and integrate into their decision making, their repertoire of social behaviors is narrower, and their reproductive axis is at rest. In this scenario, localized brain derived estrogen may take a lead role in the control of aggression. *Gymnotus omaromum*, as the Siberian hamster and the song sparrow, displays aggression all year long, independent of gonadal hormones (revised in Soma et al., 2015). This behavior is strongly dependent on the estrogenic pathway, as has been shown in the sparrow (Soma et al., 2000b), and the source of these key hormones is currently under study. It is a species with exciting prospects for valuable contributions to understanding the hormonal control of aggression. Moreover, it adds a teleost species to the current mammal and bird models which will allow a better comprehension of the commonalities of this regulation across taxa.

Acknowledgments

All research procedures complied with ASAP/ABS Guidelines for the Use of Animals in Research and were approved by the Universidad de la República Institutional Ethical Committee (Comisión Bioética, Instituto Clemente Estable, MEC, 07-28-2008 and 007/02/2010). This research was supported by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (projects: FCE2007_569, FCE2009_2472, FCE2009_2657, FCE 104272 and FCE 100485) and Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA). We are very grateful to Ruta Cientonueve for the helpful comments and editing advice.

References

Agis-Balboa, R., Pinna, G., Pibiri, F., Kadriu, B., Costa, E., Guidotti, A., 2007. Downregulation of neurosteroid biosynthesis in corticolimbic circuits mediates social isolation-induced behavior in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. 104, 18736–18741.

Albert, D., Jonik, R., Walsh, M., 1992. Hormone-dependent aggression in male and female rats: experiential, hormonal, and neural foundations. Neurosci. Biobehav. Rev. 16 (2), 177–192.

Alexander, R.D., 1974. The evolution of social behavior. Annu. Rev. Ecol. Syst., 325–383

Arnott, G., Elwood, R.W., 2009. Assessment of fighting ability in animal contests. Anim. Behav. 77 (5), 991–1004.

Balthazart, J., 1983. Hormonal correlates of behavior. Avian Biol. 7, 221–365.

Bass, A.H., 1986. Electric organs revisited: evolution of a vertebrate communication and orientation system. In: Bullock, T.H., Heiligenberg, W. (Eds.), Electroreception. John Wiley & Sons, Inc New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.

Batista, G., 2011. Agresión territorial fuera del período reproductivo. Efecto de la experiencia social previa sobre la conducta agonística de Gymnotus omarorum. PEDECIBA, Montevideo.

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*. Anim. Behaviour Monogr. 3, 1–77.

Borg, B., 1994. Androgens in teleost fishes. Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 109 (3), 219–245.

Caldwell, G.S., Glickman, S.E., Smith, E.R., 1984. Seasonal aggression independent of seasonal testosterone in wood rats. Proc. Natl. Acad. Sci. 81 (16), 5255–5257.

Caputi, A., Carlson, B., Macadar, O., 2005. Electric organs and their control. In: Bullock, T.H., Hopkins, C.D., Popper, A.N., Fay, R.R. (Eds.), Electroreception. Springer, New York, pp. 410–451.

Cornil, C.A., Charlier, T.D., 2010. Rapid behavioural effects of oestrogens and fast regulation of their local synthesis by brain aromatase. J. Neuroendocrinol. 22 (7), 664–673.

Corpechot, C., Robel, P., Axelson, M., Sjovall, J., Baulieu, E.E., 1981. Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78 (8), 4704–4707.

Christenson, T., Wallen, K., Brown, B.A., Glickman, S.E., 1973. Effects of castration, blindness and anosmia on social reactivity in the male Mongolian gerbil (Meriones unguiculatus). Physiol. Behav. 10 (6), 989–994.

Davis, D.E., 1957. Aggressive behavior in castrated starlings. Science 126 (3267), 253.

Davis, E.S., Marler, C.A., 2003. The progesterone challenge: steroid hormone changes following a simulated territorial intrusion in female Peromyscus californicus. Horm. Behav. 44 (3), 185–198.

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: Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology. Springer, US, pp. 337–372.

Demas, G., Polacek, K., Durazzo, A., Jasnow, A., 2004. Adrenal hormones mediate melatonin-induced increases in aggression in male Siberian hamsters (Phodopus sungorus). Horm. Behav. 46, 582–591.

Demas, G.E., Moffatt, C.A., Drazen, D.L., Nelson, R.J., 1999. Castration does not inhibit aggressive behavior in adult male prairie voles (Microtus ochrogaster). Physiol. Behav. 66 (1), 59–62.
Desjardins, J.K., Hazelden, M.R., Van der Kraak, G.J., Balshine, S., 2006. Male and female cooperatively breeding fish provide support for the "Challenge Hypothesis". Behav. Ecol. 17 (2), 149–154.
Diotel, N., Do Rego, J.L., Anglade, I., Vaillant, C., Pellegrini, E., Gueguen, M.M., Mironov, S., Vaudry, H., Kah, O., 2011. Activity and expression of steroidogenic enzymes in the brain of adult zebrafish. Eur. J. Neurosci. 34, 45–56.
Draud, M., Macías-Ordóñez, R., Verga, J., Itzkowitz, M., 2004. Female and male Texas cichlids (Herichthys cyanoguttatum) do not fight by the same rules. Behav. Ecol. 15 (1), 102–108.
Elekonich, M.M., Wingfield, J.C., 2000. Seasonality and hormonal control of territorial aggression in female song sparrows (Passeriformes: Emberizidae: Melospiza melodia). Ethology 106 (6), 493–510.
Enquist, M., Leimar, O., 1983. Evolution of fighting behaviour: decision rules and assessment of relative strength. J. Theor. Biol. 102 (3), 387–410.
Enquist, M., Leimar, O., Ljungberg, T., Mallner, Y., Segerdahl, N., 1990. A test of the sequential assessment game: fighting in the cichlid fish *Nannacara anomala*. Anim. Behav. 40 (1), 1–14.
Etgen, A.M., Pfaff, D.W., 2010. Molecular Mechanisms of Hormone Actions on Behavior. Academic Press.
Floody, O.R., 1983. Hormones and aggression in female mammals. In: Svare, B.B. (Ed.), Hormones and Aggressive Behavior. Springer, US, Boston, MA, pp. 39–89.
Fugère, V., Ortega, H., Krahe, R., 2011. Electrical signalling of dominance in a wild population of electric fish. Biol. Lett. 7 (2), 197–200.
Garrett, J.W., Campbell, C.S., 1980. Changes in social behavior of the male golden hamster accompanying photoperiodic changes in reproduction. Horm. Behav. 14 (4), 303–318.
Gavassa, S., Goldina, A., Silva, A.C., Stoddard, P.K., 2013. Behavioral ecology, endocrinology and signal reliability of electric communication. J. Exp. Biol. 216 (13), 2403–2411.
Gill, S.A., Alfson, E.D., Hau, M., 2007. Context matters: female aggression and testosterone in a year-round territorial neotropical songbird (Thryothorus leucotis). Proc. R. Soc. B: Biol. Sci. 274 (1622), 2187–2194.
Gwinner, E., Rödl, T., Schwabl, H., 1994. Pair territoriality of wintering stonechats: behaviour, function and hormones. Behav. Ecol. Sociobiol. 34 (5), 321–327.
Hagedorn, M., Heiligenberg, W., 1985. Court and spark: electric signals in the courtship and mating of gymnotoid fish. Anim. Behav. 33 (1), 254–265.
Hagedorn, M., Zelick, R., 1989. Relative dominance among males is expressed in the electric organ discharge characteristics of a weakly electric fish. Anim. Behav. 38, 520–525.
Hau, M., Stoddard, S.T., Soma, K.K., 2004. Territorial aggression and hormones during the non-breeding season in a tropical bird. Horm. Behav. 45 (1), 40–49.
Hau, M., Wikelski, M., Soma, K.K., Wingfield, J.C., 2000. Testosterone and year-round territorial aggression in a tropical bird. Gen. Comp. Endocrinol. 117 (1), 20–33.
Hay, A., Pankhurst, N.W., 2005. Effect of paired encounters on plasma androgens and behaviour in males and females of the spiny damselfish Acanthochromis polyacanthus. Mar. Freshwater Behav. Physiol. 38 (2), 127–138.
Hayden-Hixson, D.M., Ferris, C.F., 1991. Steroid-specific regulation of agonistic responding in the anterior hypothalamus of male hamsters. Physiol. Behav. 50 (4), 793–799.
Huffman, L.S., Mitchell, M.M., O'Connell, L.A., Hofmann, H.A., 2012. Rising StARs: Behavioral, hormonal, and molecular responses to social challenge and opportunity. Horm. Behav. 61 (4), 631–641.
Huffman, L.S., O'Connell, L.A., Hofmann, H.A., 2013. Aromatase regulates aggression in the African cichlid fish *Astatotilapia burtoni*. Physiol. Behav. 112, 77–83.
Hupé, G.J., Lewis, J.E., 2008. Electrocommunication signals in free swimming brown ghost knifefish, *Apteronotus leptorhynchus*. J. Exp. Biol. 211 (10), 1657–1667.
Jaeger, R.G., Kalvarsky, D., Shimizu, N., 1982. Territorial behaviour of the red-backed salamander: expulsion of intruders. Anim. Behav. 30 (2), 490–496.
Jalabert, C., Quintana, L., Pessina, P., Silva, A., 2015. Extra-gonadal steroids modulate non-breeding territorial aggression in weakly electric fish. Horm. Behav. 72, 60–67.
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*). Horm. Behav. 38 (2), 102–110.
Jennings, D.I., Gammell, M.P., 2013. Contest behaviour in ungulates. Animal contests, 304.
Jennions, M.D., Backwell, P.R.Y., 1996. Residency and size affect fight duration and outcome in the fiddler crab *Uca annulipes*. Biol. J. Linn. Soc. 57 (4), 293–306.
Junior, R.S.L., Peixoto, P.E.C., 2013. Males of the dragonfly *Diastatops obscura* fight according to predictions from game theory models. Anim. Behav. 85 (3), 663–669.
King, J.A., 1973. The ecology of aggressive behavior. Annu. Rev. Ecol. Syst. 4, 117–138.
Koops, M.A., Grant, J.W.A., 1993. Weight asymmetry and sequential assessment in convict cichlid contests. Can. J. Zool. 71 (3), 475–479.
Lambert, J.J., Belelli, D., Peden, D.R., Vardy, A.W., Peters, J.A., 2003. Neurosteroid modulation of GABAA receptors. Prog. Neurobiol. 71 (1), 67–80.
Landys, M.M., Goymann, W., Raess, M., Slagsvold, T., 2007. Hormonal responses to male-male social challenge in the blue tit Cyanistes caeruleus: single-broodedness as an explanatory variable. Physiol. Biochem. Zool. 80 (2), 228–240.
Langmore, N., Cockrem, J., Candy, E., 2002. Competition for male reproductive investment elevates testosterone levels in female dunnocks, Prunella modularis. Proc. R. Soc. London B: Biol. Sci. 269 (1508), 2473–2478.
LaPrade, H.R., Graves, H.B., 1982. Polygyny and female-female aggression in red-winged blackbirds (Agelaius phoeniceus). Am. Nat. 120 (1), 135–138.
Logan, C.A., Wingfield, J.C., 1990. Autumnal territorial aggression is independent of plasma testosterone in mockingbirds. Horm. Behav. 24 (4), 568–581.
Lonstein, J.S., Gammie, S.C., 2002. Sensory, hormonal, and neural control of maternal aggression in laboratory rodents. Neurosci. Biobehav. Rev. 26 (8), 869–888.
Lorenz, K., 1963. On Aggression. Harcourt, Brace and World, New York.
Matsumoto, T., Honda, S.i., Harada, N., 2003. Alteration in sex-specific behaviors in male mice lacking the aromatase gene. Neuroendocrinology 77 (6), 416–424.
Matsubara, H., Lokman, P.M., Kazeto, Y., Adachi, S., Yamauchi, K., 2005. Serum steroid profiles in artificially maturing female Japanese eel, Anguilla japonica. Aquaculture 243 (1), 393–402.
Maynard Smith, J., Parker, G.A., 1976. The logic of asymmetric contests. Anim. Behav. 24, 159–175.
Moore, M.C., Marler, C.A., 1987. Effects of testosterone manipulations on nonbreeding season territorial aggression in free-living male lizards, Sceloporus jarrovi. Gen. Comp. Endocrinol. 65 (2), 225–232.
Morris, M., Gass, L., Ryan, M., 1995. Assessment and individual recognition of opponents in the pygmy swordtails *Xiphophorus nigrensis* and *X. multilineatus*. Behav. Ecol. Sociobiol. 37 (5), 303–310.
Nelson, R.J., 2005. An Introduction to Behavioral Endocrinology. Sinauer Associates.
Nelson, R.J., 2006. Biology of Aggression. Oxford University Press.
O'Connell, L.A., Ding, J.H., Hofmann, H.A., 2013. Sex differences and similarities in the neuroendocrine regulation of social behavior in an African cichlid fish. Horm. Behav. 64 (3), 468–476.
Oliveira, G.A., Oliveira, R., 2014. Androgen responsiveness to competition in humans: the role of cognitive variables. Neurosci. Neuroecon. 3, 19–32.
Oliveira, R.F., 2009. Social behavior in context: hormonal modulation of behavioral plasticity and social competence. Integr. Comp. Biol. 49 (4), 423–440.
Parker, G.A., Rubenstein, D.I., 1981. Role assessment, reserve strategy, and acquisition of information in asymmetric animal conflicts. Anim. Behav. 29, 221–240.
Pedraja, F., Perrone, R., Silva, A., Budelli, R., 2016. Passive and active electroreception during agonistic encounters in the weakly electric fish Gymnotus omarorum. Bioinspiration & Biomimetics in revision.
Perrone, R., Macadar, O., Silva, A., 2009. Social electric signals in freely moving dyads of *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. J. Comp. Physiol. A 195 (5), 501–514.
Pradhan, D.S., Newman, A.E.M., Wacker, D.W., Wingfield, J.C., Schlinger, B.A., Soma, K.K., 2010. Aggressive interactions rapidly increase androgen synthesis in the brain during the non-breeding season. Horm. Behav. 57, 381–389.
Pratt, A.E., McLain, D.K., Lathrop, G.R., 2003. The assessment game in sand fiddler crab contests for breeding burrows. Anim. Behav. 65 (5), 945–955.
Razzoli, M., Cushing, B.S., Carter, C.S., Valsecchi, P., 2003. Hormonal regulation of agonistic and affiliative behavior in female mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). Horm. Behav. 43 (5), 549–553.
Rendon, N.M., Demas, G.E., 2016. Bi-directional actions of dehydroepiandrosterone and aggression in female Siberian hamsters. J. Exp. Zool. Part A: Ecol. Genet. Physiol. 325 (2), 116–121.
Rendon, N.M., Rudolph, L.M., Sengelaub, D.R., Demas, G.E., 2015. The agonistic adrenal: melatonin elicits female aggression via regulation of adrenal androgens. Proc. R. Soc. B. R. Soc., 282(1819), 2015–2080.
Remage-Healey, L., Maidment, N.T., Schlinger, B.A., 2008. Forebrain steroid levels fluctuate rapidly during social interactions. Nat. Neurosci. 11 (11), 1327–1334.
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 (3), 538–544.
Ros, A.F., Vullioud, P., Bruintjes, R., Vallat, A., Bshary, R., 2014. Intra-and interspecific challenges modulate cortisol but not androgen levels in a year-round territorial damselfish. J. Exp. Biol. 217 (10), 1768–1774.
Rosenblatt, J.S., Lehrman, D.S., Rheingold, H.L., 1963. Maternal Behavior of the Laboratory Rat. Institute of Animal Behavior, Rutgers University.
Rosvall, K.A., 2013. Life history trade-offs and behavioral sensitivity to testosterone: an experimental test when female aggression and maternal care co-occur. PLoS One 8 (1), e54120.
Rubenstein, D.R., Wikelski, M., 2005. Steroid hormones and aggression in female Galápagos marine iguanas. Horm. Behav. 48 (3), 329–341.
Schlinger, B.A., Callard, G.V., 1990. Aggressive behavior in birds: an experimental model for studies of brain-steroid inteactions. Comp. Biochem. Physiol. A Physiol. 97 (3), 307–316.
Schlinger, B.A., Slotow, R.H., Arnold, A.P., 1992. Plasma estrogens and brain aromatase in winter white-crowned sparrows. Ornis Scandinavica (Scandinavian Journal of Ornithology) 23 (3), 292–297.
Scotti, M.A., Demas, G.E., 2007. Photoperiodic changes in aggression are independent of gonadal steroids in female Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). Horm. Behav. 52, 183–190.
Scotti, M.A., Newman, A.E.M., Schmidt, K.L., Bonu, T.N., Soma, K.K., Demas, G.E., 2009. Aggressive encounters differentially affect circulating androgen levels in male Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). Horm. Behav. 56, 376–381.
Silva, A.C., Perrone, R., Zubizarreta, L., Batista, G., Stoddard, P.K., 2013. Neuromodulation of the agonistic behavior in two species of weakly electric fish that display different types of aggression. J. Exp. Biol. 216 (13), 2412–2420.

Please cite this article in press as: Quintana, L., et al. Building the case for a novel teleost model of non-breeding aggression and its neuroendocrine control. J. Physiol. (2016), http://dx.doi.org/10.1016/j.jphysparis.2016.11.009

Silverin, B., Baillien, M., Balthazart, J., 2004. Territorial aggression, circulating levels of testosterone, and brain aromatase activity in free-living pied flycatchers. Horm. Behav. 45 (4), 225–234.

Soma, K., Wingfield, J., 1999. Endocrinology of aggression in the nonbreeding season. Proc. Int. Ornithol. Cong., 1606–1620

Soma, K.K., Wingfield, J.C., 2001. Dehydroepiandrosterone in songbird plasma: seasonal regulation and relationship to territorial aggression. Gen. Comp. Endocrinol. 123 (2), 144–155.

Soma, K.K., Rendon, N.M., Boonstra, R., Albers, H.E., Demas, G.E., 2015. DHEA effects on brain and behavior: insights from comparative studies of aggression. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 145, 261–272.

Soma, K.K., Schlinger, B.A., Wingfield, J.C., Saldanha, C.J., 2003. Brain aromatase, 5α-reductase, and 5β-reductase change seasonally in wild male song sparrows: Relationship to aggressive and sexual behavior. J. Neurobiol. 56 (3), 209–221.

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. Gen. Comp. Endocrinol. 115 (3), 442–453.

Soma, K.K., Sullivan, K.A., Tramontin, A.D., Saldanha, C.J., Schlinger, B.A., Wingfield, J. C., 2000a. Acute and chronic effects of an aromatase inhibitor on territorial aggression in breeding and nonbreeding male song sparrows. J. Comp. Physiol. A. 186 (7–8), 759–769.

Soma, K.K., Tramontin, A.D., Wingfield, J.C., 2000b. Oestrogen regulates male aggression in the non–breeding season. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 267 (1448), 1089–1096.

Summers, C.H., Winberg, S., 2006. Interactions between the neural regulation of stress and aggression. J. Exp. Biol. 209 (23), 4581–4589.

Tiefer, L., 1970. Gonadal hormones and mating behavior in the adult golden hamster. Horm. Behav. 1 (3), 189–202.

Toda, K., Saibara, T., Okada, T., Onishi, S., Shizuta, Y., 2001. A loss of aggressive behaviour and its reinstatement by oestrogen in mice lacking the aromatase gene (Cyp19). J. Endocrinol. 168 (2), 217–220.

Tokarz, J., Möller, G., de Angelis, M.H., Adamski, J., 2015. Steroids in teleost fishes: a functional point of view. Steroids 103, 123–144.

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

Triefenbach, F., Zakon, H., 2008. Changes in signalling during agonistic interactions between male weakly electric knifefish, *Apteronotus leptorhynchus*. Anim. Behav. 75, 1263–1272.

Tsutsui, K., 2011. Neurosteroid biosynthesis and function in the brain of domestic birds front. Endocrinology 2, 37.

Tsutsui, K., Sakamoto, H., Ukena, K., 2003. A novel aspect of the cerebellum: biosynthesis of neurosteroids in the Purkinje cell. The Cerebellum 2 (3), 215–222.

Tsutsui, K., Ukena, M., Usui, H., Sakamoto, M..Takase., 2000. Novel brain function: biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons. Neurosci. Res. 36, 261–273.

Tsutsui, K., Yamazaki, T., 1995. Avian neurosteroids. I. Pregnenolone biosynthesis in the quail brain. Brain Res. 678 (1), 1–9.

Uhrich, J., 1938. The social hierarchy in albino mice. J. Comp. Psychol. 25 (2), 373–413.

Umbers, K.D., Osborne, L., Keogh, J.S., 2012. The effects of residency and body size on contest initiation and outcome in the territorial dragon, *Ctenophorus decresii*. PLoS One 7 (10), e47143.

Vullioud, P., Bshary, R., Ros, A.F.H., 2013. Intra-and interspecific aggression do not modulate androgen levels in dusky gregories, yet male aggression is reduced by an androgen blocker. Horm. Behav. 64 (3), 430–438.

Wacker, D.W., Wingfield, J.C., Davis, J.E., Meddle, S.L., 2010. Seasonal changes in aromatase and androgen receptor, but not estrogen receptor mRNA expression in the brain of the free-living male song sparrow, Melospiza melodia morphna. J. Comp. Neurol. 518 (18), 3819–3835.

Westby, G., 1975a. Further analysis of the individual discharge characteristics predicting social dominance in the electric fish. Anim. Behav. 23, 249–260.

Westby, G.W.M., 1975b. Comparative studies of the aggressive behaviour of two gymnotid electric fish (Gymnotus carapo and Hypopomus artedi). Anim. Behav. 23, 192–213.

Wingfield, J.C., 1994. Regulation of territorial behavior in the sedentary song sparrow, *Melospiza melodia morphna*. Horm. Behav. 28 (1), 1–15.

Wingfield, J.C., Hahn, T.P., 1994. Testosterone and territorial behaviour in sedentary and migratory sparrows. Anim. Behav. 47 (1), 77–89.

Wingfield, J.C., Hegner, R.E., Dufty, A.M., Ball, G.F., 1990. The "Challenge Hypothesis": Theoretical implications for patterns of testosterone secretion, mating systems, and breeding strategies. Am. Nat. 136 (6), 829–846.

Wingfield, J.C., Jacobs, J., Hillgarth, N., 1997. Ecological constraints and the evolution of hormone-behavior interrelationships. Ann. N. Y. Acad. Sci. 807 (1), 22–41.

Wofford, S.J., Earley, R.L., Moore, P.A., 2015. Evidence for assessment disappears in mixed-sex contests of the crayfish, Orconectes virilis. Behaviour 152 (7–8), 995–1018.

Woodley, S.K., Moore, M.C., 1999. Female territorial aggression and steroid hormones in mountain spiny lizards. Anim. Behav. 57 (5), 1083–1089.

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

Yasukawa, K., Searcy, W.A., 1982. Aggression in female red-winged blackbirds: a strategy to ensure male parental investment. Behav. Ecol. Sociobiol. 11 (1), 13–17.

Zubizarreta, L., Perrone, R., Stoddard, P.K., Costa, G., Silva, A., 2012. Differential serotonergic modulation of two types of aggression in weakly electric fish. Front. Behav. Neurosci. 6.

Zubizarreta, L., Quintana, L., Guimaraes Moreira, R., Honji, R.M., Silva, A., 2016. The Role of estradiol underlying non-breeding territorial aggression in a teleost fish: a complementary approach from the field and the lab XII International Society for Neuroethology Congress Montevideo.

Zubizarreta, L., Stoddard, P.K., Silva Barbato, A.C., 2015. Aggression levels affect social interaction in the non-breeding territorial aggression of the weakly electric fish, Gymnotus omarorum. Ethology 121 (1), 8–16.

Please cite this article in press as: Quintana, L., et al. Building the case for a novel teleost model of non-breeding aggression and its neuroendocrine control. J. Physiol. (2016), http://dx.doi.org/10.1016/j.jphysparis.2016.11.009

Physiology & Behavior 220 (2020) 112883

Contents lists available at ScienceDirect

Physiology & Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/physbeh

The estrogenic pathway modulates non-breeding female aggression in a teleost fish

Lucía Zubizarreta[a,b], Ana C. Silva[b,c], Laura Quintana[b,*]

[a] Laboratorio de Neurofisiología Celular y Sináptica, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Avenida Gral. Flores 2125, Montevideo, Uruguay

[b] Unidad Bases Neurales de la Conducta, Departamento de Neurofisiología Celular y Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Avenida Italia 3318, Montevideo, Uruguay

[c] Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Keywords:
Territorial aggression
Cyproterone acetate
Fadrozole
Gymnotiformes

ABSTRACT

Aggressive behaviors are widespread among animals and are critical in the competition for resources. The physiological mechanisms underlying aggression have mostly been examined in breeding males, in which gonadal androgens, acting in part through their aromatization to estrogens, have a key role. There are two alternative models that contribute to further understanding hormonal mechanisms underlying aggression: aggression displayed in the non-breeding season, when gonadal steroids are low, and female aggression. In this study we approach, for the first time, the modulatory role of estrogens and androgens upon non-breeding aggression in a wild female teleost fish. We characterized female aggression in the weakly electric fish *Gymnotus omarorum* and carried out acute treatments 1 h prior to agonistic encounters in dyads treated with either an aromatase inhibitor or an antagonist of androgen receptors. Anti-androgen treatment had no effect on behavior whereas acute aromatase inhibition caused a strong distortion of aggressive behavior. Territorial non-breeding aggression was robust and depended on rapid estrogen actions to maintain high levels of aggression, and ultimately reach conflict resolution from which dominant/subordinate status emerged. Our results, taken together with our own reports in males and the contributions from non-breeding aggression in bird and mammal models, suggest a common strategy involving fast-acting estrogens in the control of this behavior across species. In addition, further analysis of female non-breeding aggression may shed light on potential sexual differences in the fine tuning of social behaviors.

1. Introduction

Aggressive behaviors are widespread among animals, and they are key in the competition for resources such as food, shelter, and mating opportunities. The study of the endocrine regulation of territorial aggression has been mostly based on breeding males and it has established that elevated levels of gonadal androgens promote aggressive behaviors (reviewed in [1,2]). Androgenic actions upon male aggression are mediated in part by aromatase, the enzyme which converts androgens into estrogens (pioneer study by [3]; reviewed in [4]). Both androgens and estrogens have long-term actions upon behavior and also rapid effects involving nongenomic mechanisms ([5], reviewed in [6–8]).

Two alternative models have offered new insight into the hormonal regulation of aggression: female aggression ([9–12], reviewed in [13–15]); and non-breeding aggression (reviewed in [16,17]). Female aggression is prevalent in many species and adaptive in various contexts. In addition to the well documented maternal aggression, females may compete for rank, territories and access to mates (reviewed in [18]). In particular, territorial aggression has been shown to occur in female fish, reptiles, birds, rodents, and non-human primates (reviewed in [14]). Both testosterone and estrogens may increase female aggression ([11,12,19], reviewed in [15]), though the effect of estrogens on aggressive behavior may vary, depending on the brain estrogen receptor subtypes involved [20,21]. The second valuable model to study the regulation of aggression are species that display this behavior dissociated from the breeding season, when circulating levels of gonadal hormones are reduced (reviewed in [17]). Brain estrogens, which may be derived from circulating precursors (as the adrenal dehydroepiandrosterone, DHEA) or from *de novo* synthesis, have a forefront role in the regulation of non-breeding aggression in males, mostly through rapid mechanisms ([22,23], reviewed in [24]). Estradiol treatment has been shown to rapidly promote male non-breeding aggression in

* Corresponding author.
E-mail address: lquintana@iibce.edu.uy (L. Quintana).

https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.112883
Received 11 February 2020; Received in revised form 6 March 2020; Accepted 17 March 2020
Available online 19 March 2020
0031-9384/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

mammals and birds ([25–29], reviewed in [30]), and acute inhibition of aromatase decreases aggression levels in males of birds and fish [31,32]. The regulation of non-breeding aggression in females has been approached in few species. In bird models there is evidence that supports the involvement of circulating DHEA and testosterone [33,34], while in the Golden hamster it is suggested to be independent of ovarian hormones [35]. Non-breeding female Siberian hamsters, which exhibit low levels of gonadal hormones [36], display robust aggression associated with an increased brain sensitivity to estradiol [37]. Therefore, while rapid estrogen effects have been well documented in male non-breeding aggression, it is currently unclear whether it underlies non-breeding aggression in females.

The weakly electric fish *Gymnotus omarorum* is the first teleost in which rapid estrogenic action has been reported to underlie non-breeding male aggression. It is a seasonal breeder that displays year-long territorial defense maintaining territories both in the natural habitat [38] and in the lab [39]. The non-breeding territorial aggression of *G. omarorum* is robust, elicited in neutral arenas and triggered by the presence of a close conspecific [40]. It displays strikingly aggressive encounters, in both intra and intersexual dyads, and males and females show no differences in contest outcome, temporal dynamics of the agonistic encounter, levels of aggression, nor submissive signaling [40,41]. Male aggression has been further characterized: once dominant/subordinate status is established it does not reverse and the dominant fish excludes the subordinate from its territory [39]. Male non-breeding aggression is independent of gonadal hormones, given that it occurs robustly in fish that have been gonadectomized a month prior [32]. Moreover, circulating androgen (11-ketotestosterone) levels in males are unaffected by aggressive encounters. However, male aggression is dependent on rapid hormone effects, as the acute inhibition of aromatase distorts contest dynamics and outcome: aggression levels are reduced, and outcome becomes unpredictable [32].

This is the first study to approach the rapid androgen and estrogen regulation of female non-breeding aggression in a teleost, and one of the few to do so in a female vertebrate species. We performed agonistic encounters with dyads subjected to acute treatments with a) an aromatase inhibitor, and b) an androgen receptor blocker. The analysis of female non-breeding behavior may shed light on potential sexual differences in the fine tuning of mechanisms underlying aggression.

2. Methods

2.1. Animals

We used wild adult females of *Gymnotus omarorum* [73] (body-length 15–26 cm and body weight 9–60 g) captured from the field and housed for 4 to 5 weeks in our facilities before experiments. All experiments were carried out during the non-breeding season (June to August) [42]. Fish were collected from Laguna del Sauce (34°51′S, 55°07′W), Maldonado, Uruguay using an electrical detector as previously described [42]. Animals were housed in individual mesh compartments (40 × 40 × 60 cm) within large outdoor tanks (120 × 120 × 50 cm, 500 L). These outdoor tanks house aquatic plants brought from the field and were subjected to conditions with natural photoperiod (from LD 10:14 to LD 11:13), temperature (10.41 ± 3.48 °C), and rainfall. To conserve conditions similar to the natural habitat, conductivity was maintained under 200 μS/cm [42]. Each fish had a shelter in its compartment and was fed *ad libitum* with *Tubifex tubifex*. All experiments were performed according to the regulations for the use of animals in research and the experimental protocol was approved by the institutional Ethical Committee of Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (Resolution CEUA IIBCE 004/05/2016).

2.2. Pharmacological manipulations

2.2.1. Assessment of the effectiveness of cyproterone acetate

Cyproterone acetate (CA) has been previously reported to effectively block androgen receptors in teleost fish [43,44]. Nevertheless, since it had never been used in *Gymnotus omarorum*, we confirmed the innocuity of its vehicle and the effectiveness of the inhibitor in this species. We performed an experiment blocking a well-known androgenic-dependent trait previously described in non-breeding adults [45]. The electric organ discharge (EOD) of *G. omarorum* has a multiphasic waveform with four successive components (V1 to V4) [46]. A 15-day treatment with testosterone implants specifically increases the amplitude of the negative component V4 which is quantified by the index V4 amplitude/V3 amplitude (AV4/AV3). The reports on the effects of supraphysiological testosterone on EOD waveform were based on mixed groups (non-breeding males and females [45]). We subcutaneously implanted 22 animals with testosterone silastic pellets (100 μg/gbw). A stock solution of CA (Sigma, C3412), 8 μg/μl was prepared in mineral oil (Droguería Industrial Uruguaya), and stored at 4 °C. Testosterone-implanted animals were divided into a control group (n = 12) which received a daily IP injection of mineral oil for 15 days, and the treatment group (n = 10) which received a daily IP injection of CA (20 μg/gbw) for 15 days. The injection volumes varied accordingly with animal body weight and ranged from 22.5 to 150 μl. EOD waveform was recorded following [47]. The testosterone + mineral oil group increased AV4/AV3 amplitude index when comparing day 15 to day 0, as expected (paired t-test, p = 0.006, n = 12, Fig. 1A), whereas the group treated with testosterone + CA showed no significant increase in its index (paired t-test, p = 0.8, n = 10, Fig. 1B). This result demonstrates CA effectively blocks androgenic actions in *G. omarorum*, as shown in other teleost species. To verify the innocuity of mineral oil in the species we compared 6 females injected with PBS to 6 injected with mineral oil (in equal volumes). Fish were recorded individually in the behavioral setup; locomotion was quantified in a 2-minute time window 1 h after injections. Percentage of time in movement was compared between oil and PBS females, showing no significant difference (Mann-Whitney U test, p = 0.2, n_{OIL} = 6, n_{PBS} = 6). Basal EOD rate was calculated for each fish 1 hour after injections (see below), and there was no significant difference between oil and PBS females (Mann–Whitney U test, p = 0.57, n_{OIL} = 6, n_{PBS} = 6).

2.2.2. Behavioral experiments: Manipulation of the androgenic and estrogenic pathway

To test the effect of acutely manipulating the androgenic pathway on agonistic behavior, we administered CA to female-female dyads before subjecting them to the neutral arena protocol. One hour before the agonistic encounter, we injected CA (from a stock solution of 2 μg/

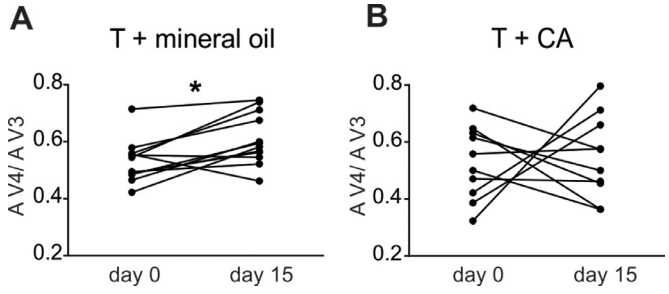

Fig. 1. Test of effectiveness of cyproterone acetate (CA) in *Gymnotus omarorum*. (A.) Animals implanted with testosterone (T) and subjected to a daily IP injection of mineral oil for 15 days changed their EOD waveform as expected [45], increasing the amplitude of the V4 component in comparison to day 1, shown as a significant increase of the index V4 amplitude / V3 amplitude (AV4/AV3). (B.) Animals implanted with T and subjected to a daily IP injection of CA for 15 days showed no significant differences in V4 amplitude.

μl, diluted in mineral oil, 10 μg/gbw, IP) to both individuals. Behavioral experiments were performed as described below. To ensure an effective blocking we used a higher dose than previously reported for other teleost species [43].

To assess the effect of acutely manipulating the estrogenic pathway on agonistic behavior we used the aromatase inhibitor fadrozole (FAD, Sigma F3806). Fadrozole has been previously reported to effectively block aromatase activity in teleost fish and other vertebrates, including this species [32,48–50]. One hour before the agonistic encounter, we injected FAD (from a stock solution of 10 μg/μl; diluted in PBS, 20 μg/gbw, IP) to both individuals. Behavioral experiments were performed as described below. Control experiments in female-female dyads were carried out injecting PBS (in equivalent volume) to both contenders, one hour before the agonistic encounter. Individuals were sexed either by surgical observation 1 month prior, which has been shown has no effect upon agonistic behavior in comparison with intact dyads (FAD and control groups following [32]) or by gonadal inspection in euthanized animals after behavioral tests (CA group, euthanization by eugenol solution 8 mg l^{-1}).

2.3. Behavioral experiments: setup and protocols

We observed the agonistic behavior of *G. omarorum* in dyadic female-female encounters. The dyads (7–20% body weight difference between contenders) belonged to one of the following experimental groups: control dyads (n = 8), fadrozole-treated dyads (n = 10), or cyproterone acetate-treated dyads (n = 7). We performed the characterization of female agonistic behavior in control dyads. The evaluation of agonistic behavior included engagement in conflict, contest outcome, dynamics, aggression, and submission levels, and these parameters were used in the comparison to FAD and CA treated dyads. All experimental groups were composed of fish spanning the same size range and each fish was used only once. Dyads were placed in a behavioral setup (as described in [51]) that allowed simultaneous video and electric recordings,and control ofphotoperiod , water temperature, conductivity, and pH. The setup consisted of 4 experimental tanks (55 × 40 × 25 cm) divided in half by a removable glass gate. Due to the nocturnal habits of this species, all experiments were performed at 7 P.M., in darkness, with infrared LED illumination (Kingbright L-53F3BT; 940 nm) located above the tanks. Experiments were recorded with infrared-sensitive video cameras (SONY CCDIris, Montevideo, Uruguay) through the glass bottom of the tank. The electric signals of freely moving fish were detected by two pairs of fixed copper wire electrodes connected to two high-input impedance (1 MΩ) amplifiers (FLA-01; Cygnus Technologies Inc., Delaware Water Gap, PA, USA). Images and electric signals were captured by a video card (Pinnacle Systems, PCTV-HD pro stick) and stored in the computer for further analysis. We used a neutral arena protocol with a plain arena (without food or shelter) and simultaneously placed each contender in one of the equally sized compartments 2 h prior to the experiment thus providing equal resources (territory and residency) to each individual [40]. Pharmacological manipulations were performed 1 h before gate removal (see above). The gate was raised 10 min after sunset (at 7 P.M.) and fish were separated 10 min after conflict resolution.

2.4. Data processing

Locomotor and electric displays were analyzed by a researcher blind to the experimental groups and treatments. Following [40], we identified the three phases of agonistic encounters: (1) evaluation phase: from time 0 (gate removal) to the occurrence of the first attack; (2) contest phase: from the occurrence of the first attack to conflict resolution (resolution time); and (3) post-resolution phase: 10 min after conflict resolution. Conflict resolution was defined as the moment we observed the third consecutive retreat of one fish without retaliation. This criterion unambiguously defined subordinate status; fish fulfilling this requirement were never observed to change their status in the following 10 min of interaction. Contests that did not reach an establishment of dominance/subordination after 20 min of interaction were interrupted and labeled as “dyads with engagement without resolution”. Dyadic interactions in which there was no engagement in conflict during 20 min after gate removal were interrupted and considered “dyads with no engagement”. Both conditions were only observed in FAD-treated dyads.

To calculate attack rate, we divided the number of attacks (bites, nips, nudges) [52] by contest duration time in seconds. We identified previously described transient submissive electric signals: offs (EOD interruptions), chirps (abrupt increases in EOD rate) [40], and electrical submission (stable, post-resolution EOD rate rank) [53]. We calculated off and chirp rate (for contest and post-resolution phases together) by dividing the number of offs and chirps produced in both phases by the duration in seconds. To calculate electrical submission, we determined mean EOD rates in dominants and subordinates during pre-contest (before gate removal) and post-resolution in 10–60 s recordings from both phases, using the software Clampfit (Axon, 10.0.0.61). To quantify the difference in EOD rate between contenders, we calculated the subordinate / dominant EOD rate index (S/D rate index). Index values below 1 indicate that the dominant EOD rate is higher than the subordinate EOD rate.

2.5. Statistics

To analyze the effect of cyproterone acetate on EOD waveform of testosterone-implanted fish we used a paired t-test and compared AV4/AV3 index in the same individual at day 0 and day 15 of treatment. As behavioral data did not fit a gaussian distribution, they were analyzed with non-parametric tests: Wilcoxon Matched-Pairs test (paired variables in the same fish or the same dyad comparing dominant and subordinate), Mann–Whitney U test (independent variables using sets of data from different fish). For this reason, results are expressed as median ± interquartile range throughout. Twotailed Fisher exact test was used to compare the proportion of dyads that achieved contest resolution in control and FAD groups.

3. Results

3.1. Female-female non-breeding territorial aggression

Female-female dyads of *Gymnotus omarorum* displayed robust agonistic behavior in the neutral arena protocol (Fig. 2). All dyads engaged in agonistic interactions, and all ended in the establishment of dominant/subordinate status. The larger fish became dominant in 6 out of 8 contests. Agonistic encounters exhibited characteristic phases previously described for the species: (1) a short evaluation phase (first attack latency = 34.8 ± 8.8 s, n = 8); (2) a contest phase (contest duration, 273 ± 85.6 s, n = 8), and (3) a post-resolution phase (Fig. 2A). The contest phase was characterized by overt aggressive displays, higher in dominants compared to subordinates (attack rate Wilcoxon Matched-Pairs test, p = 0.008, n = 8, Fig. 2B). In addition, dominant and subordinate attacks were strongly correlated during contests (R^2 = 0.8, p = 0.003, n = 8, data not shown). During contest and post-resolution phase subordinates emitted electric signals of submission (off rate 0.02 ± 0.005, n = 8; and chirp rate 0.025 ± 0.01, n = 8, data not shown). After resolution, EOD rate rank was established, and the acquired status of dominants and subordinates did not reverse (Fig. 2C). In the pre-contest phase contenders did not differ in their basal EOD rates (S/D rate index = 1.01) whereas after resolution dominants’ EOD rates were higher than their counterpart subordinates (S/D rate index = 0.6; pre-contest vs post-resolution S/D rate index: Wilcoxon Matched-Pairs test, p = 0.016, n = 7, Fig. 2C).

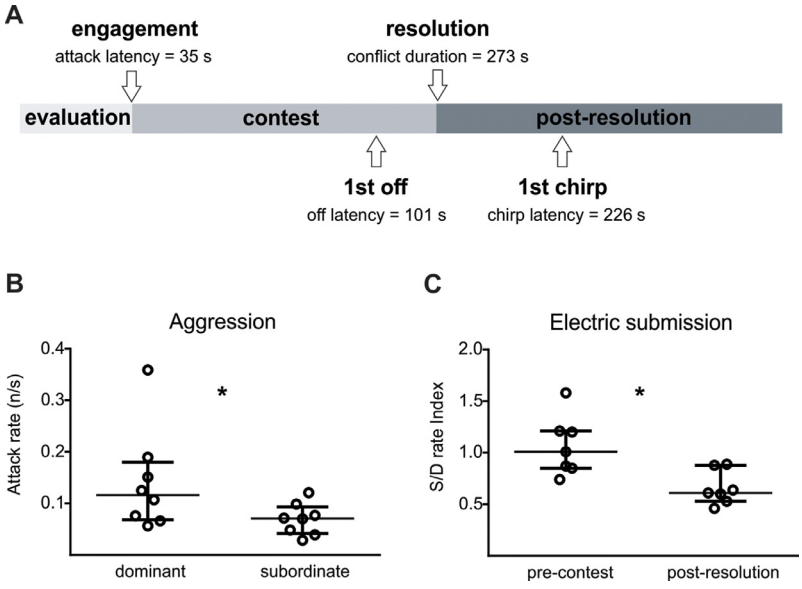

Fig. 2. Female non-breeding aggression characterization. (A.) Female dyadic encounters displayed the three typical phases of agonistic behavior. Submission signals began during the contest phase and continued into post-resolution. (B.) Individuals which achieved dominance showed higher aggression levels than their counterparts during conflict. (C.) Dominant and subordinate status was expressed by post contest EOD rate. Rates were compared by the subordinate / dominant EOD rate index (S/D rate index). Index values were near 1 before contests and significantly lower after conflict resolution.

3.2. Hormonal modulation of aggression: acute aromatase inhibition

To assess rapid effects of estrogens on the expression of non-breeding female territorial aggression, we acutely treated both fish of the dyad with fadrozole. The first and foremost effect of aromatase inhibition upon dyadic interaction was a significant decline in overall aggression. As shown in Fig. 3A, 8 out of 8 control dyads engaged in conflict in less than 28 s; all of them reached conflict resolution and establishment of dominant/subordinate status in less than 156 s. Fadrozole-treated dyads showed conflict engagement in 7 of 10 dyads, of which only 5 resolved their conflict (conflict resolution: Fisher exact Test, $p = 0.035$, $n_{FAD} = 10$, $n_{CTRL} = 8$). The other two dyads which engaged in conflict did not achieve resolution in a 20 min period (Fig. 3A). Of the 5 dyads which resolved the conflict, in 3 the larger contender achieved dominance. The administration of FAD increased the latency to the first attack in comparison to control dyads (Mann-Whitney U test, $p = 0.014$, $n_{FAD} = 7$, $n_{CTRL} = 8$; Fig. 3B) and in dyads with conflict resolution there was a conspicuous decrease in aggression levels. The attack rates of dominants displayed during contests were significantly lower than control dyads (Mann–Whitney U test, $p = 0.019$, $n_{FAD} = 5$, $n_{CTRL} = 8$; Fig. 3C), as were the attack rates of subordinate fish (Mann-Whitney U test, $p = 0.006$, $n_{FAD} = 5$, $n_{CTRL} = 8$; Fig. 3D). This striking overall effect upon aggression levels most probably accounts for the lower percentage of conflict resolution. However, it does not generate a significant modification in the accompanying electric social signals of submission. Subordinates of the dyads with aromatase inhibition did not differ in off rate (Mann–Whitney U test, $p = 0.9$, $n_{FAD} = 7$, $n_{CTRL} = 8$), nor chirp rate (Mann–Whitney U test, $p = 0.3$, $n_{FAD} = 7$, $n_{CTRL} = 8$). In addition, EOD rate rank was established in FAD-treated dyads just as in control ones. Post-resolution S/D rate index values were lower than before the contest, reflecting a higher rate of dominants in comparison to subordinates after resolution (pre-contest vs post-resolution S/D rate $index_{FAD}$: Wilcoxon Matched-Pairs test, $p = 0.06$, $n = 5$, data not shown). Not only did the S/D rate index decrease after resolution as in controls, but the values in themselves did not differ between FAD and control dyads, neither during pre-contest phase (Mann–Whitney U test, $p = 0.84$, $n_{FAD} = 5$, $n_{CTRL} = 7$) nor after conflict resolution (Mann–Whitney U test, $p = 0.11$, $n_{FAD} = 5$, $n_{CTRL} = 7$). Fadrozole-treated dyads showed no difference in locomotor activity 1 h after injection, before gate removal, compared to controls (Mann-Whitney U test, $p = 0.28$, $n_{FAD} = 20$, $n_{CTRL} = 16$, data not shown).

3.3. Hormonal modulation of aggression: acute androgen receptor antagonism

To analyze if, in addition to estrogenic modulation, endogenous androgens have direct rapid effects upon non-breeding aggression, we treated both contenders of a group of dyads with cyproterone acetate. Acutely blocking the androgen receptor function had no effects upon overall aggression dynamics. Neither conflict engagement, latency to first attack, conflict resolution, nor aggression levels of dominant or subordinate fish showed any significant difference in comparison to control dyads (Mann-Whitney U test attack latency, $p = 0.56$, $n_{CA} = 7$, $n_{CTRL} = 8$; Mann-Whitney U test dominant attack rate, $p = 0.67$, $n_{CA} = 7$, $n_{CTRL} = 8$; Mann-Whitney U test subordinate attack rate, $p = 0.09$, $n_{CA} = 7$, $n_{CTRL} = 8$, data not shown). Subordinates of the dyads with CA did not differ in off rate emission (Mann-Whitney U test, $p = 0.45$, $n_{CA} = 7$, $n_{CTRL} = 8$), nor chirp rate (Mann-Whitney U test, $p = 0.25$, $n_{CA} = 7$, $n_{CTRL} = 8$). EOD rate rank was established in CA-treated dyads as well as in control ones (pre-contest vs post-resolution S/D rate $index_{CA}$: Wilcoxon Matched-Pairs test, $p = 0.016$, $n = 7$). Moreover, S/D rate index did not differ between CA and control dyads, neither during pre-contest phase (Mann–Whitney U test, $p = 0.38$, $n_{CA} = 7$, $n_{CTRL} = 7$) nor after conflict resolution (Mann-Whitney U test, $p = 0.38$, $n_{CA} = 7$, $n_{CTRL} = 7$).

4. Discussion

This is the first report on the evaluation of hormonal control of non-breeding female aggression in a teleost species. We show that a. non-breeding females of *Gymnotus omarorum* display robust aggressive territorial behavior, b. this aggression depends on rapid modulation of aromatase, revealing the importance of short-term effects of estrogens, and c. androgens show no rapid modulation upon this behavior.

Territorial aggression in *G. omarorum* has previously been reported to occur both in males and females, and be sexually monomorphic [40,41]. Nevertheless, the careful analysis of female aggression separately from male aggression is imperative to approach the hormonal modulation of this behavior. Overtly similar behavior may in fact be based on sexually distinct underlying mechanisms (reviewed in [54]). This is the case of the similar parenting behavior in male and female prairie voles, which are underlain by sexually different vasopressin innervation in key brain areas (reviewed in [54]). In the present study, female *G. omarorum* engaged, as expected, in highly aggressive and escalated contests during the non-breeding season, competing for space

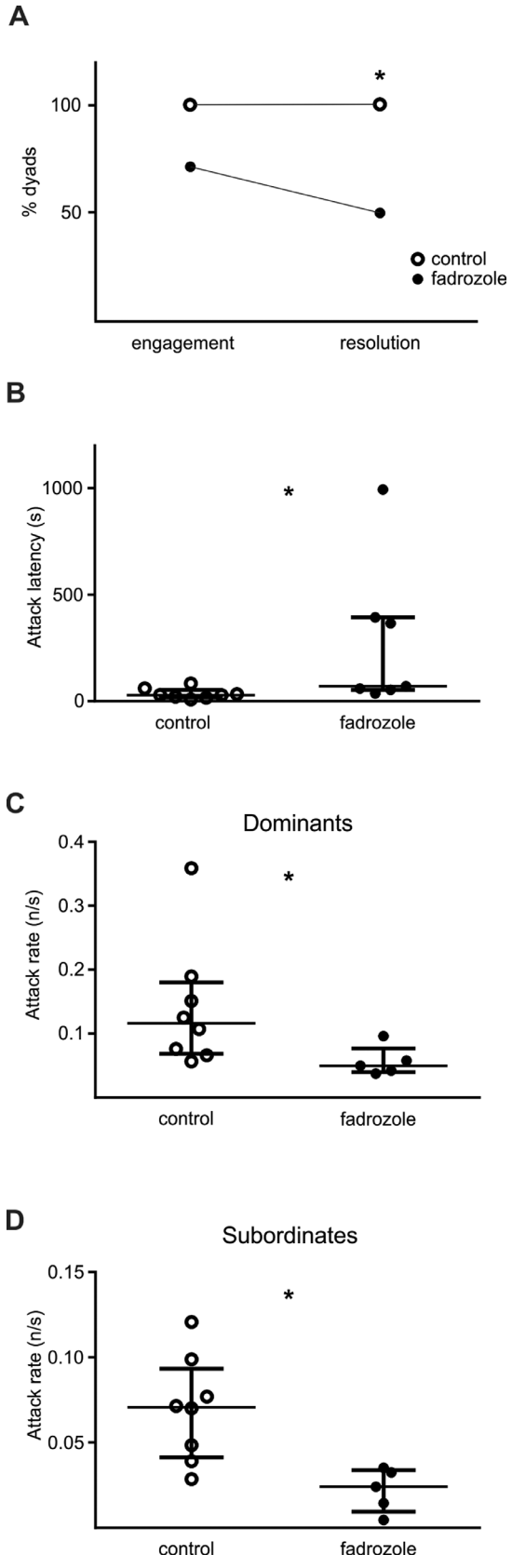

Fig. 3. Effects of acute inhibition of aromatase on female non-breeding aggression. (A.) Fadrozole treated dyads engaged less in conflict than control dyads and only 5 dyads reached conflict resolution and established dominant/subordinate status. (B.) The latency to first attack in FAD-treated dyads was significantly lower than in control dyads. (C.) Individuals which achieved dominance displayed lower attack rates during contests in FAD-treated dyads compared to control dyads. (D.) Subordinates showed lower attack rates in FAD-treated dyads in comparison to controls.

as a resource. After a short evaluation time, contests were initiated and resolved in less than 5 minutes. The larger female won most of the fights, submission was signaled by transient social electric signals and dominance was displayed by actively excluding the subordinate fish from the acquired territory while establishing an EOD rate rank, as has previously been reported [40,53,55]. Non-breeding territorial behavior in *G. omarorum* is extremely robust and maintains its features and overall dynamics independently of sex, across controls of many experimental approaches and in surgically sexed animals [32,39,40,53,55,56]. Lab results showing no sexual differences in non-breeding territorial aggression complement the data on spacing of this species in the wild, in which males and females own same-sized territories in the non-breeding season [38]. Non-breeding territorial aggression may be related to the defense of foraging patches since electrogeneration has been reported to impose high basal metabolic requirements [57]. Weakly electric fish continuously discharge EODs throughout their life and EOD amplitude is known to be strongly correlated with fish size in *G. omarorum* [58] and other electric fish [59–61]. Larger fish not only hold larger territories in the wild, regardless of sex [38], but also have a higher chance of winning a contest ([40], this study).

Non-breeding aggression in birds and mammals has been reported to be mediated by the circulating precursor DHEA which is converted into active sex steroids (androgens and estrogens) within the brain (reviewed in [16]). As an exploratory step in evaluating the role of sex steroids in non-breeding female aggression in *G. omarorum*, we pharmacologically manipulated the androgenic pathway. Rapid actions of androgens have been reported to occur in rodent hippocampal slices, where androgens promoted changes in dendritic spine morphology mediated by androgen receptors through nongenomic processes [62], and in muscle and cancer cell lines (reviewed in [63,64]). Rapid actions are suggested to underlie androgenic effects on behavior in the fish *Lythrypnus dalli* , where territorial aggression increased within 2 h of exogenous administration of 11-ketotestosterone, a non-aromatizable androgen [65]. Cyproterone acetate is an antagonist of androgen receptors, including those mediating fast actions [66] and was effective in *G. omarorum* as it blocked an androgen-induced change in EOD waveform (Fig. 1). Short-term blocking of androgen receptors, however, showed no influence upon non-breeding aggression dynamics nor the establishment of dominant/subordinate status. These results suggest that if androgens are directly involved at all in sustaining female aggression during the non-breeding season, their action may be through genomic mechanisms, and thus be evinced in a longer time frame. In male *G. omarorum*, non-breeding aggression remains unchanged under long term elimination of gonadal hormones, ruling out their role as modulators [32]. In the year-round territorial fish *Stegastes nigricans*, non-breeding circulating androgens are low, and remain so in both sexes after an aggressive encounter, although long term androgen receptor blocking decreases aggression in males but not females [67,68]. We have yet to explore if long-term direct effects of androgens, regardless of their source, occur in male and female non-breeding aggression in *G. omarorum*.

Estrogens have been put forth as key elements in models of non-breeding aggression. Pioneer studies in birds show long-lasting aromatase inhibition reduces aggression which can be recovered by estradiol treatment [69,70]. We focused on the role of this steroidal pathway in the non-breeding aggression of female *G. omarorum* using acute aromatase inhibition and showed an important role of estrogens. There was an overall decrease in motivation to display aggression,

revealed both by an important delay in initiating overt aggression and a significant decrease in dyads which reached conflict resolution (Fig. 3). These results were strikingly similar to what has been reported for male *G. omarorum*, in which potential winners failed to either resolve contests or achieve dominance when acutely treated with an aromatase inhibitor [32]. Interestingly, despite affecting the intensity of aggressive interactions, aromatase inhibition did not affect electric signalling, which suggests that the electrogeneration system is not sensitive to rapid estrogen effects *per se*. These results fall in line with reports in another Gymnotiform species, in which no aromatase expression was detected in neural circuits underlying electric signals [74]. Our results, taken together with reports of estrogenic modulation of male aggression [32], support estrogen as a key modulator of non-breeding aggression, acting through rapid mechanisms in this species. Estrogen, most probably brain derived, has been reported to have rapid effects underlying non-breeding aggression in birds and mammals [25–27,37,69]. The magnitude of these rapid effects upon behavior have been shown to depend on estrogen sensitivity i.e. higher estrogen receptor expression, in key brain regions [29]. It is interesting to focus on how female aggression can bring novel and sexually distinct mechanisms into consideration. In the songbird brains, *in vitro* assays show that estradiol decreases brain enzymatic activity, responsible for neural metabolism of DHEA to active sex steroids, within 10 min and that this rapid effect is greater in females than males [71]. Non-breeding female Siberian hamsters, which display robust aggression, have very low circulating estrogen levels which are offset by a seasonal increase in estrogen sensitivity in brain areas associated with aggressive behavior [37]. Teleost fish, which have exceptionally high aromatase activity that shows both seasonal plasticity and sexual differences (reviewed in [72]), emerge as an advantageous model for this approach.

5. Concluding remarks

In this study we show for the first time in a female teleost that non-breeding aggression depends on estrogen production. Females of *Gymnotus omarorum* rely on short term estrogen synthesis to engage in territorial aggression, maintain high levels of aggression, and ultimately reach conflict resolution from which dominant/subordinate status emerges. Our results highlight the importance of fast acting estrogens in the control of non-breeding female aggression in *G. omarorum* which, taken together with our reports from males of this species as well as contributions from bird and mammal models, point to common strategies across species.

Acknowledgements

We are very grateful to Cecilia Jalabert for her revision and helpful suggestions to our manuscript, and Rossana Perrone for her generous advice on behavioral processing and statistics. We would like to thank the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), and Universidad de la República, Uruguay for funding.

Specific grants that funded this research: ANII_FCE_6180, ANII_FCE_136381, FCE_4272.

References

[1] R.L. Cunningham, A.R. Lumia, M.Y. McGinnis, Androgen receptors, sex behavior, and aggression, Neuroendocrinology 96 (2012) 131–140, https://doi.org/10.1159/000337663.

[2] M.J. Fuxjager, B.C. Trainor, C.A. Marler, What can animal research tell us about the link between androgens and social competition in humans? Horm. Behav. 92 (2017) 182–189, https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.11.014.

[3] B.A. Schlinger, G.V. Callard, Aromatization mediates aggressive behavior in quail, Gen. Comp. Endocrinol. 79 (1990) 39–53, https://doi.org/10.1016/0016-6480(90)90086-2.

[4] B.C. Trainor, H.H. Kyomen, C.A. Marler, Estrogenic encounters: how interactions between aromatase and the environment modulate aggression, Front Neuroendocrinol. 27 (2006) 170–179, https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2005.11.001.

[5] C. de Bournonville, A. McGrath, L. Remage-Healey, Testosterone synthesis in the female songbird brain, Horm. Behav. 121 (2020) 104716, , https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104716.

[6] L. Remage-Healey, S.A. Heimovics, K.K. Soma, C. Cornil, Rapid effects of estrogens on avian brain and social behavior, hormones, Brain Behav. (2017) 2.

[7] M.J. Kelly, O.K. Rønnekleiv, 45 - rapid membrane effects of estrogen in the central nervous system, in: D.W. Pfaff, A.P. Arnold, S.E. Fahrbach, A.M. Etgen, R.T. Rubin (Eds.), Hormones, Brain and Behavior, Academic Press, San Diego, 2002, pp. 361–380, , https://doi.org/10.1016/B978-012532104-4/50047-0.

[8] J. Durdiaková, P. Celec, Androgen regulation of neural circuit activity: molecules and mechanisms, in: D.W. Pfaff, M. Joels (Eds.), Hormones, Brain and Behavior, Third, Academic Press, San Diego, 2017.

[9] S.C.P. Renn, E.J. Fraser, N. Aubin-Horth, B.C. Trainor, H.A. Hofmann, Females of an African cichlid fish display male-typical social dominance behavior and elevated androgens in the absence of males, Horm. Behav. 61 (2012) 496–503, https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.01.006.

[10] K.A. Rosvall, C.M. Bergeon Burns, J. Barske, J.L. Goodson, B.A. Schlinger, D.R. Sengelaub, E.D. Ketterson, Neural sensitivity to sex steroids predicts individual differences in aggression: implications for behavioural evolution, Proc. R. Soc. B 279 (2012) 3547–3555, https://doi.org/10.1098/rspb.2012.0442.

[11] D.R. Rubenstein, M. Wikelski, Steroid hormones and aggression in female Galápagos marine iguanas, Horm. Behav. 48 (2005) 329–341, https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.04.006.

[12] M.F. Scaia, L. Morandini, C. Noguera, V.L. Trudeau, G.M. Somoza, M. Pandolfi, Can estrogens be considered as key elements of the challenge hypothesis? The case of intrasexual aggression in a cichlid fish, Physiol. Behav. 194 (2018) 481–490, https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.06.028.

[13] K.A. Rosvall, Intrasexual competition in females: evidence for sexual selection? Behav. Ecol. 22 (2011) 1131–1140, https://doi.org/10.1093/beheco/arr106.

[14] N. Duque-Wilckens, B.C. Trainor, Behavioral Neuroendocrinology of Female Aggression, Oxford Research Encyclopedia of Neuroscience, Oxford University Press, 2017, https://oxfordre.com/neuroscience/view/10.1093/acrefore/9780190264086.001.0001/acrefore-9780190264086-e-11.

[15] K.A. Rosvall, A.B. Bentz, E.M. George, How research on female vertebrates contributes to an expanded challenge hypothesis, Horm. Behav. (2019) 104565, , https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2019.104565.

[16] K.K. Soma, N.M. Rendon, R. Boonstra, H.E. Albers, G.E. Demas, DHEA effects on brain and behavior: insights from comparative studies of aggression, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 145 (2015) 261–272, https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.05.011.

[17] K.K. Soma, M.-A.L. Scotti, A.E.M. Newman, T.D. Charlier, G.E. Demas, Novel mechanisms for neuroendocrine regulation of aggression, Front. Neuroendocrinol. 29 (2008) 476–489, https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.12.003.

[18] K.A. Rosvall, Proximate perspectives on the evolution of female aggression: good for the gander, good for the goose? Philos. Trans. R. Soc. B 368 (2013) 20130083, , https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0083.

[19] S.K. Woodley, M.C. Moore, Ovarian hormones influence territorial aggression in free-living female mountain spiny lizards, Horm. Behav. 35 (1999) 205–214, https://doi.org/10.1006/hbeh.1999.1514.

[20] A.E. Clipperton Allen, C.L. Cragg, A.J. Wood, D.W. Pfaff, E. Choleris, Agonistic behavior in males and females: Effects of an estrogen receptor beta agonist in gonadectomized and gonadally intact mice, Psychoneuroendocrinology 35 (2010) 1008–1022, https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2010.01.002.

[21] A.E. Clipperton-Allen, A. Almey, A. Melichercik, C.P. Allen, E. Choleris, Effects of an estrogen receptor alpha agonist on agonistic behaviour in intact and gonadectomized male and female mice, Psychoneuroendocrinology 36 (2011) 981–995, https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2010.12.010.

[22] K.K. Soma, J.C. Wingfield, Dehydroepiandrosterone in songbird plasma: seasonal regulation and relationship to territorial aggression, Gen. Comp. Endocrinol. 123 (2001) 144–155, https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7657.

[23] Kazuyoshi Tsutsui, Takeshi Yamazaki, Avian neurosteroids. I. Pregnenolone biosynthesis in the quail brain, Brain Res. 678 (1995) 1–9, https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00116-8.

[24] G.E. Demas, M.A. Cooper, H.E. Albers, K.K. Soma, Novel mechanisms underlying neuroendocrine regulation of aggression: a synthesis of rodent, avian, and primate studies, in: A. Lajtha, J.D. Blaustein (Eds.), Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology, Springer US, Boston, MA, 2007, pp. 337–372, , https://doi.org/10.1007/978-0-387-30405-2_8.

[25] B.C. Trainor, S. Lin, M.S. Finy*, M.R. Rowland, R.J. Nelson, Photoperiod reverses the effects of estrogens on male aggression via genomic and nongenomic pathways, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104 (2007) 9840, https://doi.org/10.1073/pnas.0701819104.

[26] B.C. Trainor, M. Sima Finy, R.J. Nelson, Rapid effects of estradiol on male aggression depend on photoperiod in reproductively non-responsive mice, Horm. Behav. 53 (2008) 192–199, https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.09.016.

[27] S.A. Heimovics, J.K. Ferris, K.K. Soma, Non-invasive administration of 17β-estradiol rapidly increases aggressive behavior in non-breeding, but not breeding, male song sparrows, Horm. Behav. 69 (2015) 31–38, https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.11.012.

[28] S.A. Laredo, R. Villalon Landeros, J.C. Dooley, M.Q. Steinman, V. Orr, A.L. Silva, K.K. Crean, C.F. Robles, B.C. Trainor, Nongenomic effects of estradiol on aggression under short day photoperiods, Horm. Behav. 64 (2013) 557–565, https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.06.002.

[29] J.R. Merritt, M.T. Davis, C. Jalabert, T.J. Libecap, D.R. Williams, K.K. Soma,

D.L. Maney, Rapid effects of estradiol on aggression depend on genotype in a species with an estrogen receptor polymorphism, Horm. Behav. 98 (2018) 210–218, https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2017.11.014.
[30] S.A. Heimovics, B.C. Trainor, K.K. Soma, Rapid Effects of Estradiol on Aggression in Birds and Mice: The Fast and the Furious, Integr. Comp. Biol. 55 (2015) 281–293, https://doi.org/10.1093/icb/icv048.
[31] K.K. Soma, K.A. Sullivan, A.D. Tramontin, C.J. Saldanha, B.A. Schlinger, J.C. Wingfield, Acute and chronic effects of an aromatase inhibitor on territorial aggression in breeding and nonbreeding male song sparrows, J. Comp. Physiol. A 186 (2000) 759–769.
[32] C. Jalabert, L. Quintana, P. Pessina, A. Silva, Extra-gonadal steroids modulate non-breeding territorial aggression in weakly electric fish, Horm. Behav. 72 (2015) 60–67, https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.05.003.
[33] M. Hau, S.T. Stoddard, K.K. Soma, Territorial aggression and hormones during the non-breeding season in a tropical bird, Horm. Behav. 45 (2004) 40–49, https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2003.08.002.
[34] S.A. Gill, E.D. Alfson, M. Hau, Context matters: female aggression and testosterone in a year-round territorial neotropical songbird (Thryothorus leucotis), Proc. R. Soc. B 274 (2007) 2187–2194, https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0457.
[35] A.S. Fleming, A. Phillips, A. Rydall, L. Levesque, Effects of photoperiod, the pineal gland and the gonads on agonistic behavior in female golden hamsters (Mesocricetus auratus), Physiol. Behav. 44 (1988) 227–234, https://doi.org/10.1016/0031-9384(88)90143-6.
[36] M.-A.L. Scotti, N.J. Place, G.E. Demas, Short-day increases in aggression are independent of circulating gonadal steroids in female Siberian hamsters (Phodopus sungorus), Horm. Behav. 52 (2007) 183–190, https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.03.029.
[37] N.M. Rendon, A.C. Amez, M.R. Proffitt, E.R. Bauserman, G.E. Demas, Aggressive behaviours track transitions in seasonal phenotypes of female Siberian hamsters, Funct. Ecol. 31 (2017) 1071–1081, https://doi.org/10.1111/1365-2435.12816.
[38] L. Zubizarreta, L. Quintana, D. Hernández, F.T. de Mello, M. Meerhoff, R.M. Honji, R.G. Moreira, A.C. Silva, Seasonal and social factors associated with spacing in a wild territorial electric fish, BioRxiv (2020), https://doi.org/10.1101/2020.01.29.924761 2020.01.29.924761.
[39] R. Perrone, F. Pedraja, G. Valiño, B. Tassino, A. Silva, Non-breeding territoriality and the effect of territory size on aggression in the weakly electric fish, Gymnotus omarorum, Acta Ethol. 22 (2019) 79–89, https://doi.org/10.1007/s10211-019-00309-7.
[40] G. Batista, L. Zubizarreta, R. Perrone, A. Silva, Non-sex-biased dominance in a sexually monomorphic electric fish: fight structure and submissive electric signalling, Ethology 118 (2012) 398–410, https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2012.02022.x.
[41] L. Quintana, L. Zubizarreta, C. Jalabert, G. Batista, R. Perrone, A. Silva, Building the case for a novel teleost model of non-breeding aggression and its neuroendocrine control, J. Physiol. Paris 110 (2016) 224–232, https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2016.11.009.
[42] A. Silva, L. Quintana, M. Galeano, P. Errandonea, Biogeography and breeding in gymnotiformes from Uruguay, Environ. Biol. Fishes 66 (2003) 329–338, https://doi.org/10.1023/A:1023986600069.
[43] L. Remage-Healey, A.H. Bass, Rapid, hierarchical modulation of vocal patterning by steroid hormones, J. Neurosci. 24 (2004) 5892, https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1220-04.2004.
[44] C.J. Dey, C.M. O'Connor, K.M. Gilmour, G. Van Der Kraak, S.J. Cooke, Behavioral and physiological responses of a wild teleost fish to cortisol and androgen manipulation during parental care, Horm. Behav. 58 (2010) 599–605, https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.06.016.
[45] J.L. Ardanaz, A. Silva, O. Macadar, Temperature sensitivity of the electric organ discharge waveform in Gymnotus carapo, J. Comp. Physiol. A 187 (2001) 853–864, https://doi.org/10.1007/s00359-001-0256-8.
[46] O. Trujillo-Cenóz, J.A. Echagüe, O. Macadar, Innervation pattern and electric organ discharge waveform in Gymnotus carapo (Teleostei; Gymnotiformes), J. Neurobiol. 15 (1984) 273–281, https://doi.org/10.1002/neu.480150404.
[47] P. Pouso, L. Quintana, C. Bolatto, A.C. Silva, Brain androgen receptor expression correlates with seasonal changes in the behavior of a weakly electric fish, Brachyhypopomus gauderio, Horm. Behav. 58 (2010) 729–736, https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.07.005.
[48] D. Gonçalves, J. Alpedrinha, M. Teles, R.F. Oliveira, Endocrine control of sexual behavior in sneaker males of the peacock blenny Salaria pavo: Effects of castration, aromatase inhibition, testosterone and estradiol, Horm. Behav. 51 (2007) 534–541, https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.02.003.
[49] L.S. Huffman, L.A. O'Connell, H.A. Hofmann, Aromatase regulates aggression in the African cichlid fish Astatotilapia burtoni, Physiol. Behav. 112–113 (2013) 77–83, https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.02.004.
[50] J. Wade, B.A. Schlinger, L. Hodges, A.P. Arnold, Fadrozole: A Potent and Specific Inhibitor of Aromatase in the Zebra Finch Brain, Gen. Comp. Endocrinol. 94 (1994) 53–61, https://doi.org/10.1006/gcen.1994.1059.
[51] A. Silva, R. Perrone, O. Macadar, seasonal Environmental, and social modulations of basal activity in a weakly electric fish, Physiol. Behav. 90 (2007) 525–536, https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.11.003.
[52] P. Black-Cleworth, The role of electrical discharges in the non-reproductive social behaviour of Gymnotus carapo (Gymnotidae, Pisces), Animal Behav. Monogr. 3 (1970), https://doi.org/10.1016/S0066-1856(70)80001-2 1-IN1.
[53] R. Perrone, A.C. Silva, Status-dependent vasotocin modulation of dominance and subordination in the weakly electric fish Gymnotus omarorum, Front. Behav. Neurosci. 12 (2018) 1, https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00001.
[54] G.J. De Vries, Minireview: sex differences in adult and developing brains: compensation, compensation, compensation, Endocrinology 145 (2004) 1063–1068, https://doi.org/10.1210/en.2003-1504.
[55] L. Zubizarreta, P.K. Stoddard, A. Silva, Aggression levels affect social interaction in the non-breeding territorial aggression of the weakly electric fish, Gymnotus omarorum, Ethology 121 (2015) 8–16, https://doi.org/10.1111/eth.12299.
[56] V. Comas, K. Langevin, A. Silva, M. Borde, Distinctive mechanisms underlie the emission of social electric signals of submission in Gymnotus omarorum, J. Exp. Biol. 222 (2019), https://doi.org/10.1242/jeb.195354 jeb195354.
[57] M.R. Markham, Y. Ban, A.G. McCauley, R. Maltby, Energetics of sensing and communication in electric fish: a blessing and a curse in the anthropocene? Integr. Comp. Biol. 56 (2016) 889–900, https://doi.org/10.1093/icb/icw104.
[58] A. Caputi, R. Budelli, The electric image in weakly electric fish: I. A data-based model of waveform generation inGymnotus carapo, J. Comput. Neurosci. 2 (1995) 131–147, https://doi.org/10.1007/BF00961884.
[59] G.W. Max Westby, F. Kirschbaum, Sex differences in the electric organ discharge of Eigenmannia virescens and the effect of gonadal maturation, in: T. Szabó, G. Czéh (Eds.), Sensory Physiology of Aquatic Lower Vertebrates, Pergamon, 1981: pp. 179–194. 10.1016/B978-0-08-027352-5.50017-3.
[60] C.D. Hopkins, Sex differences in electric signaling in an electric fish, Science 176 (1972) 1035, https://doi.org/10.1126/science.176.4038.1035.
[61] M. Hagedorn, Ecology and behavior of a pulse-type electric fish, hypopomus occidentalis (Gymnotiformes, Hypopomidae), in a fresh-water stream in Panama, Copeia (1988) 324–335, https://doi.org/10.2307/1445872 1988.
[62] M. Soma, J. Kim, A. Kato, S. Kawato, Src Kinase Dependent Rapid Non-genomic Modulation of Hippocampal Spinogenesis Induced by Androgen and Estrogen, Front. Neurosci. 12 (2018) 282, https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00282.
[63] R.A. Davey, M. Grossmann, Androgen receptor structure, function and biology: from bench to bedside, Clin. Biochem. Rev. 37 (2016) 3–15.
[64] B.S. McEwen, T.A. Milner, Understanding the broad influence of sex hormones and sex differences in the brain, J. Neurosci. Res. 95 (2017) 24–39, https://doi.org/10.1002/jnr.23809.
[65] D.S. Pradhan, K.R. Connor, E.M. Pritchett, M.S. Grober, Contextual modulation of androgen effects on agonistic interactions, Horm. Behav. 65 (2014) 47–56, https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.11.006.
[66] S.B. Kim, A. Kanno, T. Ozawa, H. Tao, Y. Umezawa, Nongenomic activity of ligands in the association of androgen receptor with Src, ACS Chem. Biol. 2 (2007) 484–492, https://doi.org/10.1021/cb7000439.
[67] P. Vullioud, R. Bshary, A.F.H. Ros, Intra- and interspecific aggression do not modulate androgen levels in dusky gregories, yet male aggression is reduced by an androgen blocker, Horm. Behav. 64 (2013) 430–438, https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.06.007.
[68] A.F.H. Ros, P. Vullioud, R. Bruintjes, A. Vallat, R. Bshary, Intra- and interspecific challenges modulate cortisol but not androgen levels in a year-round territorial damselfish, J. Exp. Biol. 217 (2014) 1768, https://doi.org/10.1242/jeb.093666.
[69] K.K. Soma, A.D. Tramontin, J.C. Wingfield, Oestrogen regulates male aggression in the non–breeding season, Proc. R. Soc. London. Ser. B 267 (2000) 1089–1096, https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1113.
[70] K.K. Soma, K. Sullivan, J. Wingfield, Combined aromatase inhibitor and anti-androgen treatment decreases territorial aggression in a wild songbird during the nonbreeding season, Gen. Comp. Endocrinol. 115 (1999) 442–453, https://doi.org/10.1006/gcen.1999.7334.
[71] D.S. Pradhan, Y. Yu, K.K. Soma, Rapid estrogen regulation of DHEA metabolism in the male and female songbird brain, J. Neurochem. 104 (2008) 244–253, https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04953.x.
[72] N. Diotel, Y.L. Page, K. Mouriec, S.-K. Tong, E. Pellegrini, C. Vaillant, I. Anglade, F. Brion, F. Pakdel, B. Chung, O. Kah, Aromatase in the brain of teleost fish: expression, regulation and putative functions, Front. Neuroendocrinol. 31 (2010) 172–192, https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.01.003.
[73] M.M Richer-de-Forges, W.G Crampton, J.S Albert, A new species of Gymnotus (Gymnotiformes, Gymnotidae) from Uruguay: description of a model species in neurophysiological research, Copeia 3 (2009) 538–544, https://doi.org/10.1643/CI-07-103.
[74] K Shaw, R Krahe, Pattern of aromatase mRNA expression in the brain of a weakly electric fish, Apteronotus leptorhynchus. Journal of Chemical Neuroanatomy 90 (2018) 70–79, https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2017.12.009.

ANEXO 4

Proceso de puesta a punto de Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masa (GC-MS) para la cuantificación de esteroides en la plataforma del IIBCE.

La cuantificación de esteroides ha sido llevada a cabo clásicamente por inmunoensayos (RIA y ELISA). El método de detección y cuantificación por espectrometría de masa (MS) comenzó a cobrar relevancia hace algunos años y se ha convertido en el estándar de oro actualmente, en especial cuando se pretende cuantificar más de una estirpe esteroidea en una misma muestra. La detección por MS se acopla a un método de separación cromatográfica previo (líquida, LC o gaseosa, GC), que separa los diferentes esteroides para luego ser detectados por MS. Las ventajas de las técnicas de LC-MS o GC-MS para cuantificar en comparación con inmunoensayos radican en la alta especificidad (evita reacciones cruzadas con moléculas similares), gran sensibilidad y la posibilidad de cuantificación de múltiples moléculas en una misma muestra. La contraparte de las ventajas que supone el MS para cuantificar esteroides es que se necesita una gran inversión inicial en equipamiento. Asimismo, y de igual importancia es la necesidad de contar con personal técnico de alta calificación y dedicación para el manejo del equipo.

En esta tesis, en una primera instancia se planteó cuantificar un panel de esteroides por cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masa (GC-MS), considerando las ventajas antes mencionadas, y aprovechando la oportunidad de contar con un equipo institucional en el IIBCE. Utilizar esta metodología implica primero la puesta a punto del método de cuantificación (sin precedentes en Uruguay, y muy poco utilizado para esteroides cerebrales a nivel mundial), y luego la puesta a punto de un método de extracción de esteroides del tejido cerebral compatible con el GC-MS. Como muestra la Figura A_1, la técnica de GC-MS implica la inyección de la muestra que se volatiliza para luego pasar por una columna transportada por una fase gaseosa. A la separación de la muestra por GC le sigue la detección por MS, que implica la fragmentación de las

moléculas en iones, cuya relación masa/carga (m/z) es característica de cada molécula, y por lo tanto identificable. Del espectro de iones que resultan de la fragmentación de cada molécula se eligen dos, el cuantificador y el calificador, que corresponden a los picos de mayor intensidad. La intensidad de los iones (medida como el área bajo la curva en el cromatograma) se extrapola a una curva de calibración para inferir la concentración.

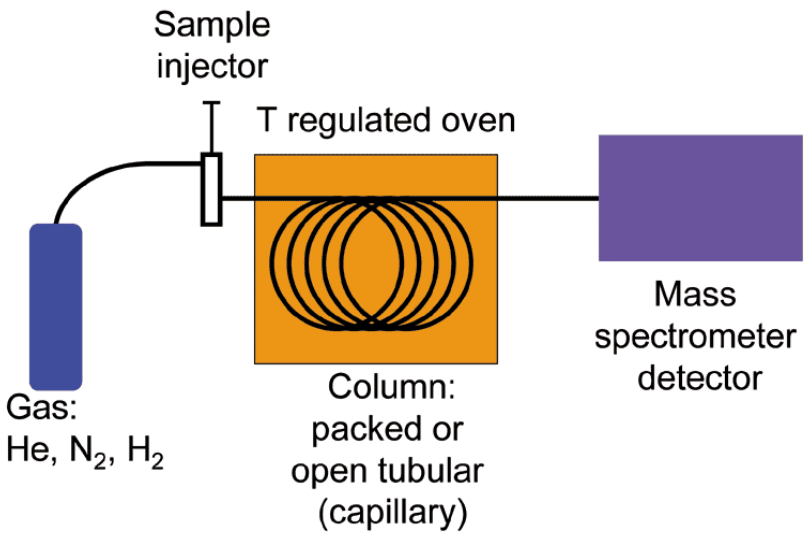

Figura A_1: Representación esquemática de cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masa (GC-MS).

Durante la tesis se desarrollaron varias etapas de la puesta a punto de la técnica con el objetivo de cuantificar hormonas esteroides en plasma y cerebro. Se cumplieron diferentes etapas, desarrollados en paralelo, para la puesta a punto en la medición de hormonas esteroides en un GCMS, Shimadzu QP 2010 Ultra con una columna Agilent HP-5ms (0.25 µm x 30 m x 0.25 d.i). Esta técnica permite la cuantificación de múltiples compuestos en una sola muestra, utilizando hormonas marcadas con deuterio como estándares internos. En líneas generales la puesta a punto se centró en diseñar una apropiada volatilización de las hormonas de interés, la separación cromatográfica de las hormonas de interés, la identificación inequívoca de éstas y su cuantificación confiable y en paralelo, la correcta extracción de las hormonas de las matrices biológicas de interés (plasma y cerebro).

a) Derivatización (volatilización).

Dado que los esteroides presentan una volatilidad no predecible a las temperaturas en las que se trabaja en el GC-MS, se debe realizar un proceso que aumente su volatilización y permita que esta sea regular y sistemática. Esto se logró mediante la derivatización, que implica la adición de grupos sililos a las hormonas. En una primera etapa, se trabajó con hormonas estándar, y se ensayaron tres productos derivatizantes: (N-trimethylsilylimidazole (TMSI, Sigma), N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA, Sigma) y Silylating mixture Fluka III, en diferentes condiciones de: relación derivatizante/hormona, tiempo de reacción y temperatura de derivatización.

Al cabo de las diferentes pruebas se decidió por el uso de MSTFA en una proporción derivatizante:muestra de 83:16, durante al menos 4 horas a temperatura ambiente.

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

Se usaron hormonas estándar de 17β-estradiol, 11-ketotestosterona, testosterona y dehidroepiandrostenediona, y dos estándares internos deuterados (Estradiol-d y Testosterona-d). Para cada hormona se obtuvo el espectro de masa (distribución de iones por relación m/z) en el modo *total ion current* (TIC) donde se registran el total de iones generados y se identificó el pico base (ion de mayor intensidad, que se usó como ion cuantificador, Fig. A_2).

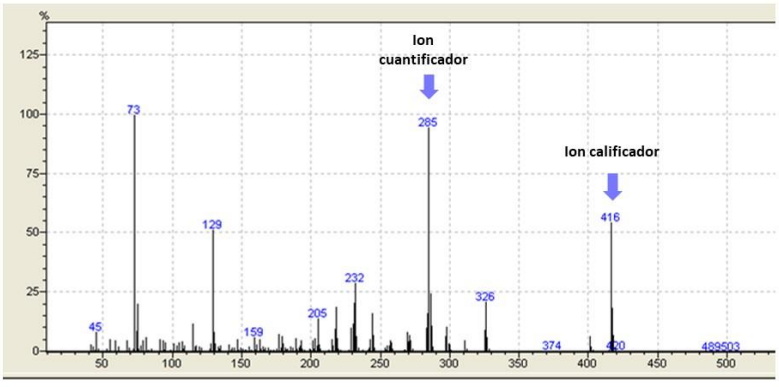

Figura A_2: Espectro de iones correspondiente al 17β-estradiol 2 sililado en el modo total ion current (TIC). Con las flechas se indican el ion cuantificador (m/z=285) y el calificador (m/z=416).

Se usó además otro ion característico adicional, que no se repite en las otras hormonas (ion calificador). Se definieron los tiempos de retención de cada hormona, y se constató que no había superposición de estos tiempos entre diferentes hormonas (Tabla A_1).

Tabla A_1: Esteroides incluidos en la puesta a punto, sus tiempos de retención y los iones característicos de cada espectro.

Esteroide	Tiempo de retención (min)	Iones (m/z)
17β-Estradiol-2 Sililado	20.35	416, 285, 129, 232, 326
DHEA-2 Sililado	18.75	360, 270, 304, 231
Testosterona-2 Sililado	20.34	432, 417, 270, 209, 196
11-KT-2 Sililado	22.26	446, 208, 289, 431, 193
17β-Estradiol	19.44	272, 213, 172, 160, 146
Testosterona	19.88	124, 147, 203, 246, 288
11-KT	21.82	122, 181, 163, 302, 243

Una vez identificados los iones, para el resto de la puesta a punto y la cuantificación se pasó al modo *selected ion monitoring* (SIM), que implica el uso del instrumento para registrar la corriente iónica de relaciones m/z seleccionados, los cuales son característicos de la molécula de interés, en una ventana temporal específica. En este modo el espectrómetro de masa no escanea todos los iones, y de esta manera se habilita el análisis cuantitativo. En la Figura A_3 A se muestra el cromatograma del 17β-estradiol en modo SIM, donde se pueden observar los iones cuantificador y calificador.

c) Generación del protocolo de inyección y condiciones cromatográficas.
Se pusieron a punto las rampas de temperatura, tipo de inyección, modo de inyección (manual o automático, split o splitless), y cantidad de muestra inyectada para cada hormona estándar.

d) Curvas de calibración, repetibilidad y sensibilidad con estándares en acetona.

Se realizaron curvas de dilución con concentraciones decrecientes y se comparó la repetibilidad en resultados de corridas sucesivas con diferentes tiempos entre la derivatización y la inyección. Se trabajó exhaustivamente en el mejoramiento de la sensibilidad de la cuantificación. En la Figura A_3 B se muestra un ejemplo de curva de calibración para los dos iones seleccionados del 17β-estradiol. Es posible observar que la curva es lineal tanto para el ion cuantificador (285) como para el calificador (416).

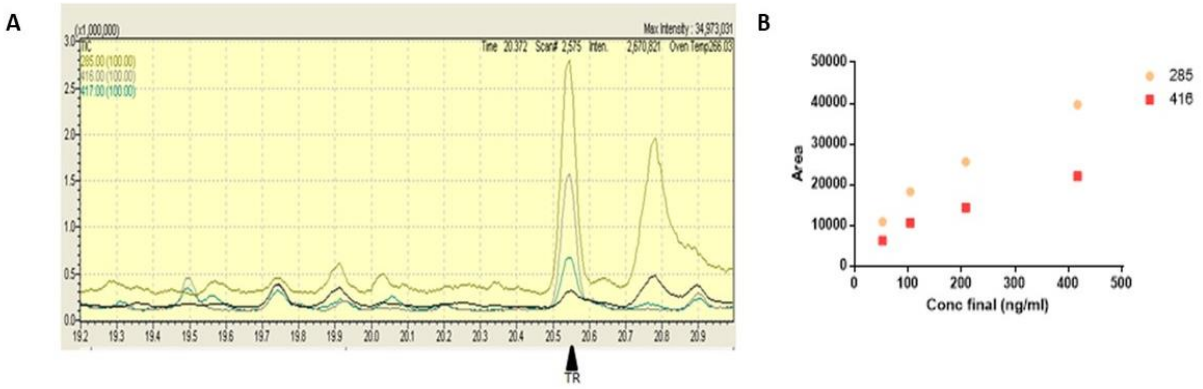

Figura A_3: Cuantificación del estándar correspondiente al 17β-estradiol.
A. Cromatograma representativo del 17β-estradiol en modo SIM. Se observan los iones cuantificador (285) y calificador (416). B. Curvas de calibración para el ion cuantificador y el calificador del 17β-estradiol.

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

El proceso de la puesta a punto evidenció que este método no alcanzó a ofrecer las garantías requeridas para una cuantificación confiable. Luego de una larga etapa en la que se logró sortear diferentes dificultades y obtener una repetibilidad aceptable, se constató que la sensibilidad lograda no era suficiente para el análisis de las muestras.
Como ejemplo, trabajando con hormonas estándar se pudo cuantificar hasta un mínimo de 6pg/ml de testosterona, cuando nuestros resultados esperados estaban en el entorno de 0,1 pg/ml de testosterona plasmática, y 0,05 ng/g de testosterona cerebral.

Estos resultados nos llevaron a optar por el método de cuantificación por LC/MSMS en la Universidad de British Columbia, mostrado en el Capítulo 3. A lo largo de los dos años de trabajo en el GC-MS del IIBCE trabajé junto a Federico Reyes en su etapa de maestría, y contamos con el apoyo altamente comprometido de los técnicos de la plataforma (QF Manuel Minteguiaga, Lic. Karen Malan) y la Comisión encargada (Dr. Andrés Abin, Dra. Silvia Batista). Sin embargo, estos resultados y el trabajo en la plataforma analítica de la UBC pusieron de manifiesto la enorme importancia de contar con técnicos encargados de altísima dedicación horaria y remuneración acorde a la responsabilidad. La ausencia de estos actores, típico de las instituciones de investigación nacionales, son un elemento crucial e indispensable para el desarrollo de puestas a punto complejas y novedosas.

frontiers in Endocrinology

MINI REVIEW
published: 23 July 2020
doi: 10.3389/fendo.2020.00468

A Teleost Fish Model to Understand Hormonal Mechanisms of Non-breeding Territorial Behavior

Ana C. Silva[1,2], *Lucía Zubizarreta*[2,3] *and Laura Quintana*[2]*

[1] *Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay,* [2] *Unidad Bases Neurales de la Conducta, Departamento de Neurofisiología Celular y Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay,* [3] *Laboratorio de Neurofisiología Celular y Sináptica, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay*

Aggressive behaviors occurring dissociated from the breeding season encourage the search of non-gonadal underlying regulatory mechanisms. Brain estrogen has been shown to be a key modulator of this behavior in bird and mammal species, and it remains to be understood if this is a common mechanism across vertebrates. This review focuses on the contributions of *Gymnotus omarorum*, the first teleost species in which estrogenic modulation of non-breeding aggression has been demonstrated. *Gymnotus omarorum* displays year-long aggression, which has been well characterized in the non-breeding season. In the natural habitat, territory size is independent of sex and determined by body size. During the breeding season, on the other hand, territory size no longer correlates to body size, but rather to circulating estrogens and gonadosomatic index in females, and 11-ketotestosterone in males. The hormonal mechanisms underlying non-breeding aggression have been explored in dyadic encounters in lab settings. Males and females display robust aggressive contests, whose outcome depends only on body size asymmetry. This agonistic behavior is independent of gonadal hormones and fast acting androgens. Nevertheless, it is dependent on fast acting estrogenic action, as acute aromatase blockers affect aggression engagement, intensity, and outcome. Transcriptomic profiling in the preoptic area region shows non-breeding individuals express aromatase and other steroidogenic enzyme transcripts. This teleost model reveals there is a role of brain estrogen in the control of non-breeding aggression which seems to be common among distant vertebrate species.

Keywords: ***Gymnotus omarorum*, non-breeding aggression, fadrozole, natural spacing, estrogen**

OPEN ACCESS

Edited by:
Kiran K. Soma,
University of British Columbia, Canada

Reviewed by:
Chelsea Anne Weitekamp,
United States Environmental Protection Agency, United States
Devaleena S. Pradhan,
Idaho State University, United States

***Correspondence:**
Laura Quintana
lquintana@iibce.edu.uy

Specialty section:
This article was submitted to Neuroendocrine Science, a section of the journal Frontiers in Endocrinology

Received: *01 March 2020*
Accepted: *15 June 2020*
Published: *23 July 2020*

Citation:
Silva AC, Zubizarreta L and Quintana L (2020) A Teleost Fish Model to Understand Hormonal Mechanisms of Non-breeding Territorial Behavior. Front. Endocrinol. 11:468. doi: 10.3389/fendo.2020.00468

INTRODUCTION

The study of territoriality can provide insight into how animals integrate social and environmental cues with their physiological context to produce behavioral responses. Steroid hormones are key in this integration, affecting behavior through the modulation of brain areas belonging to the social behavior network (1–3). Territoriality occurs when animals defend spatially associated resources against competing individuals, and it is frequently mediated by agonistic encounters (4–6). Animals will only defend resources when the benefits exceed the costs of defense, and this is key to understanding how spacing, mating, and social systems have evolved (7). Pioneering studies in the

field of behavioral ecology (8) have shown that optimal cost-benefit balance in territorial defense occurs when animals compete for mating opportunities, while the defense of resources unrelated to reproduction is less often observed. Nonetheless, in a few species territorial defense is present year-round (9–11), which may ensure access to foraging areas or protection from predators across seasons (4). Territorial aggression may thus occur in these unconventional cases uncoupled from a breeding physiology and independently from gonadal hormones.

Aggressive behaviors which occur dissociated from the breeding season, encourage the search of non-gonadal underlying regulatory mechanisms (12, 13). Early reports in wild birds established the independence of non-breeding aggression from circulating androgens (14–16). Many studies have shown that aggression may occur when gonads are regressed and even after castration in some species of birds, mammals, reptiles and fish (9, 11, 17–25). In addition, it has also been reported that territorial challenges during the non-breeding season do not affect circulating testosterone (22, 26, 27). Brain estrogens have been shown to have a forefront role in the regulation of non-breeding aggression. This was first postulated by pioneer research showing that estrogens promote aggression in non-breeding song sparrows (18, 28, 29) and in California mice subjected to a short photoperiod (30, 31). Aromatase, which converts androgens into estrogens, is present in brain regions related to aggression, and may display seasonal changes in activity (32, 33). This raises the question: is the role of brain estrogen underlying non-breeding aggression a general strategy across vertebrates?

Fish are an ideal group to approach this question as they are evolutionarily early vertebrates, they display diverse and elaborate social behaviors, brain areas related to social behavior are conserved, and they exhibit extraordinarily high levels of brain aromatase activity (34–38).

This review focuses on the contributions from a teleost fish model on the hormonal modulation of non-breeding territorial behavior, to better understand different mechanisms underlying aggression. South American weakly electric fish of the Order Gymnotiformes, constitute a highly diverse group. They produce electric organ discharges (EOD) that are used for active sensing and communication [reviewed in (39)], and their well-known electrogenic system is composed of discrete nuclei in the brainstem and spinal cord and a peripheral electric organ. This system has been shown to be hormone-sensitive in many of its components frequently producing sexually dimorphic communication signals, making these fish well established models to study steroid action on neural circuits underlying behavior (40–49). *Gymnotus omarorum* occurs naturally at the southern boundary of gymnotiform distribution in South America (Uruguay). It is a seasonal breeder, yet it displays year-round territoriality in both males and females (50). It allows the analysis of territorial aggression in the natural habitat as well as the exploration of its proximate mechanisms in lab settings. The fact that this behavior occurs when gonads are regressed and circulating sex steroids are low, puts the spotlight on brain synthesis of steroid hormones. This is the first teleost model that contributes to revealing common estrogenic roles in the control of non-breeding aggression, broadening the perspective of the current state of knowledge currently based mostly on bird and mammal models.

YEAR-LONG SPACING IN THE NATURAL HABITAT

The spacing patterns of *G. omarorum* in the natural habitat likely reflect year-long territorial defense in both males and females. Territorial defense, usually associated with breeding males, has been proposed to follow two general principles: (1) territory size depends on body size as it is the universal indicator of physical strength and resource holding power (51–53); and (2) territory size depends on individual reproductive state and may be related to circulating androgen levels (54–56). Sexual dimorphism in territory size during breeding can also be expected even in species in which both sexes display territoriality, as males and females may have asymmetries in their motivation and/or their fighting ability. This is the case of red squirrels (*Sciurus vulgaris*), for example, in which males often hold larger territories than females (57) or in the striped plateau lizard (*Sceloporus virgatus*), in which females are more territorial than males (58).

During the breeding season (corresponding to the austral spring-summer, from December to February), this sexually monomorphic species displays similar patterns of spatial arrangement for males and females (59). In resting diurnal conditions, both males and females are found occupying individual spots, distanced at least a meter away from their closest neighbor. A close analysis shows that sex is relevant in spatial arrangements, as animals are more likely to have an opposite-sex than a same-sex closest neighbor. Although males and females hold same-sized territories, when the size of each territory is normalized to its owner's body size, sexual dimorphism arises as females hold relatively larger territories. This interesting difference is probably due to sex-biased reproductive requirements associated to anisogamy, which may lead to higher metabolic requirements in females and thus the need for larger foraging grounds. In male *G. omarorum* gonadosomatic index (GSI) did not show correlation to territory sizes, but circulating 11-ketotestosterone (11-KT, the main bioactive androgen in teleost fish) marginally predicted territory size (59). This data falls in line with the well documented relationship between androgens and male territorial behavior (60–62). In contrast, both female GSI and circulating estradiol show high predicting power on territory size, which constitutes the first report to associate circulating estradiol and territory size in a vertebrate species (59). In the light of the evidence that estradiol promotes female aggression (63–65), ovarian estradiol is likely involved in the modulation of breeding territorial aggression in this species. In summary, during the breeding season, sexually dimorphic individual traits seem to influence motivation toward territory defense in *G. omarorum* impacting on individual spacing in the wild in a sex-dependent manner.

During the non-breeding season (corresponding to the austral autumn-winter, from June to August), adults of *G. omarorum* occupy individual spots in the wild separated at least one meter

from the closest neighbor. Sex of individuals does not bias spacing, as closest neighbors are randomly opposite-sex or same-sex. Body size, but not sex, correlates positively with territory size (59). Motivation to maintain territories in the non-breeding season may be related to the fact that these fish continuously produce electric signals as a means of communicating and imaging their world. Electrogeneration is an energetically expensive process which has been associated with high basal metabolic requirements (39, 66) and most likely imposes high year-long foraging demands. Equally sized territories between males and females may reflect the same energetic requirements in both sexes.

GONAD-INDEPENDENT AGONISTIC BEHAVIOR MEDIATES NON-BREEDING TERRITORIAL BEHAVIOR

G. omarorum is one of the few teleost species in which the hormonal regulation of non-breeding aggression has been studied [see also damselfish, (22, 27, 67)], and the only teleost species in which the determinants of natural non-breeding spacing have been explored in the field (59).

The acquisition and defense of territories in non-breeding *G. omarorum* have been empirically shown to be mediated by agonistic encounters in laboratory settings (68). When staging dyadic agonistic encounters using a neutral plain arena, all fish engage in rapid escalated conflicts in which the dominant-subordinate status is achieved in <5 min. Subordinates end the struggle when they decide to stop attacking and retreat. In addition, they further signal their surrender electrically: first interrupting their EOD to hide from the dominant, then emitting transient electric submission signals, and finally, adopting a lower post-resolution EOD basal rate (69, 70). The intensity of submission signals emitted by the subordinate individual is correlated to the aggression levels displayed by the dominant (71). Body size is the only predictor of contest outcome, while individual sex has no significant influence (69). After resolution, dominants monopolize the acquired territory and actively exclude subordinate fish to the periphery of the tank (68). Laboratory evidence falls in line with what is observed in the wild, where non-breeding territory sizes are determined by body size and are unrelated to sex. Several pieces of evidence support that the non-breeding agonistic behavior of *G. omarorum* is independent of gonadal hormones. First, intra and intersexual non-breeding agonistic contests are indistinguishable (69, 72). Secondly, aggressive challenges do not have an effect on circulating 11-ketotestosterone (72). Moreover, the clearest evidence of gonadal independence of non-breeding aggression in *G. omarorum* is that agonistic behavior persists unchanged after castration. Gonadectomized and control dyads do not differ in contest outcome, dynamics, aggression levels, nor submissive displays (21), demonstrating that the low levels of non-breeding circulating gonadal hormones are not necessary for the occurrence of this behavior.

NON-GONADAL ESTROGENS MODULATE NON-BREEDING AGONISTIC BEHAVIOR

Brain estrogens are critical regulators of non-breeding aggression. In the absence of high circulating testosterone, brain derived estrogens may be synthesized from circulating adrenal dehydroepiandrosterone (DHEA), proposed to have a key role underlying non-breeding aggression in mammals and birds. DHEA is reported to have higher plasmatic levels in the non-breeding season in birds (26, 73), its levels may respond to social challenges in birds and mammals (26, 74, 75) and it can be metabolized in the brain into active androgens and estrogens (76, 77). In contrast to the breeding season, in non-breeding mammalian and avian models estrogens exert rapid effects upon aggression which reflect non-genomic mechanisms (30, 31, 78, 79). In turn, aggressive interactions can produce changes in steroid hormone levels in specific brain areas of the songbird model (76, 80).

In *G. omarorum* the influence of gonadal hormones in the non-breeding aggression has been ruled out by castration experiments (21), and the role of extra-gonadal steroid hormones has been tested via pharmacological manipulations. Short term involvement of androgens and estrogens was explored focusing on the effects these hormones have on the rapid dynamics of conflict and resolution. Acutely impeding aromatase action by administration of its inhibitor (Fadrozole, 60 min pre contest) in intrasexual dyads had a profound effect in non-breeding agonistic encounters of *G. omarorum*. Overall, results from both male-male and female-female contests show that the inhibition of estrogen synthesis causes a decrease in aggressive displays revealed by an important delay in initiating overt aggression. In addition, it decreases aggression levels and prevents potential winners (larger fish) from achieving dominance (21, 81). Direct short-term effects of androgens were ruled out, since acute treatment with androgen receptor antagonists showed no influence upon conflict engagement, aggression dynamics nor the establishment of dominant-subordinate status (81). If androgens were directly involved in the modulation of non-breeding aggression in *G. omarorum*, their action may be evinced in a longer time frame, as has been observed in other non-breeding territorial fish in which chronic androgen receptor blocking decreases aggression (22).

To date, the expression pattern of brain aromatase has been identified in several teleost species (82–89); including a recent study in the weakly electric fish *Apteronotus leptorhynchus* (90), which also exhibits territorial aggression in non-breeding conditions (43, 91). Aromatase mRNA was mapped in non-breeding male and female *A. leptorhynchus* in the telencephalon, preoptic area, hypothalamus, and pituitary gland, showing a high degree of regional conservation with previous reports in teleosts. Reports of the presence of high levels of aromatase in the social behavior network strongly suggest these neural circuits are affected by local estrogen production. Moreover, testosterone aromatization has reported effects in social behavior electric displays in *Apteronotus* (42, 92). The first transcriptomic study carried out in *G. omarorum* during the non-breeding season shows that aromatase, as well as other steroidogenic

enzymes are expressed in the preoptic area (93). This node of the social brain has a well-documented role in aggressive behavior (1, 94–97). Moreover, it has already been shown that preoptic area neuropeptides have a status-dependent role in the modulation of non-breeding aggression in *G. omarorum* (70, 98). The analysis of local brain synthesis of estrogens and androgens in this region regulating non-breeding aggression is currently underway.

Overall, research in *G. omarorum* point to brain estrogen as an important modulator of non-breeding aggression acting in regions of the social brain through rapid mechanisms.

STATE OF THE ART AND PERSPECTIVES: NEUROSTEROIDS UNDERLYING NON-BREEDING AGGRESSION

Currently, *G. omarorum* is the strongest teleost model to approach neuroendocrine mechanisms underlying non-breeding aggression. Contributions in this model demonstrate that brain estrogens are key regulators of non-breeding aggression in a much broader sense than previously reported. Revised evidence, brought together from both laboratory and natural settings, shed light on the sequence of events and underlying mechanisms leading to territory acquisition and spatial distribution in the wild (**Figure 1**). Fish contenders competing for territory display a short evaluation time and engage in escalated conflicts from which a clear dominant-subordinate status emerges. Males and females show no difference in aggressive behavior, but outcome is biased by body size: the larger fish wins and acquires the disputed territory. Agonistic behavior is independent of gonadal hormones and fast acting androgens, although it is strongly dependent on estrogenic action, revealed by the rapid and dramatic effect of blocking estrogen synthesis upon conflict engagement, aggression intensity and establishment of dominance. Agonistic behavior is a key element for the non-breeding distribution of fish in the wild in which animals hold sexually monomorphic territories and body size is the strongest determinant for territory size.

The year-long territorial behavior of *G. omarorum* opens exciting avenues of research on steroid modulation of aggression, and in particular, the yet unexplored role of both circulating and brain-derived steroids in breeding territorial aggression. We have two hypotheses on potential seasonal plasticity in the role of steroids regulating aggression, which are leading our current research. First, we understand that non-breeding contests produce a fast rise in brain estrogen in regions of the social behavior network. This estrogen peak has a rapid, non-genomic effect, promoting aggressive behavior, the fast establishment of dominance, and ultimately, at least in a short time scale, it correlates to the size of the acquired territory in the natural habitat. In absence of high circulating sex steroids, we propose this brain hormonal signature is important in enabling stable territory distributions in natural populations. Secondly, based on the correlation between GSI and territory size in the breeding season, and the independence of aggression from

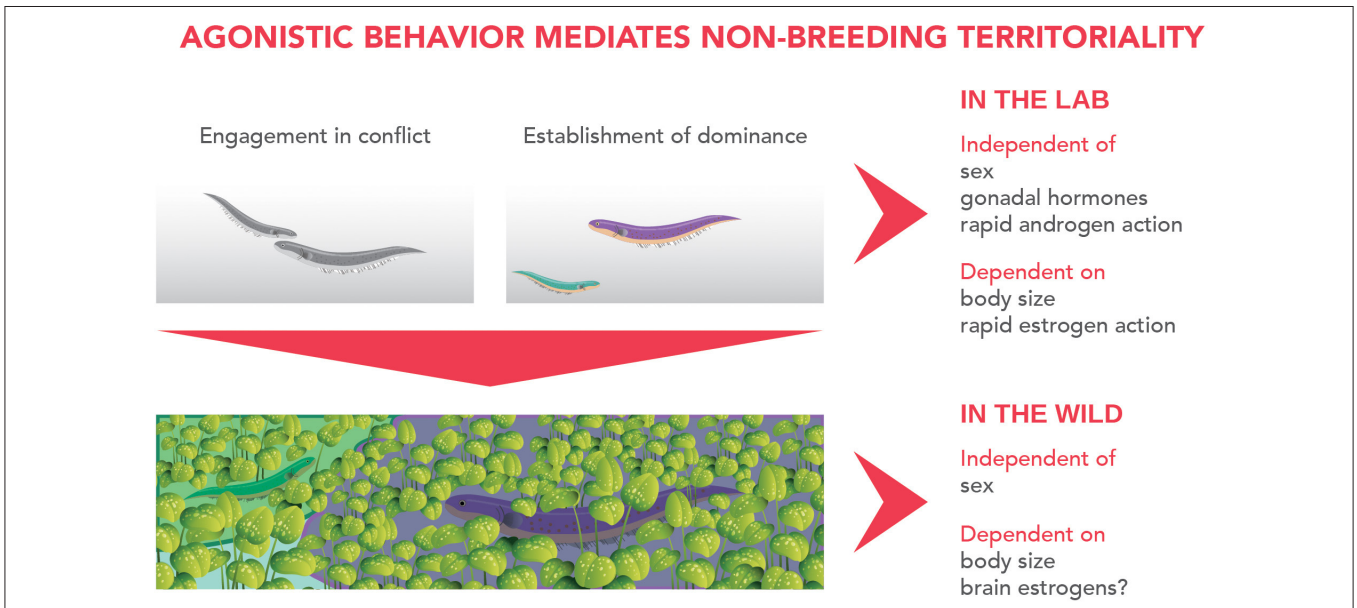

FIGURE 1 | Events and underlying mechanisms of non-breeding territoriality in *Gymnotus omarorum*. Laboratory evidence shows that agonistic behavior mediates territory acquisition, as after conflict resolution dominant animals monopolize the territory and actively exclude subordinate fish to the periphery of the tank. Body size, but not sex, is a strong predictor of conflict outcome. Aggression is maintained even in gonadectomized animals, indicating its independence of gonadal hormones. Behavioral pharmacology evinces aggression is also independent of rapid actions of androgens, although strongly dependent on rapid estrogenic action, as an aromatase inhibitor greatly influences conflict engagement, aggression intensity and establishment of dominance. This evidence suggests that brain-derived estrogens play a key role in agonistic behavior. Agonistic behavior most probably underlies territorial spacing in the natural habitat. Territory sizes are not sex-biased, but do depend on body size, and we propose that at least in the short-term after dominance establishment, they also correlate to brain estrogen levels.

gonads in the non-breeding season, we postulate that regulation of aggression varies seasonally. We hypothesize that estrogens and androgens maintain key roles as modulators, but their main sources alternate from the brain (in the non-breeding season) to the gonads (in the breeding season). In addition, we propose that non-breeding aggression depends exclusively upon brain-derived steroids, either produced *de novo* or from circulating precursors. Studies testing these two hypotheses are underway.

The contributions of *G. omarorum*, a teleost fish with persistent aggression uncoupled from seasonal breeding, expand concepts based on mammal and bird models to further understand the breadth of estrogenic regulation of aggression. Fish are the oldest and most diverse class of vertebrates. Thus, common regulation strategies suggest either a very strong conservation of the trait, or an independent evolution path arriving at the same solution, both underscoring the relevance and extensive impact of estrogens upon aggression.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AS and LQ conceived the general organization of the manuscript. AS, LZ, and LQ wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

Funding agencies: Agencia Nacional de Investigación e Innovación Grant ANII_ FCE 136381; Comisión Sectorial de Investigación Científica, Universidad de la República, Uruguay, Grant Grupos I+D (#883158). Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas.

REFERENCES

1. Goodson JL, Kabelik D. Dynamic limbic networks and social diversity in vertebrates: From neural context to neuromodulatory patterning. *Front Neuroendocrinol*. (2009) 30:429–41. doi: 10.1016/j.yfrne.2009.05.007
2. Newman SW. The medial extended amygdala in male reproductive behavior A node in the mammalian social behavior network. *Ann NY Acad Sci*. (1999) 877:242–57. doi: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb09271.x
3. O'Connell LA, Hofmann HA. Genes, hormones, and circuits: An integrative approach to study the evolution of social behavior. *Front Neuroendocrinol*. (2011) 32:320–35. doi: 10.1016/j.yfrne.2010.12.004
4. Kaufmann JH. On the definitions and functions of dominance and territoriality. *Biol Rev*. (1983) 58:1–20. doi: 10.1111/j.1469-185X.1983.tb00379.x
5. Nelson RJ. *Biology of Aggression*. New York, NY: Oxford University Press (2006).
6. Wilson EO. *Sociobiology: The New Synthesis*. Oxford: Belknap Press of Harvard U Press (1975).
7. Grant JWA. *Territoriality*. *Behavioural Ecology of Teleost Fishes*. Oxford: Oxford University Press (1997).
8. Huntingford FA, Turner AK, Downie LM. *Animal Conflict*. Boca Raton, FL: Chapman & Hall/CRC (1987).
9. Caldwell G, Glickman S, Smith E. Seasonal aggression independent of seasonal testosterone in wood rats. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1984) 81:5255–7. doi: 10.1073/pnas.81.16.5255
10. Kricher J. Behavioral ecology of tropical birds. *Wilson Bull*. (2001) 113:357–8. doi: 10.1676/0043-5643(2001)113[0357:OL]2.0.CO;2
11. Wingfield JC, Hahn TP. Testosterone and territorial behaviour in sedentary and migratory sparrows. *Anim Behav*. (1994) 47:77–89. doi: 10.1006/anbe.1994.1009
12. Heimovics SA, Trainor BC, Soma KK. Rapid effects of estradiol on aggression in birds and mice: the fast and the furious. *Integr Comp Biol*. (2015) 55:281–93. doi: 10.1093/icb/icv048
13. Munley KM, Rendon NM, Demas GE. Neural androgen synthesis and aggression: insights from a seasonally breeding rodent. *Front Endocrinol*. (2018) 9:136. doi: 10.3389/fendo.2018.00136
14. Burger AE, Millar RP. Seasonal changes of sexual and territorial behaviour and plasma testosterone levels in male lesser sheathbills (*Chionis minor*). *Zeitschrift Tierpsychol*. (1980) 52:397–406. doi: 10.1111/j.1439-0310.1980.tb00726.x
15. Logan CA, Wingfield JC. Autumnal territorial aggression is independent of plasma testosterone in mockingbirds. *Hormones Behav*. (1990) 24:568–81. doi: 10.1016/0018-506X(90)90042-V
16. Schwabl H, Kriner E. Territorial aggression and song of male European robins (*Erithacus rubecula*) in autumn and spring: effects of antiandrogen treatment. *Hormones Behav*. (1991) 25:180–94. doi: 10.1016/0018-506X(91)90049-N
17. Gwinner E, Rödl T, Schwabl H. Pair territoriality of wintering stonechats: behaviour, function and hormones. *Behav Ecol Sociobiol*. (1994) 34:321–7. doi: 10.1007/BF00197002
18. Soma KK, Sullivan K, Wingfield J. Combined aromatase inhibitor and antiandrogen treatment decreases territorial aggression in a wild songbird during the nonbreeding season. *Gen Comp Endocrinol*. (1999) 115:442–53. doi: 10.1006/gcen.1999.7334
19. Wingfield JC. Regulation of territorial behavior in the sedentary song sparrow, melospiza melodia morphna. *Hormones Behav*. (1994) 28:1–15. doi: 10.1006/hbeh.1994.1001
20. Wingfield JC, Lynn S, Soma KK. Avoiding the 'costs' of testosterone: ecological bases of hormone-behavior interactions. *Brain Behav Evol*. (2001) 57:239–51. doi: 10.1159/000047243
21. Jalabert C, Quintana L, Pessina P, Silva A. Extra-gonadal steroids modulate non-breeding territorial aggression in weakly electric fish. *Horm Behav*. (2015) 72:60–7. doi: 10.1016/j.yhbeh.2015.05.003
22. Vullioud P, Bshary R, Ros AFH. Intra- and interspecific aggression do not modulate androgen levels in dusky gregories, yet male aggression is reduced by an androgen blocker. *Horm Behav*. (2013) 64:430–8. doi: 10.1016/j.yhbeh.2013.06.007
23. Moore MC, Marler CA. Effects of testosterone manipulations on nonbreeding season territorial aggression in free-living male lizards, Sceloporus jarrovi. *Gen Comp Endocrinol*. (1987) 65:225–32. doi: 10.1016/0016-6480(87)90170-5
24. Demas GE, Cooper MA, Albers HE, Soma KK. Novel mechanisms underlying neuroendocrine regulation of aggression: a synthesis of rodent, avian, and primate studies. In: *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. (2007). p. 337–72.
25. Jasnow AM, Huhman KL, Bartness TJ, Demas GE. Short-day increases in aggression are inversely related to circulating testosterone concentrations in male Siberian hamsters (Phodopus sungorus). *Hormon Behav*. (2000) 38:102–10. doi: 10.1006/hbeh.2000.1604
26. Hau M, Stoddard ST, Soma KK. Territorial aggression and hormones during the non-breeding season in a tropical bird. *Hormones Behav*. (2004) 45:40–9. doi: 10.1016/j.yhbeh.2003.08.002
27. Ros AFH, Vullioud P, Bruintjes R, Vallat A, Bshary R. Intra- and interspecific challenges modulate cortisol but not androgen levels in a year-round territorial damselfish. *J Exp Biol*. (2014) 217:1768. doi: 10.1242/jeb.093666
28. Soma KK, Sullivan KA, Tramontin AD, Saldanha CJ, Schlinger BA, Wingfield JC. Acute and chronic effects of an aromatase inhibitor on territorial aggression in breeding and nonbreeding male song sparrows. *J Comp Physiol A*. (2000) 186:759–69. doi: 10.1007/s003590000129
29. Soma KK, Tramontin AD, Wingfield JC. Oestrogen regulates male aggression in the non-breeding season. *Proc Biol Sci*. (2000) 267:1089–96. doi: 10.1098/rspb.2000.1113

30. Trainor BC, Sima Finy M, Nelson RJ. Rapid effects of estradiol on male aggression depend on photoperiod in reproductively non-responsive mice. *Hormones Behav*. (2008) 53:192–9. doi: 10.1016/j.yhbeh.2007.09.016
31. Trainor BC, Lin S, Finy MS, Rowland MR, Nelson RJ. Photoperiod reverses the effects of estrogens on male aggression via genomic and nongenomic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2007) 104:9840. doi: 10.1073/pnas.0701819104
32. Soma KK, Schlinger BA, Wingfield JC, Saldanha CJ. Brain aromatase, 5α-reductase, and 5β-reductase change seasonally in wild male song sparrows: relationship to aggressive and sexual behavior. *J Neurobiol*. (2003) 56:209–21. doi: 10.1002/neu.10225
33. Soma KK, Bindra RK, Gee J, Wingfield JC, Schlinger BA. Androgen-metabolizing enzymes show region-specific changes across the breeding season in the brain of a wild songbird. *J Neurobiol*. (1999) 41:176–88. doi: 10.1002/(SICI)1097-4695(19991105)41:2<176::AID-NEU2>3.0.CO;2-2
34. Diotel N, Do-Rego J-L, Anglade I, Vaillant C, Pellegrini E, Vaudry H, et al. The brain of teleost fish, a source, and a target of sexual steroids. *Front Neurosci*. (2011) 5:137. doi: 10.3389/fnins.2011.00137
35. Forlano PM, Bass AH. Seasonal plasticity of brain aromatase mRNA expression in glia: divergence across sex and vocal phenotypes. *J Neurobiol*. (2005) 65:37–49. doi: 10.1002/neu.20179
36. O'Connell LA, Hofmann HA. Evolution of a vertebrate social decision-making network. *Science*. (2012) 336:1154. doi: 10.1126/science.1218889
37. Diotel N, Page YL, Mouriec K, Tong S-K, Pellegrini E, Vaillant C, et al. Aromatase in the brain of teleost fish: expression, regulation and putative functions. *Front Neuroendocrinol*. (2010) 31:172–92. doi: 10.1016/j.yfrne.2010.01.003
38. Pasmanik M, Callard GV. Aromatase and 5α-reductase in the teleost brain, spinal cord, and pituitary gland. *Gen Comp Endocrinol*. (1985) 60:244–51. doi: 10.1016/0016-6480(85)90320-X
39. Markham MR, Ban Y, McCauley AG, Maltby R. Energetics of sensing and communication in electric fish: a blessing and a curse in the anthropocene? *Integr Comp Biol*. (2016) 56:889–900. doi: 10.1093/icb/icw104
40. Bass AH. A hormone-sensitive communication system in an electric fish. *J Neurobiol*. (1986) 17:131–55. doi: 10.1002/neu.480170303
41. Dulka J, Maler L, Ellis W. Androgen-induced changes in electrocommunicatory behavior are correlated with changes in substance P-like immunoreactivity in the brain of the electric fish Apteronotus leptorhynchus. *J Neurosci*. (1995) 15:1879. doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-03-01879.1995
42. Dulka JG, Maler L. Testosterone modulates female chirping behavior in the weakly electric fish, Apteronotus leptorhynchus. *J Comp Physiol A*. (1994) 174:331–43. doi: 10.1007/BF00240215
43. Dunlap KD. Hormonal and body size correlates of electrocommunication behavior during dydadic interactions in a weakly electric fish, Apteronotus leptorhynchus. *Hormones Behav*. (2002) 41:187–94. doi: 10.1006/hbeh.2001.1744
44. Dunlap KD, Chung M, Castellano JF. Influence of long-term social interaction on chirping behavior, steroid levels and neurogenesis in weakly electric fish. *J Exp Biol*. (2013) 216:2434. doi: 10.1242/jeb.082875
45. Gavassa S, Goldina A, Silva AC, Stoddard PK. Behavioral ecology, endocrinology and signal reliability of electric communication. *J Exp Biol*. (2013) 216:2403. doi: 10.1242/jeb.082255
46. Pouso P, Quintana L, Bolatto C, Silva AC. Brain androgen receptor expression correlates with seasonal changes in the behavior of a weakly electric fish, *Brachyhypopomus gauderio*. *Hormones Behav*. (2010) 58:729–36. doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.07.005
47. Smith GT. Evolution and hormonal regulation of sex differences in the electrocommunication behavior of ghost knifefishes (Apteronotidae). *J Exp Biol*. (2013) 216:2421. doi: 10.1242/jeb.082933
48. Zakon H. Weakly electric fish as model systems for studying long-term steroid action on neural circuits. *Brain Behav Evol*. (1993) 42:242–51. doi: 10.1159/000114158
49. Borde M, Quintana L, Comas V, Silva A. Hormone-mediated modulation of the electromotor CPG in pulse-type weakly electric fish. Commonalities and differences across species. *Dev Neurobiol*. (2020) 80:70–80. doi: 10.1002/dneu.22732
50. Black-Cleworth P. The role of electrical discharges in the non-reproductive social behaviour of *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Pisces). *Anim Behav Monographs*. (1970) 3:1–IN1. doi: 10.1016/S0066-1856(70)80001-2
51. Elliott JM. Mechanisms responsible for population regulation in young migratory trout, *Salmo trutta*. III The role of territorial behaviour. *J Anim Ecol*. (1990) 59:803–18. doi: 10.2307/5015
52. Keeley ER. An experimental analysis of territory size in juvenile steelhead trout. *Anim Behav*. (2000) 59:477–90. doi: 10.1006/anbe.1999.1288
53. Woodward G, Ebenman B, Emmerson M, Montoya JM, Olesen JM, Valido A, et al. Body size in ecological networks. *Trends Ecol Evol*. (2005) 20:402–9. doi: 10.1016/j.tree.2005.04.005
54. Adkins-Regan E. *Hormones and Animal Social Behavior*. New Jersey, NJ: Princeton University Press (2005).
55. Mougeot F, Redpath SM, Moss R, Matthiopoulos J, Hudson PJ. Territorial behaviour and population dynamics in red grouse Lagopus lagopus scoticus. I Population experiments. *J Anim Ecol*. (2003) 72:1073–82. doi: 10.1046/j.1365-2656.2003.00781.x
56. Watson A, Parr R. Hormone implants affecting territory size and aggressive and sexual behaviour in red grouse. *Scand J Ornithol*. (1981) 12:55–61. doi: 10.2307/3675905
57. Wauters L, Dhondt AA. Spacing behaviour of red squirrels, *Sciurus vulgaris*: variation between habitats and the sexes. *Anim Behav*. (1992) 43:297–311. doi: 10.1016/S0003-3472(05)80225-8
58. Smith DC. Home range and territory in the striped plateau lizard. (*Sceloporus virgatus*). *Anim Behav*. (1985) 33:417–27. doi: 10.1016/S0003-3472(85)80066-X
59. Zubizarreta L, Quintana L, Hernández D, Teixeira de Mello F, Meerhoff M, Massaaki Honji R, et al. (2020) Seasonal and social factors associated with spacing in a wild territorial electric fish. *PLoS ONE*. 15:e0228976. doi: 10.1371/journal.pone.0228976
60. Monaghan EP, Glickman SE. Hormones and aggressive behavior. *Behav Endocrinol*. (1992) 134:692–4.
61. Nelson RJ. *An Introduction to Behavioral Endocrinology*. 3rd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates (2005).
62. Simon NG, Lu S-F. Androgens and aggression. In: Nelson RJ, editor. *Biology of Aggression*. New York, NY: Oxford University Press (2006). p. 211–30.
63. Albert DJ, Jonik RH, Walsh ML. Hormone-dependent aggression in female rats: testosterone implants attenuate the decline in aggression following ovariectomy. *Physiol Behav*. (1990) 47:659–64. doi: 10.1016/0031-9384(90)90074-E
64. Rendon NM, Amez AC, Proffitt MR, Bauserman ER, Demas GE. Aggressive behaviours track transitions in seasonal phenotypes of female Siberian hamsters. *Funct Ecol*. (2017) 31:1071–81. doi: 10.1111/1365-2435.12816
65. Scaia MF, Morandini L, Noguera C, Trudeau VL, Somoza GM, Pandolfi M. Can estrogens be considered as key elements of the challenge hypothesis? The case of intrasexual aggression in a cichlid fish. *Physiol Behav*. (2018) 194:481–90. doi: 10.1016/j.physbeh.2018.06.028
66. Stoddard PK, Salazar VL. Energetic cost of communication. *J Exp Biol*. (2011) 214:200. doi: 10.1242/jeb.047910
67. Ros AFH, Damjanovic K, Glauser G, Bshary R. No scope for social modulation of steroid levels in a year-round territorial damselfish. *J Exp Zool Part A Ecol Genet Physiol*. (2015) 323:80–8. doi: 10.1002/jez.1900
68. Perrone R, Pedraja F, Valiño G, Tassino B, Silva A. Non-breeding territoriality and the effect of territory size on aggression in the weakly electric fish, *Gymnotus omarorum*. *Acta Ethol*. (2019) 22:79–89. doi: 10.1007/s10211-019-00309-7
69. Batista G, Zubizarreta L, Perrone R, Silva A. Non-sex-biased dominance in a sexually monomorphic electric fish: fight structure and submissive electric signalling. *Ethology*. (2012) 118:398–410. doi: 10.1111/j.1439-0310.2012.02022.x
70. Perrone R, Silva AC. Status-dependent vasotocin modulation of dominance and subordination in the weakly electric fish *Gymnotus omarorum*. *Front Behav Neurosci*. (2018) 12:1. doi: 10.3389/fnbeh.2018.00001
71. Zubizarreta L, Stoddard PK, Silva A. Aggression levels affect social interaction in the non-breeding territorial aggression of the weakly electric fish, *Gymnotus omarorum*. *Ethology*. (2015) 121:8–16. doi: 10.1111/eth.12299
72. Quintana L, Zubizarreta L, Jalabert C, Batista G, Perrone R, Silva A. Building the case for a novel teleost model of non-breeding

aggression and its neuroendocrine control. *J Physiol*. (2016) 110:224–32. doi: 10.1016/j.jphysparis.2016.11.009
73. Soma KK, Wingfield JC. Dehydroepiandrosterone in songbird plasma: seasonal regulation and relationship to territorial aggression. *Gen Comp Endocrinol*. (2001) 123:144–55. doi: 10.1006/gcen.2001.7657
74. Soma KK, Rendon NM, Boonstra R, Albers HE, Demas GE. DHEA effects on brain and behavior: insights from comparative studies of aggression. *J Steroid Biochem Mol Biol*. (2015) 145:261–72. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.05.011
75. Rendon NM, Rudolph LM, Sengelaub DR, Demas GE. The agonistic adrenal: melatonin elicits female aggression via regulation of adrenal androgens. *Proc R Soc B*. (2015) 282:20152080. doi: 10.1098/rspb.2015.2080
76. Heimovics SA, Prior NH, Ma C, Soma KK. Rapid effects of an aggressive interaction on dehydroepiandrosterone, testosterone and oestradiol levels in the male song sparrow brain: a seasonal comparison. *J Neuroendocrinol*. (2016) 28:12345. doi: 10.1111/jne.12345
77. Schlinger BA, Pradhan DS, Soma KK. 3β-HSD activates DHEA in the songbird brain. *Neurochem Int*. (2008) 52:611–20. doi: 10.1016/j.neuint.2007.05.003
78. Heimovics SA, Ferris JK, Soma KK. Non-invasive administration of 17β-estradiol rapidly increases aggressive behavior in non-breeding, but not breeding, male song sparrows. *Hormones Behav*. (2015) 69:31–8. doi: 10.1016/j.yhbeh.2014.11.012
79. Laredo SA, Villalon Landeros R, Dooley JC, Steinman MQ, Orr V, Silva AL, et al. Nongenomic effects of estradiol on aggression under short day photoperiods. *Hormones Behav*. (2013) 64:557–65. doi: 10.1016/j.yhbeh.2013.06.002
80. Charlier TD, Newman AEM, Heimovics SA, Po KWL, Saldanha CJ, Soma KK. Rapid effects of aggressive interactions on aromatase activity and oestradiol in discrete brain regions of wild male white-crowned sparrows. *J Neuroendocrinol*. (2011) 23:742–53. doi: 10.1111/j.1365-2826.2011.02170.x
81. Zubizarreta L, Silva AC, Quintana L. The estrogenic pathway modulates non-breeding female aggression in a teleost fish. *Physiol Behav*. (2020) 220:112883. doi: 10.1016/j.physbeh.2020.112883
82. Dong W, Wang L, Thornton C, Scheffler BE, Willett KL. Benzo(a)pyrene decreases brain and ovarian aromatase mRNA expression in *Fundulus heteroclitus*. *Aquat Toxicol*. (2008) 88:289–300. doi: 10.1016/j.aquatox.2008.05.006
83. Forlano PM, Deitcher DL, Myers DA, Bass AH. Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. *J Neurosci*. (2001) 21:8943. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-22-08943.2001
84. Goto-Kazeto R, Kight KE, Zohar Y, Place AR, Trant JM. Localization and expression of aromatase mRNA in adult zebrafish. *Gen Comp Endocrinol*. (2004) 139:72–84. doi: 10.1016/j.ygcen.2004.07.003
85. Hallgren S, Olsén KH. Effects on guppy brain aromatase activity following short-term steroid and 4-nonylphenol exposures. *Environ Toxicol*. (2010) 25:261–71. doi: 10.1002/tox.20494
86. Jeng S-R, Pasquier J, Yueh W-S, Chen G-R, Lee Y-H, Dufour S, et al. Differential regulation of the expression of cytochrome P450 aromatase, estrogen and androgen receptor subtypes in the brain–pituitary–ovarian axis of the Japanese eel. (*Anguilla japonica*) reveals steroid dependent and independent mechanisms. *Gen Comp Endocrinol*. (2012) 175:163–72. doi: 10.1016/j.ygcen.2011.11.005
87. Menuet A, Pellegrini E, Brion F, Gueguen M-M, Anglade I, Pakdel F, et al. Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. *J Comp Neurol*. (2005) 485:304–20. doi: 10.1002/cne.20497
88. Menuet A, Anglade I, Le Guevel R, Pellegrini E, Pakdel F, Kah O. Distribution of aromatase mRNA and protein in the brain and pituitary of female rainbow trout: Comparison with estrogen receptor α. *J Comp Neurol*. (2003) 462:180–93. doi: 10.1002/cne.10726
89. Strobl-Mazzulla PH, Lethimonier C, Gueguen MM, Karube M, Fernandino JI, Yoshizaki G, et al. Brain aromatase (Cyp19A2) and estrogen receptors, in larvae and adult pejerrey fish *Odontesthes bonariensis*: neuroanatomical and functional relations. *Gen Comp Endocrinol*. (2008) 158:191–201. doi: 10.1016/j.ygcen.2008.07.006
90. Shaw K, Krahe R. Pattern of aromatase mRNA expression in the brain of a weakly electric fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *J Chem Neuroanat*. (2018) 90:70–9. doi: 10.1016/j.jchemneu.2017.12.009
91. Triefenbach FA, Zakon HH. Changes in signalling during agonistic interactions between male weakly electric knifefish, *Apteronotus leptorhynchus*. *Anim Behav*. (2008) 75:1263–72. doi: 10.1016/j.anbehav.2007.09.027
92. Meyer JH, Leong M, Keller CH. Hormone-induced and maturational changes in electric organ discharges and electroreceptor tuning in the weakly electric fishApteronotus. *J Comp Physiol A*. (1987) 160:385–94. doi: 10.1007/BF00613028
93. Eastman G, Valiño G, Radío S, Young R, Quintana L, Zakon H, et al. Brain transcriptomics of agonistic behaviour in the weakly electric fish *Gymnotus omarorum*, a wild teleost model of non-breeding aggression. *Sci Rep*. (2020) 10:9496. doi: 10.1038/s41598-020-66494-9
94. Kelly AM, Goodson JL. Social functions of individual vasopressin-oxytocin cell groups in vertebrates: what do we really know? *Front Neuroendocrinol*. (2014) 35:512–29. doi: 10.1016/j.yfrne.2014.04.005
95. Moore FL, Lowry CA. Comparative neuroanatomy of vasotocin and vasopressin in amphibians and other vertebrates. *Comp Biochem Physiol C*. (1998) 119:251–60. doi: 10.1016/S0742-8413(98)00014-0
96. Santangelo N, Bass AH. New insights into neuropeptide modulation of aggression: field studies of arginine vasotocin in a territorial tropical damselfish. *Proc R Soc B Biol Sci*. (2006) 273:3085–92. doi: 10.1098/rspb.2006.3683
97. Veenema AH, Beiderbeck DI, Lukas M, Neumann ID. Distinct correlations of vasopressin release within the lateral septum and the bed nucleus of the stria terminalis with the display of intermale aggression. *Hormones Behav*. (2010) 58:273–81. doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.03.006
98. Pouso P, Radmilovich M, Silva A. An immunohistochemical study on the distribution of vasotocin neurons in the brain of two weakly electric fish, *Gymnotus omarorum* and *Brachyhypopomus gauderio*. *Tissue Cell*. (2017) 49:257–69. doi: 10.1016/j.tice.2017.02.003

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Silva, Zubizarreta and Quintana. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.