

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

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 O₂. 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 amigas, 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
<i>Gymnotus omarorum</i> 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 <i>Gymnotus omarorum</i> 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 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).

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 influyen 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 descritas 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 p450_{scc}. 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 p450_{arom}, también llamada aromatasa, para producir estrógenos (17 β - 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).

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 descrito 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).

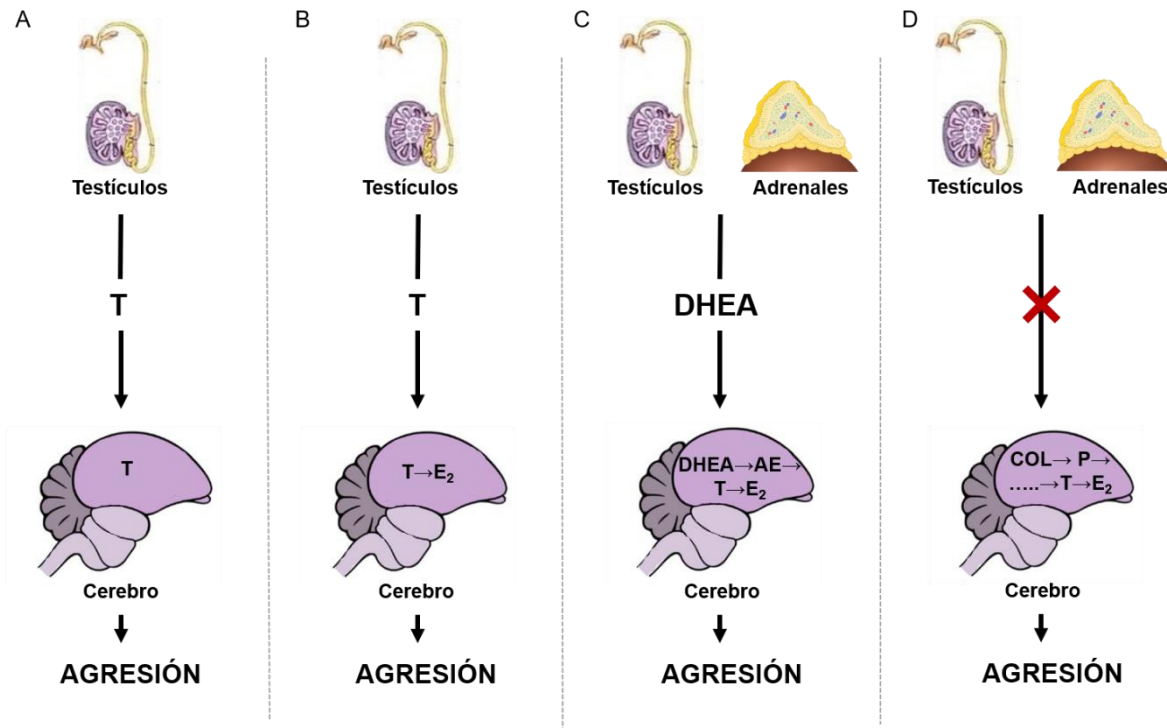


Figura 2: Vías por las cuales los esteroides sexuales pueden modular la conducta agonística en machos. A- La testosterona gonadal actúa directamente en el cerebro. B- La testosterona gonadal se aromatiza a 17β -estradiol en el cerebro. C- La DHEA adrenal se convierte en testosterona y 17β -estradiol 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 descrita 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.

CONDUCTA AGONÍSTICA NO REPRODUCTIVA

Dinámica de la conducta agonística

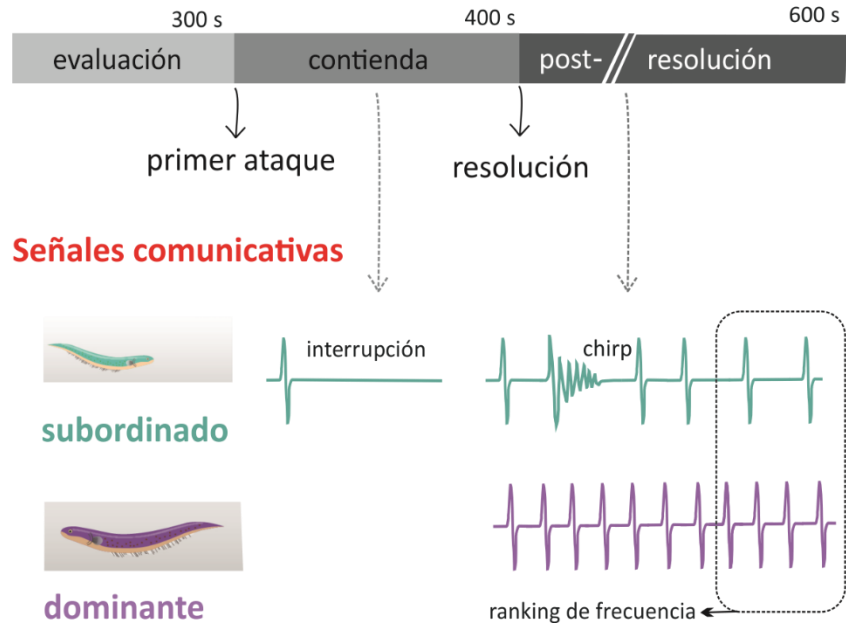
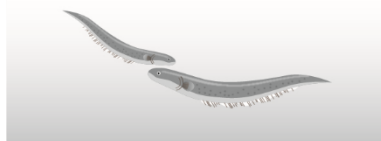


Figura 3: Esquema representativo de la conducta agonística no reproductiva en *Gymnotus omarorum*. Dinámica de los encuentros agonísticos territoriales. Los conflictos presentan tres fases; 1- Evaluación: desde la apertura de la compuerta a la ocurrencia del primer ataque; 2- Contienda: desde la ocurrencia 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).

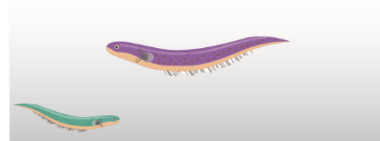
En esta inusual conducta agonística territorial no reproductiva, el resultado de una contienda depende del tamaño corporal, y el sexo no impacta en la probabilidad de ser dominante (Batista et al. 2012). La agresión territorial no reproductiva de *G. omarorum* es independiente de hormonas gonadales, 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).

LA CONDUCTA AGONISTICA MEDIA LA TERRITORIALIDAD NO REPRODUCTIVA

OCURRENCIA DE CONFLICTO



ESTATUS Y TERRITORIALIDAD



Independiente de - sexo

- hormonas gonadales (machos)

Dependiente de - tamaño corporal

- acción estrogénica rápida (machos)

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 *Gymnotus 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 diseccionar 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 diada 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 descrita 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).

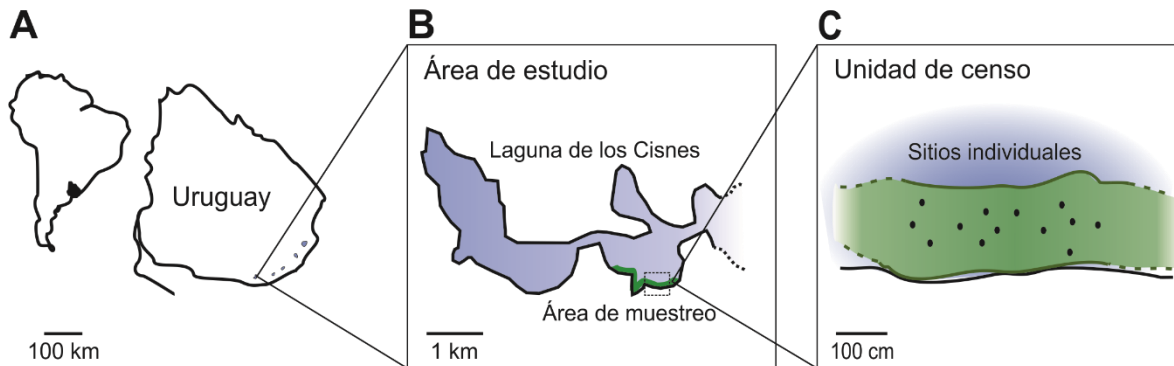


Figura I.1: Área de estudio y método de muestreo. A. El sitio de estudio se localiza en Maldonado, Uruguay, en la Laguna de los Cisnes. B. La zona litoral de la laguna está cubierta por vegetación acuática que crean una mata extensa que constituye el área de muestreo. C. Unidad de censo ilustrando los 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 descrito 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, °C), 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 = $Q10 = \text{DOE}_{\text{freq}} \times T / \text{DOE}_{\text{freq}} \times (T + 10)$ (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 °C. Las gónadas fueron disecadas, almacenadas en hielo seco y pesadas en el laboratorio para calcular el índice gonadosomático ($GSI = [\text{peso gónada} / \text{peso corporal}] \times 100$) (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 E₂ 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 E₂ (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 E₂ 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 (O₂ y T) se compararon entre estaciones por la prueba *U* de Mann-Whitney. Para analizar la heterogeneidad de O₂ 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 O₂ y la frecuencia de la DOE y contenido de O₂ 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 E₂ 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 O₂, además de influenciar es espaciamiento, mostraba asociación con variables morfológicas y fisiológicas (IGS, DOE_{freq}, niveles de E₂). 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 O₂ del agua mostraron diferencias estacionales. La temperatura del agua fue más alta en el período reproductivo (27.3 ± 0.1 °C, N = 36 vs 11.3 ± 0.5 °C, N = 60; $p = 1 \times 10^{-4}$, prueba U de Mann Whitney), mientras que la concentración de O₂ 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; $p = 4 \times 10^{-3}$, 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, $T = 5.9$, $p = 1 \times 10^{-4}$, 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 O₂ período reproductivo = 20.4 ± 9.3 %, CV medio O₂ período no reproductivo = 25.9 ± 14.6 %). Por lo tanto, exploramos si el O₂ contribuye al patrón espacial. Durante el período reproductivo, la concentración de O₂ 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 O₂ presentó un sesgo hacia la izquierda, y mostró una moda en 11 mg/l (Fig. I.2B, gris).

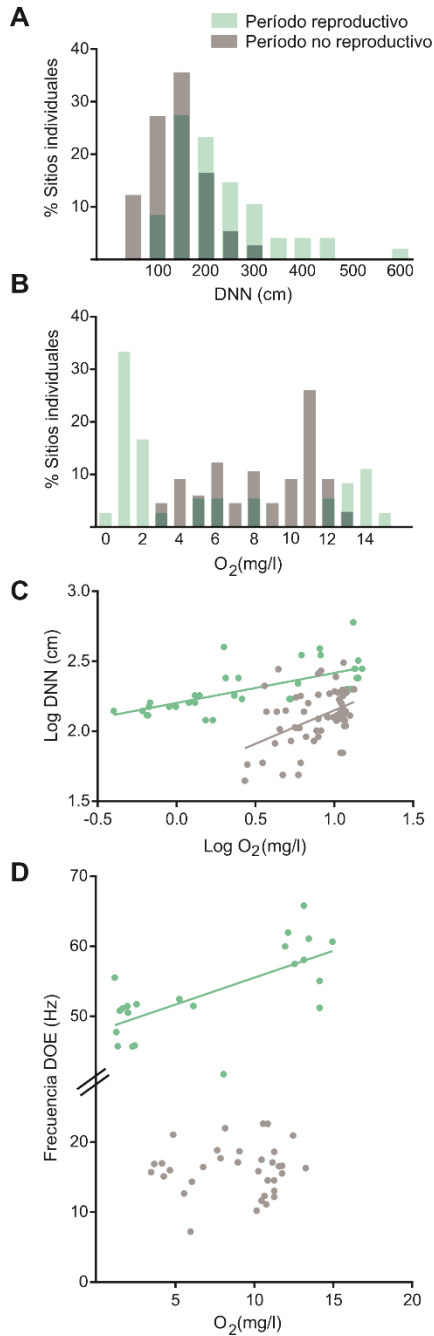


Figura I.2: Distribución espacial basada en variables ambientales (Estudio 1). El período reproductivo se representa en verde, y el no reproductivo en gris; la superposición de las dos estaciones se ilustra en verde oscuro. A. Distribución de frecuencias de distancia al vecino más cercano (DNN, en cm). 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 O₂ y DNN fue significativa y positiva tanto en el período reproductivo ($R^2 = 0.44$, $p = 1 \text{ exp } -4$, $N = 31$, Fig. I.2C verde) como en el período no reproductivo ($R^2 = 0.21$, $p = 1 \text{ exp } -4$, $N = 50$, Fig. I.2C gris). De manera interesante, los niveles de O₂ 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: $R^2 = 0.47$, $p = 5 \text{ exp } -4$, $N = 22$, Fig. I.2D verde; no reproductivo: $R^2 = 1 \text{ exp } -3$, $p = 0.54$, $N = 39$, 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 E₂ con una media de 293.7 ± 97.7 pg/ml y los machos una media de $11\text{-KT } 399.1 \pm 140.9$ pg/ml. El tamaño corporal medio fue mayor en el período reproductivo ($p = 1 \text{ exp } -4$, test de t, $T = 6.6$, $N_{\text{repro}} = 28$, $N_{\text{no repro}} = 53$). Además, la frecuencia de la DOE corregida por temperatura fue más alta ($p = 1 \text{ exp } -4$, test de t, $T = 18.8$, $N_{\text{repro}} = 30$, $N_{\text{no repro}} = 36$), DNN fue mayor ($p = 1 \text{ exp } -4$, test de t, $T = 5.6$, $N_{\text{repro}} = 31$, $N_{\text{no repro}} = 46$) y DNN relativo (DNN/longitud corporal) fueron también mayores durante el período reproductivo ($p = 9 \text{ exp } -3$, test de t, $T = 2.7$, $N_{\text{repro}} = 30$, $N_{\text{no repro}} = 46$).

Los factores que influyen a 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 E₂ 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 E₂ 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 E₂ 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 \pm 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 \pm 0.5 n = 13	24.5 \pm 0.9 n = 15	41.0 \pm 1.1 n = 13	39.3 \pm 0.9 n = 17	220 \pm 20 n = 13	230 \pm 30 n = 18	9.8 \pm 0.8 n = 13	9.9 \pm 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 \pm 0.9 n = 26	17.4 \pm 0.8 n = 27	20.0 \pm 1.2 n = 18	19.3 \pm 0.95 n = 18	113 \pm 10 n = 23	120 \pm 10 n = 23	7.0 \pm 0.6 n = 23	7.8 \pm 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)	<i>-0.51</i> (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, $R^2 = 7 \text{ exp-}3$, 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: $1.1 \pm 0.22 \%$ N = 9 vs $0.6 \pm 0.09 \%$ N = 11; p = 0.02, prueba de t, T = 2.3. Machos: $0.24 \pm 0.03 \%$ 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 E₂ circulante en hembras reproductivas (p = $2 \text{ exp-}3$, $R^2 = 0.76$, N = 9, datos no mostrados). El IGS presentó una relación positiva con el DNN solamente en hembras reproductivas (Hembras: p = $1 \text{ exp-}3$, $R^2 = 0.8$, 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 O₂ del agua presentó una relación positiva con el E₂ circulante de las hembras reproductivas (p = 0.03, $R^2 = 0.41$, N = 11, Fig. I.3E) y el O₂ 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 O₂, aunque el n fue pequeño para realizar la regresión (N = 5, Fig. I.3E).

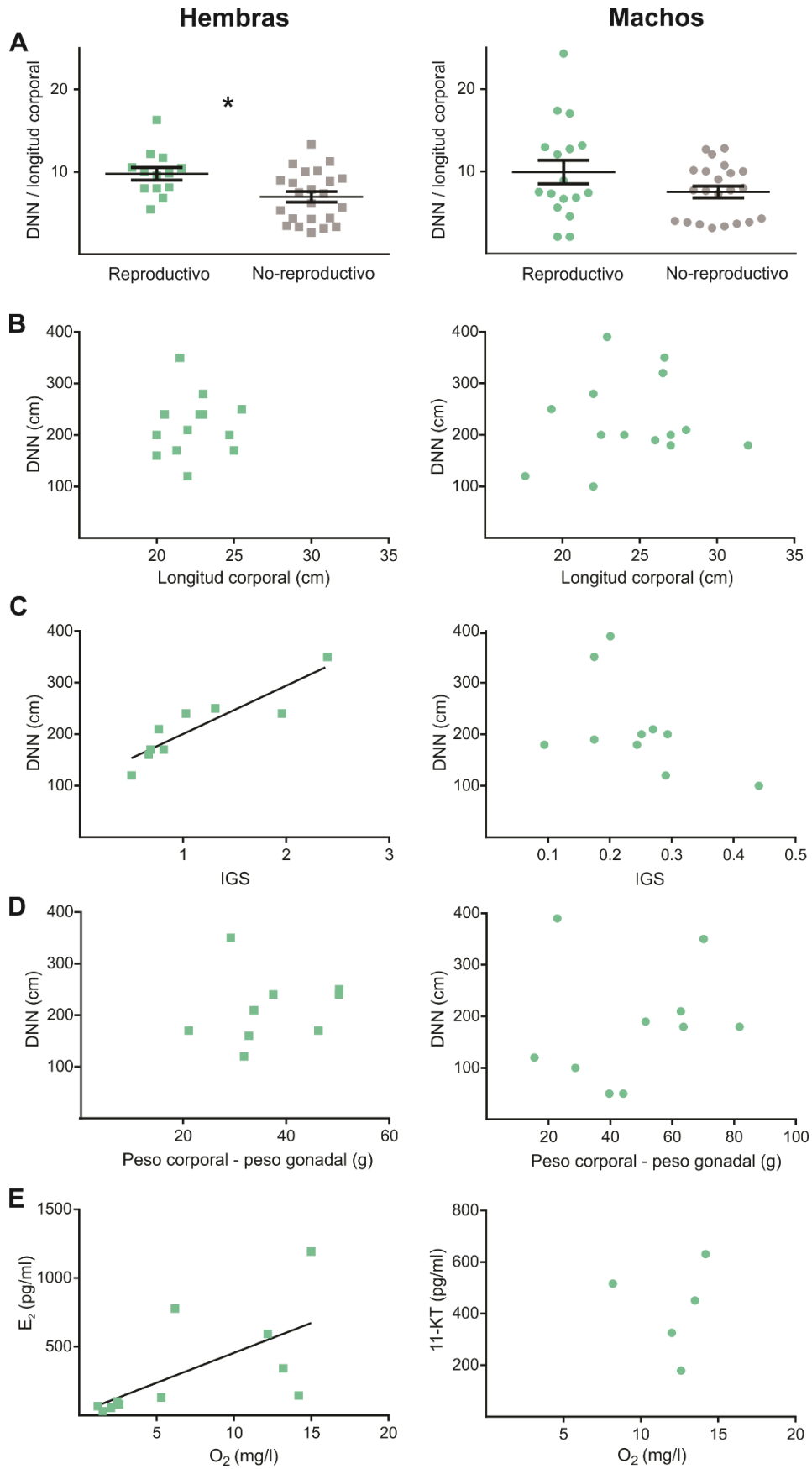


Figura I.3: Aparición del dimorfismo sexual durante el período reproductivo

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: $p = 0.8$, $R^2 = 7 \text{ exp-}3$, $N = 13$; machos $p = 0.7$, $R^2 = 0.01$, $N = 15$. **C-** Regresión lineal entre GSI y DNN (cm) en el período reproductivo. Hembras: $p = 1 \text{ exp-}3$, $R^2 = 0.8$, $N = 9$; 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: $p = 0.7$, $R^2 = 0.02$, $N = 9$. 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 macho 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).

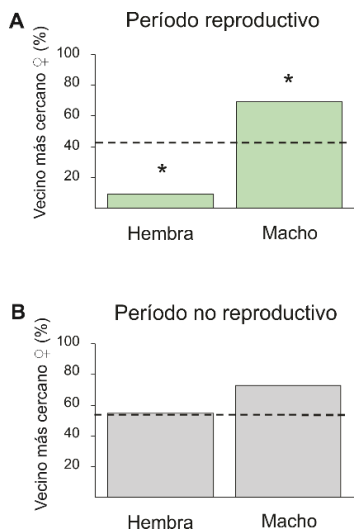


Figura I.4: Estacionalidad en la distribución espacial de los sexos (datos obtenidos en Estudio 2). Sexo del vecino más cercano (expresado en porcentaje) cuando el pez focal es una hembra o un macho, en período reproductivo (A, arriba), y en período no reproductivo (B, abajo). La línea punteada representa 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 O₂ 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 O₂, 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 O₂ que correlacionaron con el tamaño territorial en los dos períodos (Fig. 1.2C). 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 O₂ más bajo que el período no reproductivo (Fig. 1.2). 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 dulceacuícola 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 señala 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.

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 influyen 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 E₂ correlacionaron con el tamaño territorial, combinado con reportes de que el E₂ promueve la agresión en hembras (Albert et al. 1990; Rendon et al. 2017; Scaia et al. 2018), sugiere que el E₂ gonadal modula la conducta territorial en *G. omarorum*. Hipotetizamos que la secreción de E₂ 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 O₂ y las características individuales de las hembras, muestra que los niveles de O₂ correlacionan positivamente con el E₂ circulante (Fig. 1.3E) y marginalmente con el IGS. Estos datos nos llevan a especular que las hembras compiten por territorios con mayor contenido de O₂, 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. omarorum*. 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 O₂), 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 factor 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 O₂. 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 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (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 Uruguay). 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, $p = 0.57$, $n_{OIL} = 6$, $n_{PBS} = 6$).

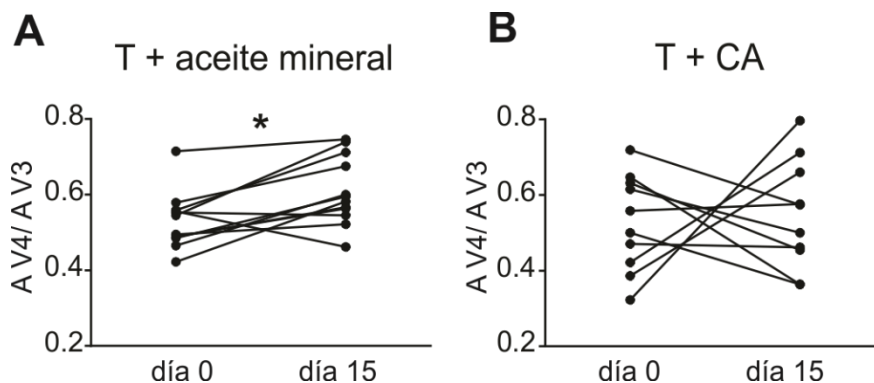


Figura II.1: Prueba de la efectividad del antagonista de receptores de andrógeno acetato de ciproterona (CA) en *Gymnotus omarorum*. A. Animales implantados con testosterona (T) y sometidos a una inyección diaria de aceite mineral ($n=12$) durante 15 días, presentaron un cambio esperado en la forma de onda de la DOE (Ardanaz et al., 2001), donde se observa un aumento en la amplitud del componente V4 en comparación con el día 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 días, 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 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ disuelta en aceite mineral para alcanzar una dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{gbw}$) 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 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ disuelta en aceite mineral para alcanzar una dosis de 20 $\mu\text{g}/\text{gbw}$) 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 diadas tratadas con FAD o CA.

Las diadas 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 x 40 x 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 descritos 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 requisitos 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 \pm 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.

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 descritas 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).

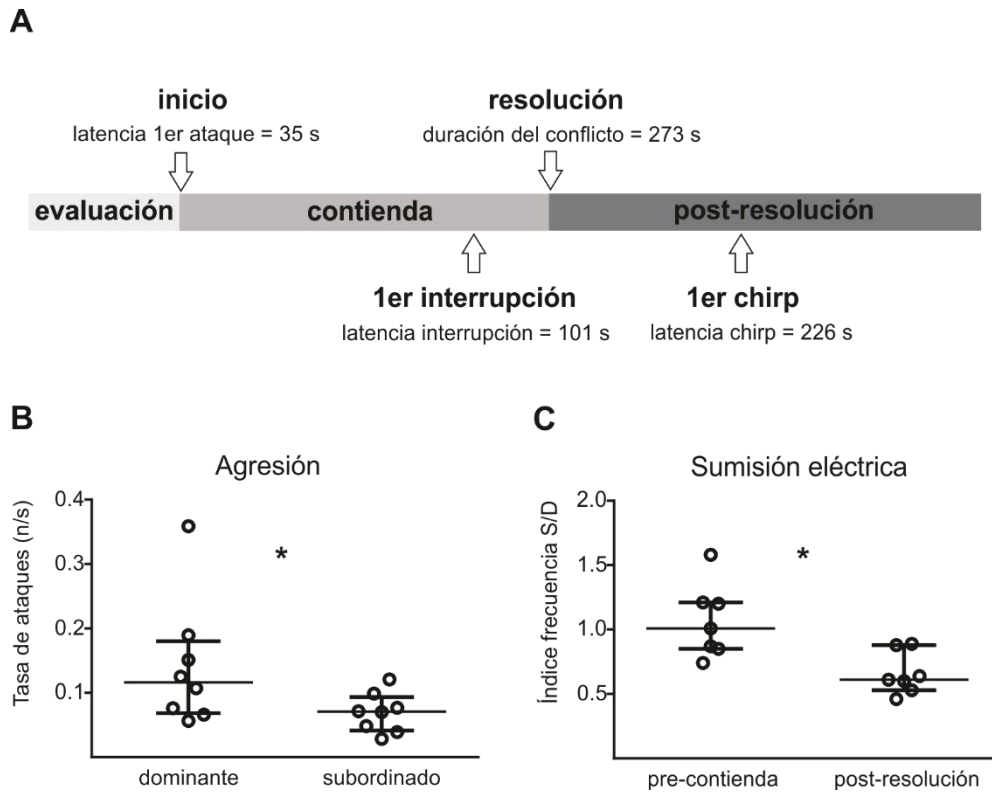


Figura II.2: Caracterización de la conducta agonística territorial no reproductiva en hembras. A. Encuentros diádicos en hembras despliegan las tres fases características de la conducta agonística. Las señales de sumisión comienzan a emitirse durante la fase de contienda, y continúan durante la post-resolución (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
<i>Macho-macho</i>	38 (20)	78 (21)	172 (102)	0.21 (0.16)	0.11 (0.05)	0.02 (0.02)	0.05 (0.043)
<i>Hembra-hembra</i>	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, $p = 0.28$, $n_{FAD} = 20$, $n_{CTRL} = 16$).

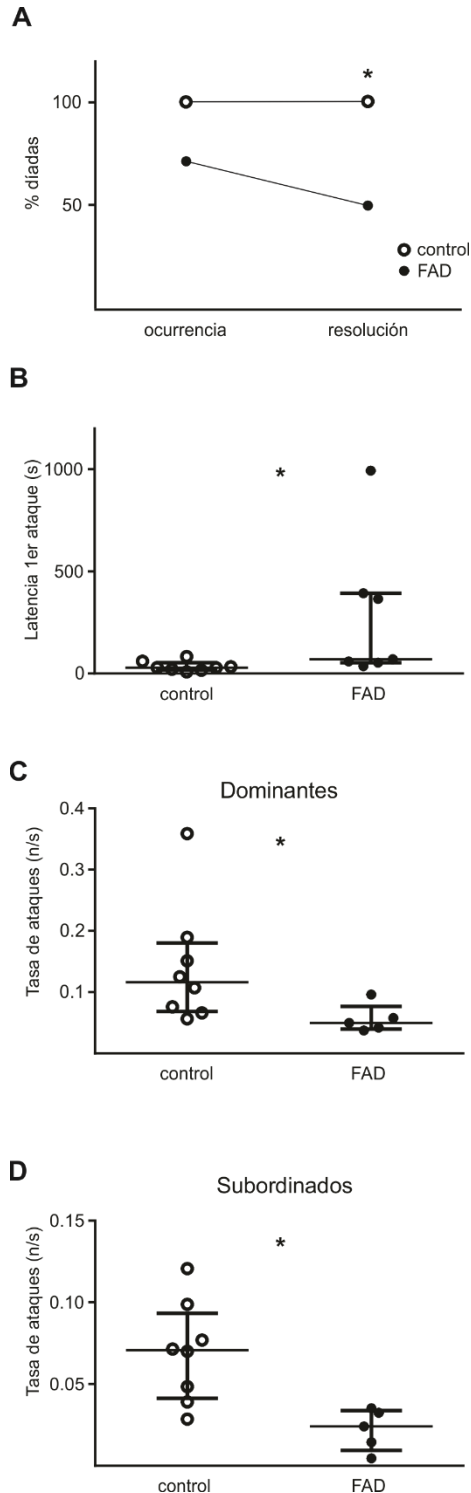


Figura II.3: Efectos de la inhibición aguda de la aromatasa sobre la agresión no reproductiva en hembras. A. En las díadas tratadas con fadrozole (FAD) se observa una menor ocurrencia de conflicto que en las díadas control, y solamente 5 díadas tratadas resuelven el conflicto y establecen el estatus 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.

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 teleosteo. 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 señala 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 androgénica. 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 descritas 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 nos 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 diadas 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 (descrito 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: $[\text{peso gonadal} / \text{peso corporal}] \times 100$. 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 tectum 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.

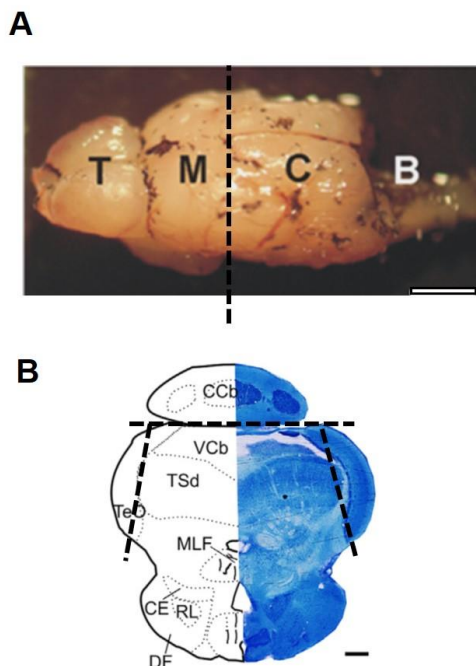


Figura III.1: Disección de cerebro anterior de *Gymnotus omarorum* para posterior cuantificación de esteroides por LC-MS/MS. A- El primer corte se realizó en el plano coronal, como indica la línea punteada. B- La figura representa la vista desde la cara rostral en el lugar del primero corte. Luego de realizar el corte coronal, la pieza se apoyó por la superficie caudal, para resecar el cerebelo, y el tectum 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, 17 β -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 μ l) 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 μ L 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 vortexeo 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 transfirió 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 17 β -Estradiol, y 20 a 10,000 pg para la dehidroepiandrosterona.

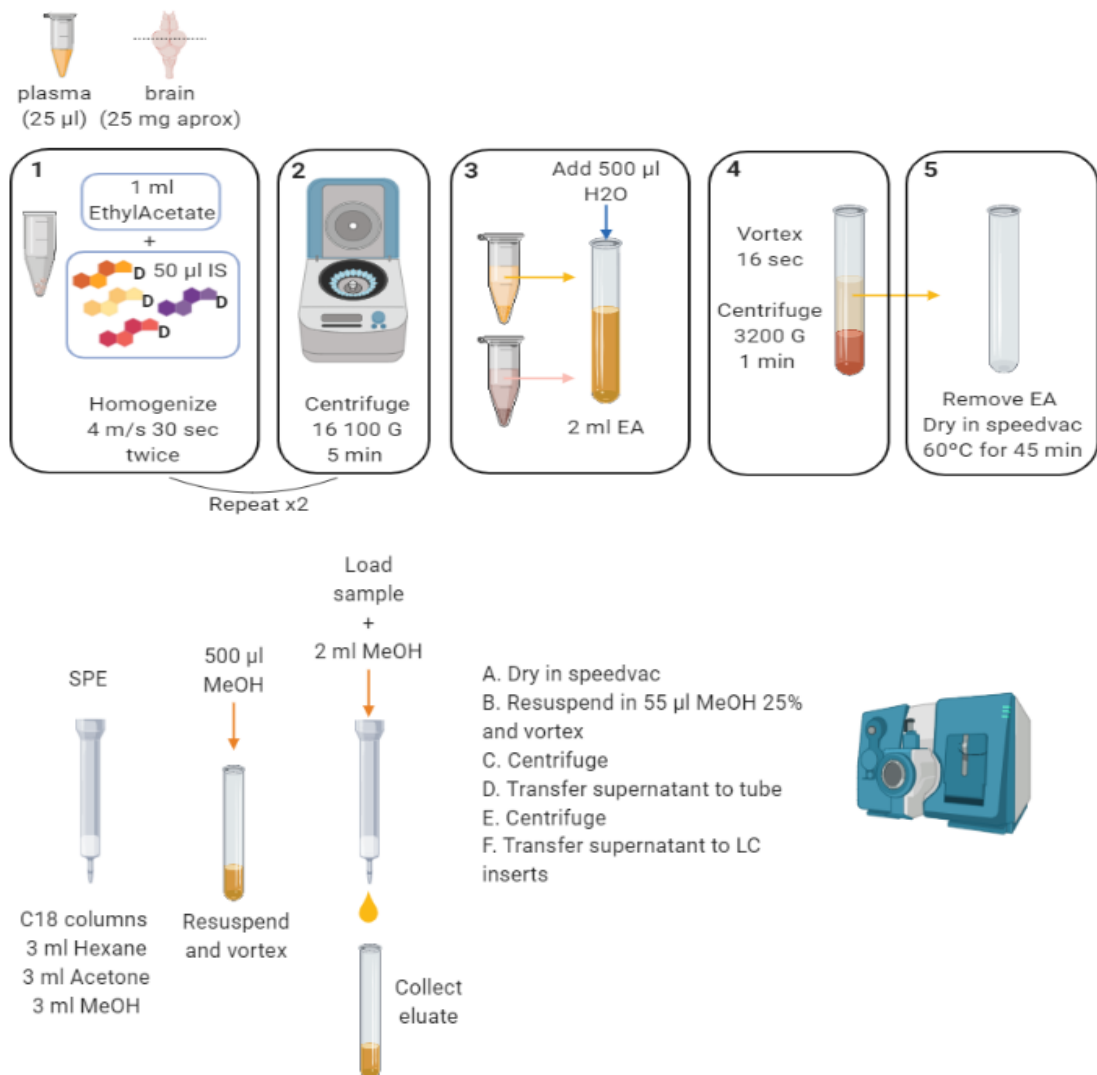


Figura III.2: Preparación de muestras de cerebro y plasma de *Gymnotus omarorum* para posterior cuantificación por LC-MS/MS.

Análisis de esteroides por LC-MS/MS

Los esteroides se cuantificaron utilizando un sistema Sciex QTRAP 6500 UHPLC-MS/MS como fue descrito 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 μ m; 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.

Esteroides	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	-
17 β -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; E₂, 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).

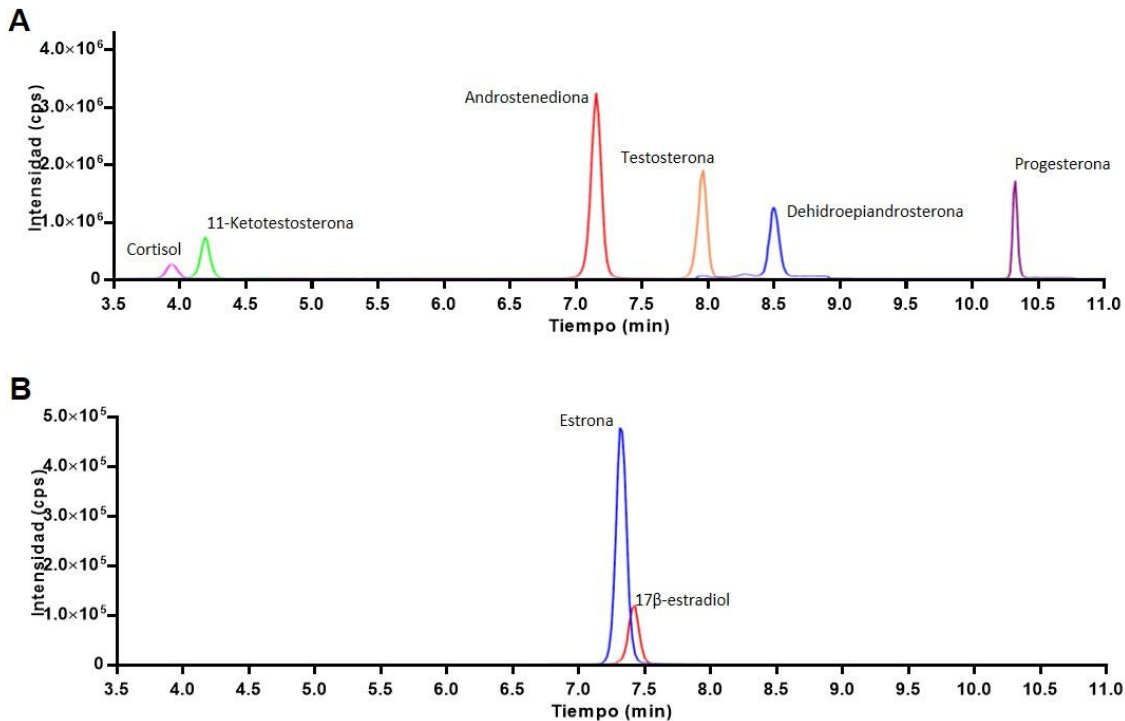


Figura III.3: Cromatograma representativo de los iones cuantificadores de los esteroides analizados. La muestra es una mezcla de esteroides estándar de referencia certificados (100 pg para todos los esteroides excepto el DHEA que es 1000 pg). A- Se muestran los esteroides ionizados en el modo electrospray 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 \pm 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.

Esteroides	% Recuperación			% de Variación	
	Neta	Plasma (25 μ L)	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
17 β -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.

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*.

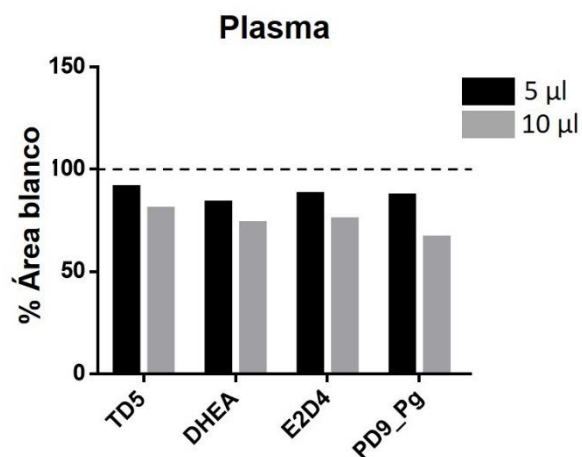


Figura III.4: Extracción líquido-líquido con Acetonitrilo y Hexano en muestras de plasma. El % Área blanco representa el porcentaje de área de la señal de cada estándar interno extraído con muestra biológica con respecto al área del mismo estándar extraído sin muestra biológica. Se utilizaron dos volúmenes 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).

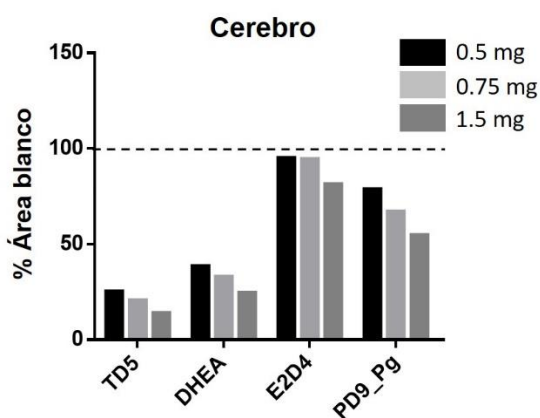


Figura III.5: Extracción líquido-líquido con Acetonitrilo y Hexano en muestras de cerebro. El % Área blanco representa el porcentaje de área de la señal de cada estándar interno extraído con muestra biológica con respecto al área del mismo estándar extraído sin muestra biológica. Se utilizaron 3 cantidades 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.

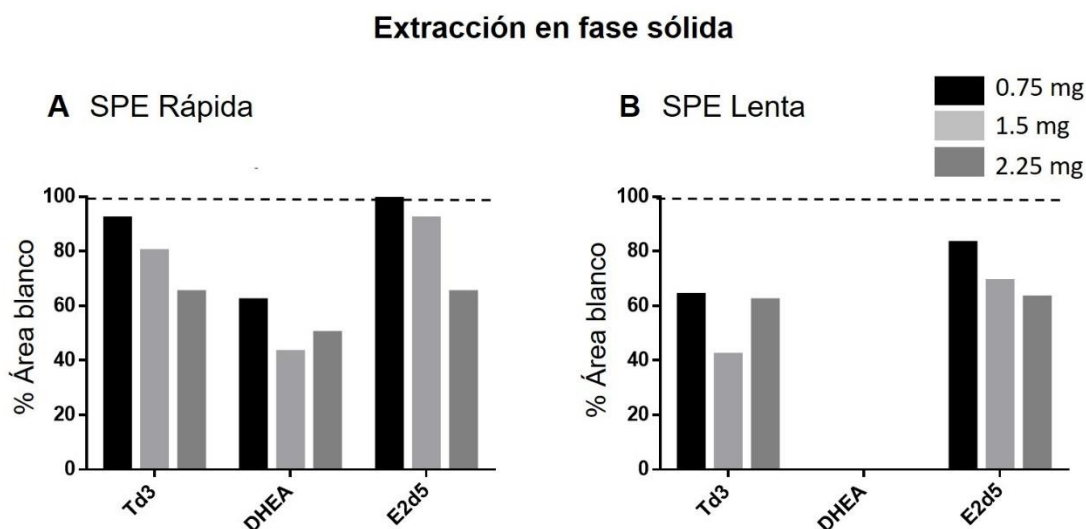


Figura III.6: Extracciones en fase sólida en muestras de cerebro. A- SPE rápida. B- SPE lenta. El % Área blanco representa el porcentaje de área de la señal de cada estándar interno extraído con muestra biológica con respecto al área del mismo estándar extraído sin muestra biológica. Se utilizaron 3 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.

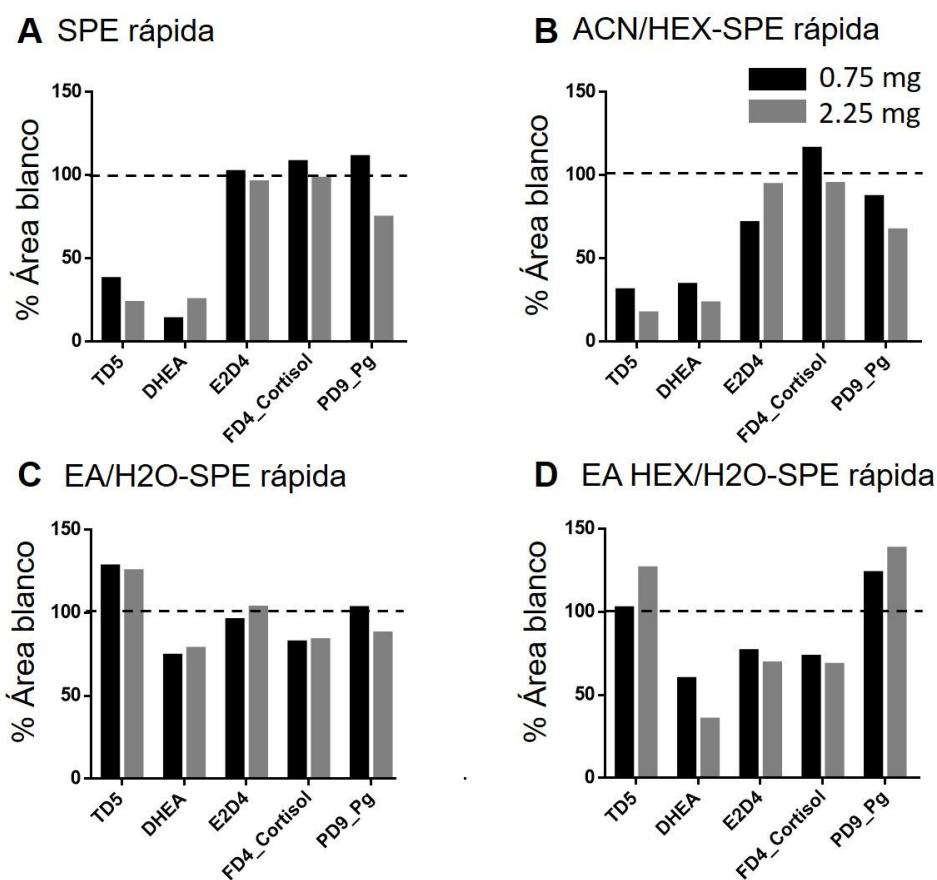


Figura III.7: Extracciones en fase sólida acopladas a protocolos de extracción líquido-líquido en muestras de cerebro. A- SPE rápida. B- Extracción líquido-líquido con Acetonitrilo y Hexano, luego del secado del ACN se resuspende en MeOH y se realiza una SPE rápida. C- Extracción líquido-líquido con 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.

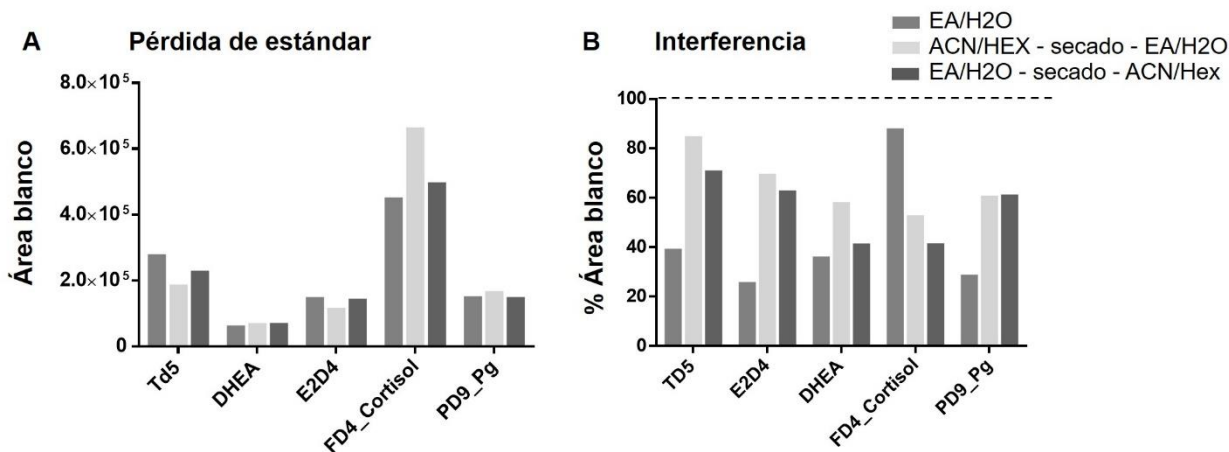


Figura III.8: Protocolos de extracción líquido-líquido en muestras de 20 mg. de cerebro. Se ilustran 3 protocolos de extracción líquida: Primero, con EA/H₂O, segundo, una extracción líquida con ACN/HEX seguida de un secado y resuspensión en EA al que se extrajeron nuevamente con H₂O, y por último, una extracción líquida con EA/H₂O seguida de un secado y resuspensión en ACN al que se extrajeron 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).

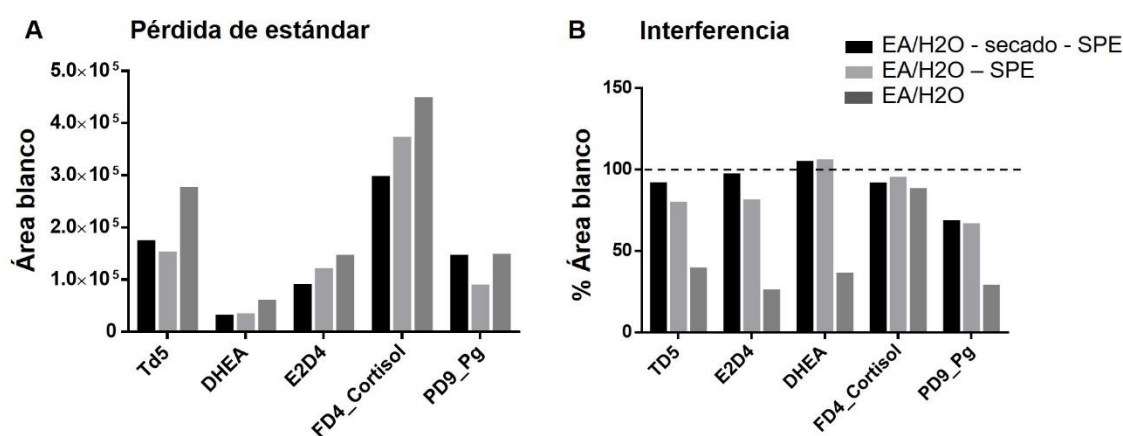


Figura III.9: Protocolos de extracción líquido-líquido con Etilacetato y acopladas a extracciones en fase sólida en muestras de 20 mg. de cerebro. Se ilustran 3 protocolos de extracción: Primero, con EA/H₂O, segundo, una extracción líquida con EA/H₂O seguida de un secado y resuspensión en MeOH que se 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.

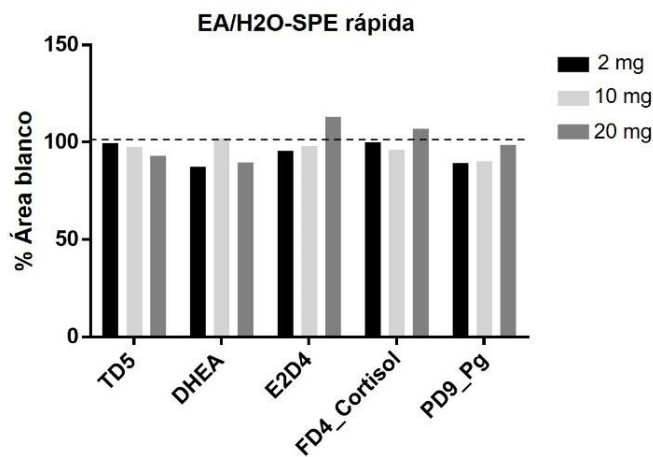


Figura III.10: Extracción líquido-líquido con Etilacetato y H₂O acoplada a extracción en fase sólida rápida con cantidades crecientes de tejido cerebral. El % Área blanco representa el porcentaje de área de la señal de cada estándar interno extraído con muestra biológica con respecto al área del mismo 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.

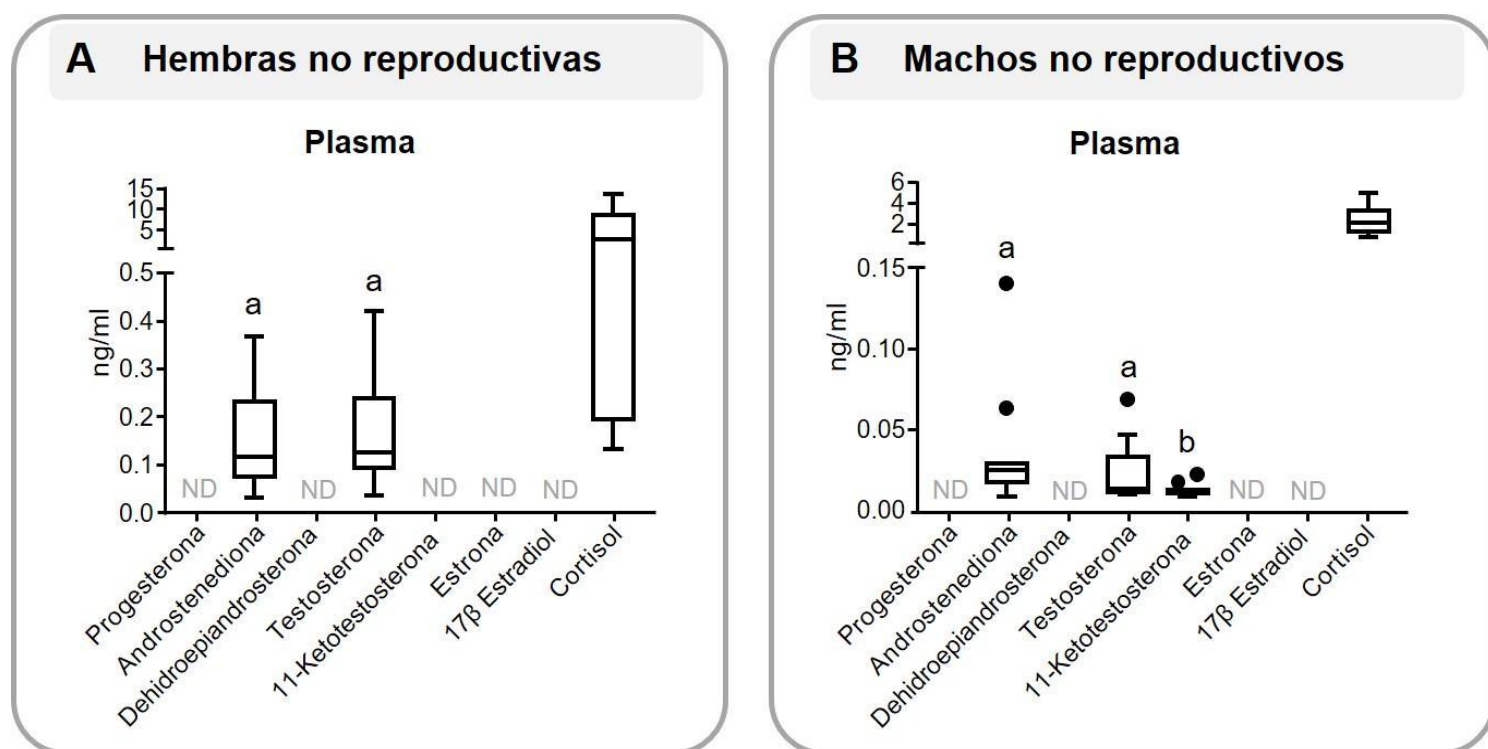


Figura III.11: Perfiles hormonales plasmáticos. A- Hembras no reproductivas. B- Machos no reproductivos.

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)		p
	Hembras	Machos	
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

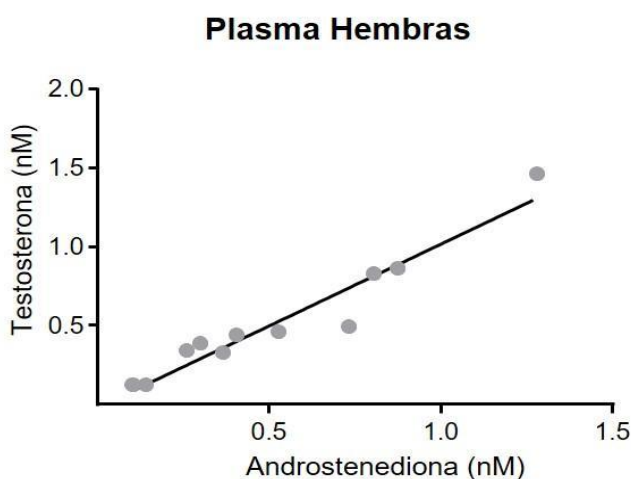


Figura III.12: Correlación lineal entre esteroides plasmáticos en hembras.

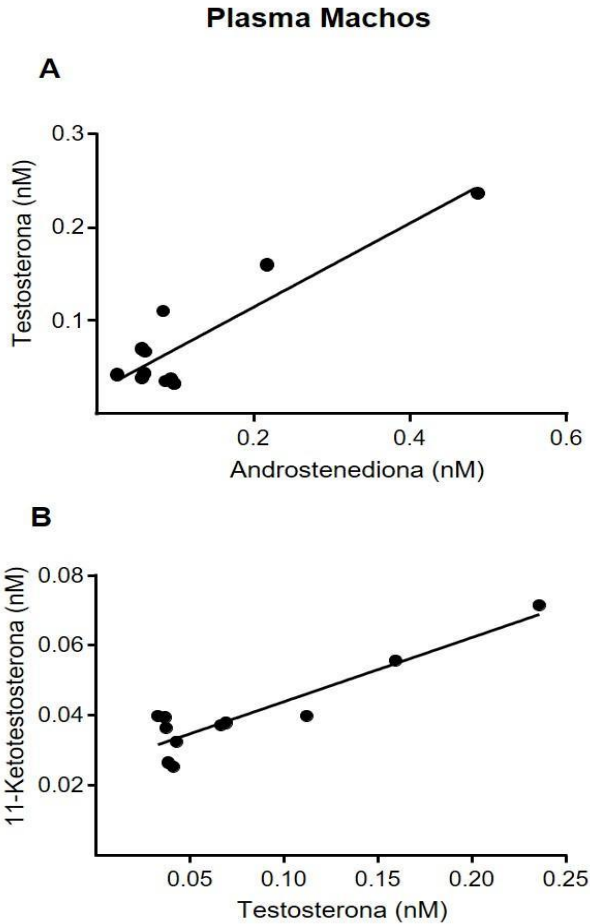


Figura III.13: Correlaciones lineales entre esteroides plasmáticos en machos.

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, $17\text{-}\beta$ 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).

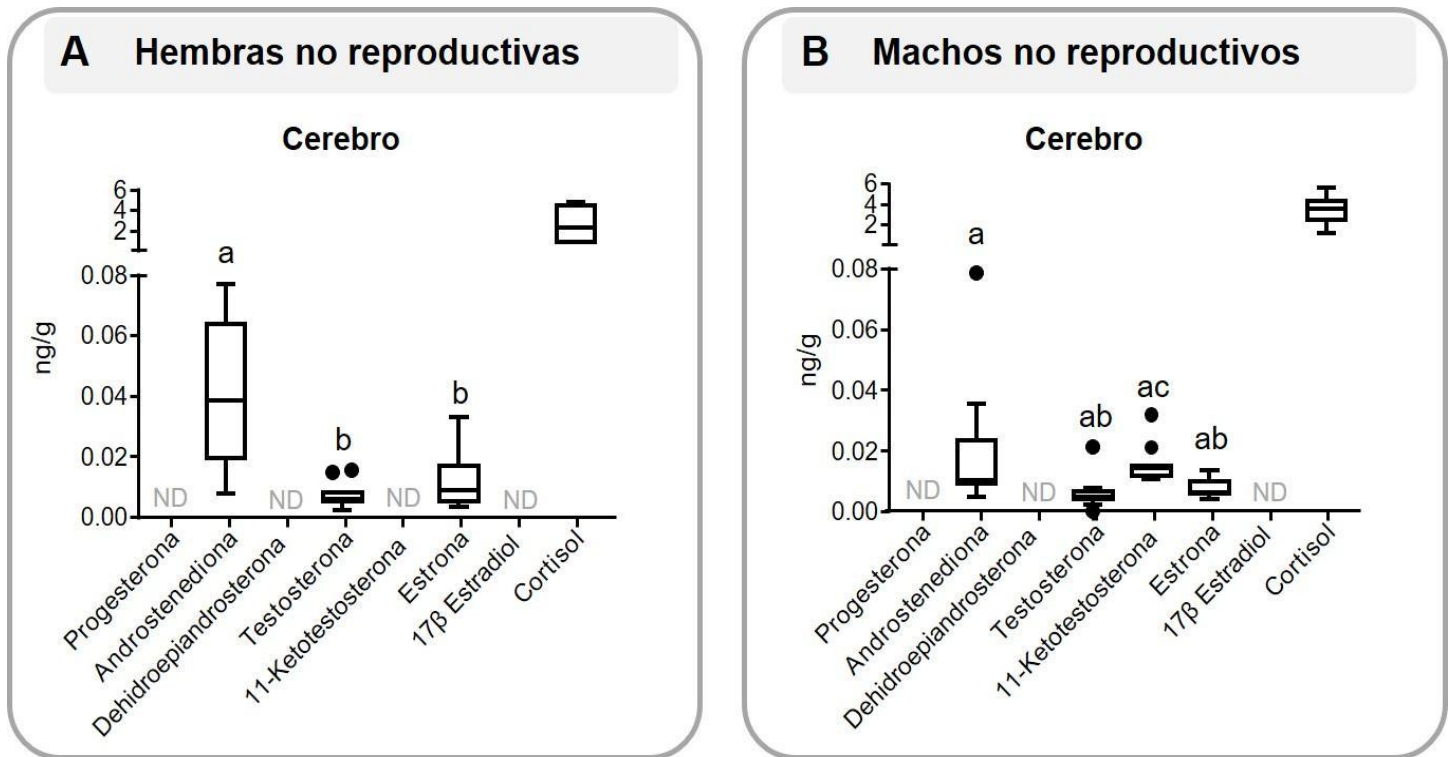


Figura III.14: Perfiles hormonales cerebrales. A- Hembras no reproductivas. B- Machos no reproductivos.

Tabla III.4: Comparación de concentraciones cerebrales entre sexos

Hormona	Concentración cerebral (ng/g)		p
	Hembras	Machos	
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).

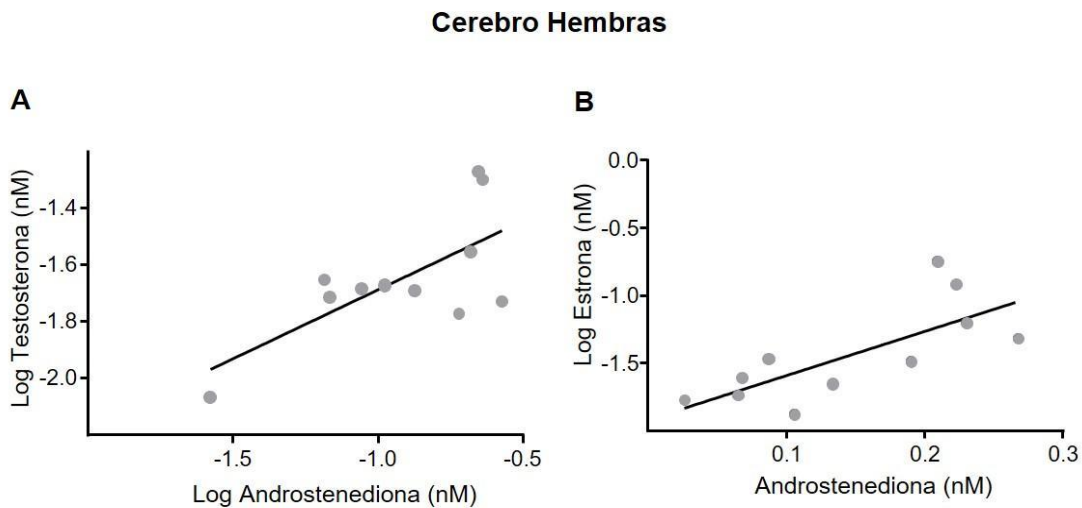


Figura III.15: Correlaciones lineales entre esteroides cerebrales en hembras.

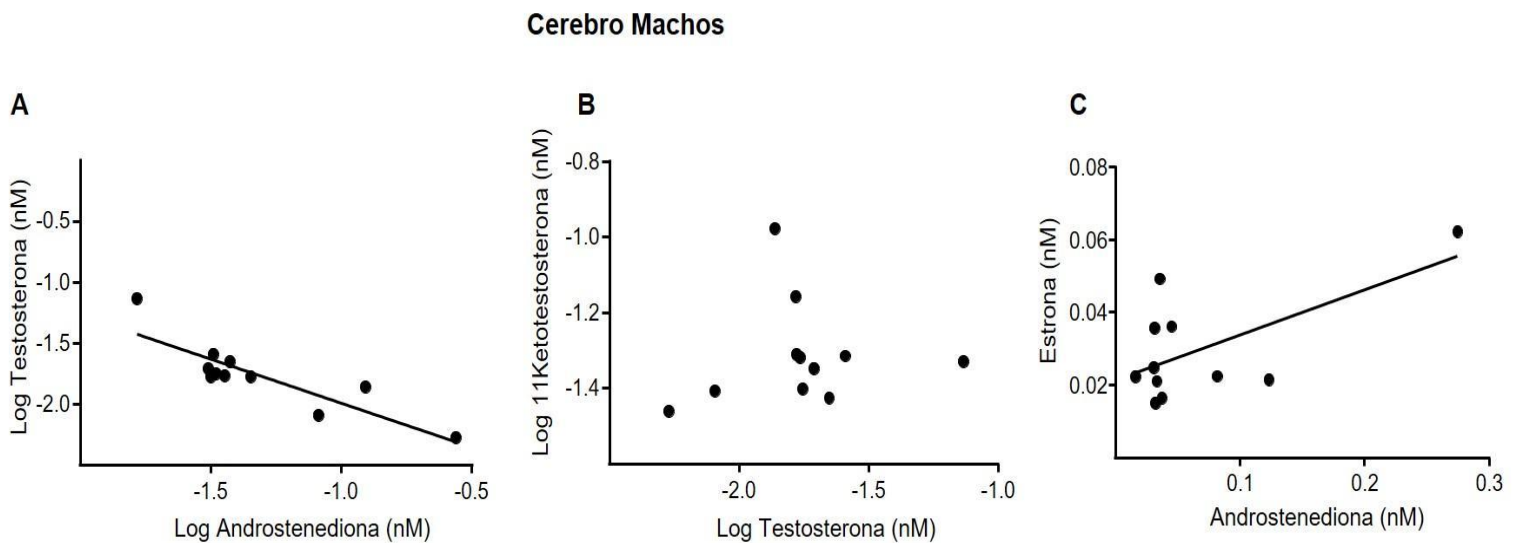


Figura III.16: Correlaciones lineales entre esteroides cerebrales en machos.

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 ($[AE_{cerebro}] - [AE_{plasma}]$ hembras = -0.11 ± 0.03 ; $[AE_{cerebro}] - [AE_{plasma}]$ 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 $[T_{cerebro}] - [T_{plasma}]$ hembras = -0.12 ; mediana $[T_{cerebro}] - [T_{plasma}]$ machos = -0.01 ; Mann-Whitney U test, $p < 0.0001$, $U = 4.00$; Fig. III.18C).

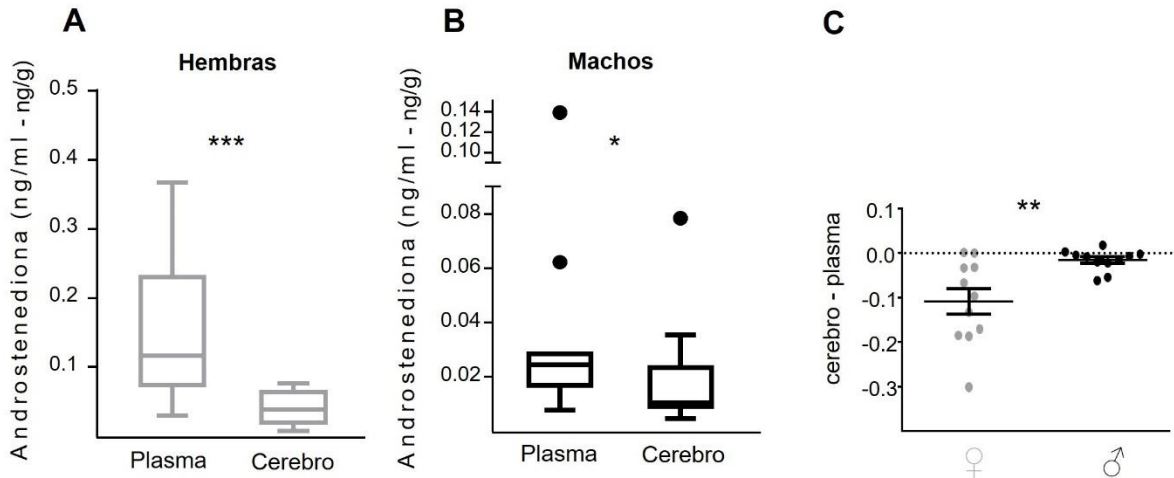


Figura III.17: Comparación de concentraciones plasmáticas y cerebrales de Androstenediona. A- Comparación de niveles plasmáticos y cerebrales en hembras. B- Comparación de niveles plasmáticos y cerebrales en machos. C- Diferencia individual de la concentración cerebral – plasmática. * $p < 0.05$, **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

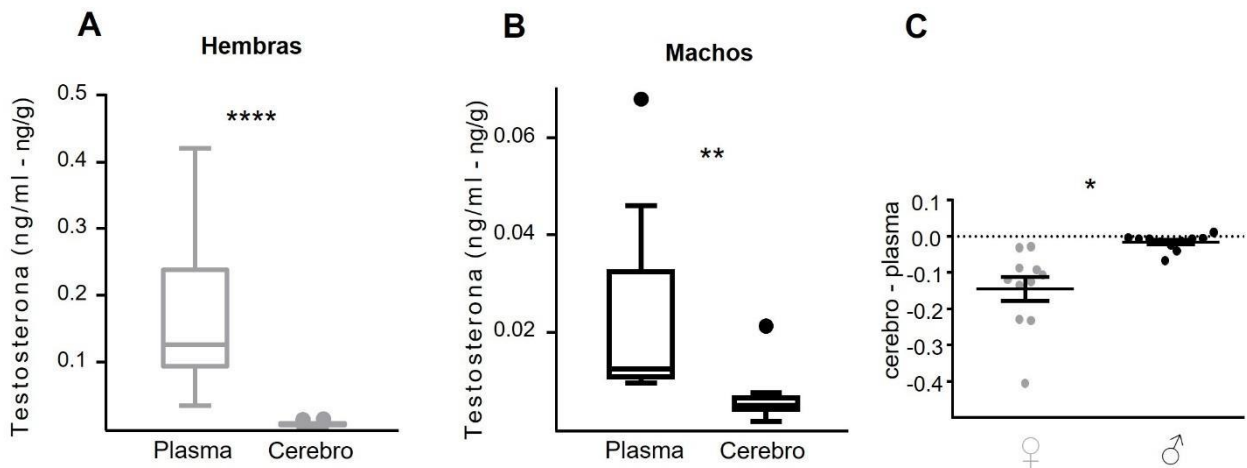


Figura III.18: Comparación de concentraciones plasmáticas y cerebrales de Testosterona. A- Comparación de niveles plasmáticos y cerebrales en hembras. B- Comparación de niveles plasmáticos y cerebrales en machos. C- Diferencia individual de la concentración cerebral – plasmática. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, 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 $11\% \pm 14\%$ (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 ($R^2 = 0.75$, $p < 0.001$; Fig. III.21A), mientras que en machos esta relación no mostró significancia estadística ($R^2 = 0.08$, $p = 0.4$; Fig. III.21B).

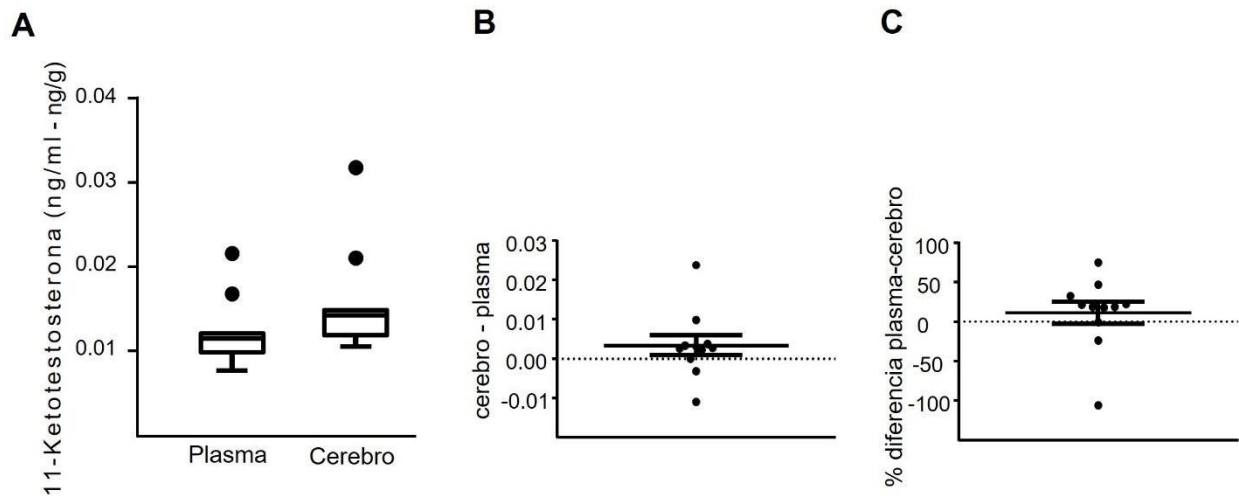


Figura III.19: Comparación de concentraciones plasmáticas y cerebrales de 11-Cetotestosterona. A- Comparación de niveles plasmáticos y cerebrales en machos. B- Diferencia individual de la concentración cerebral – plasmática. C- Porcentaje de contribución cerebral.

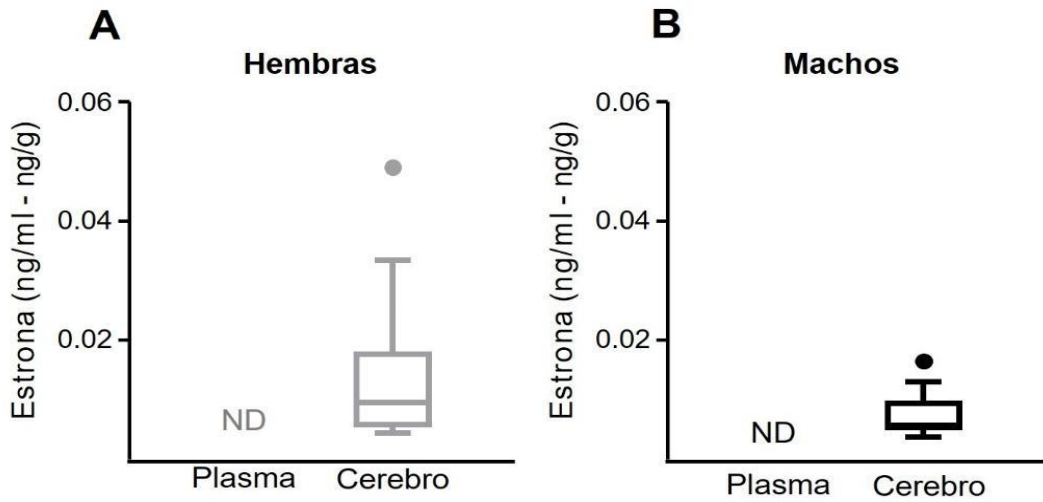


Figura III.20: Comparación de concentraciones plasmáticas y cerebrales de Estrona. A- Hembras. B- Machos.

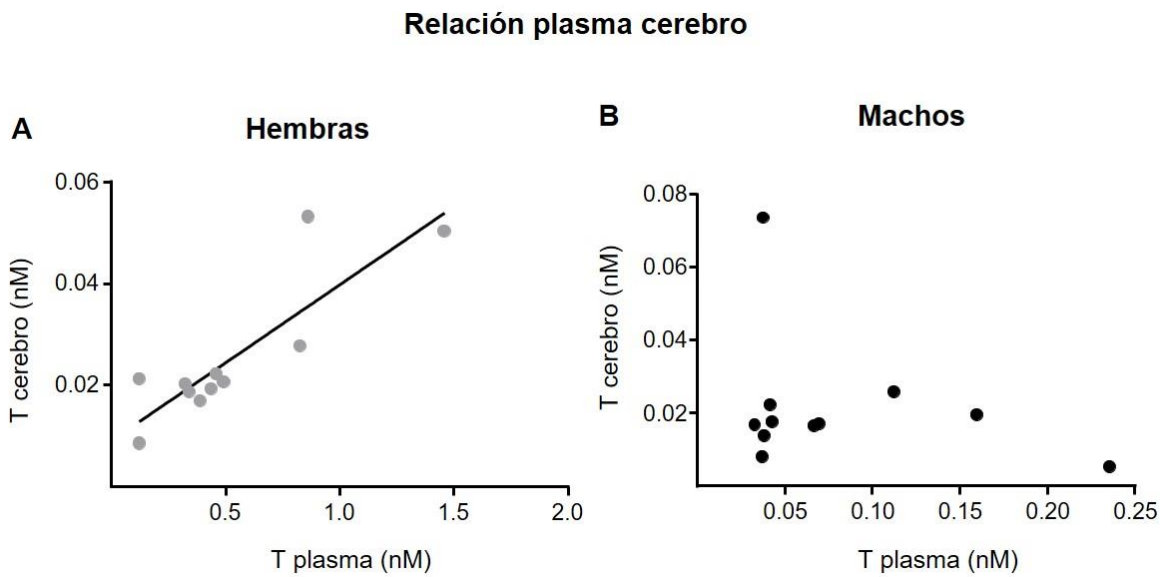


Figura III.21: Relación entre los niveles de testosterona cerebral y plasmática. A. Hembras. B. Machos.

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 μ L 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 descritos 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 esteroideogénicas 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. Melodía*) 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 esteroideogénicos. 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 17 α -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 transcritos 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 11 β -hydroxylasa (P45011 β) y 11 β -hidroxiesteroide dehydrogenasa (11 β -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. III.15B; 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.

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; Ramage-Healey y Bass 2006). Los neuroestrógenos se sintetizan rápidamente y fluctúan frente a determinados estímulos sociales. Por ejemplo, tanto hembras como machos de pinzón cebrá muestran un aumento local de estrógenos neurosintetizados en un núcleo análogo a la corteza auditiva secundaria en respuesta al canto de un coespecimen (Ramage-Healey et al. 2011; Ramage-

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 listos 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*.

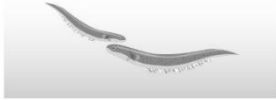
MODELO INTERPRETATIVO: TERRITORIALIDAD DE *GYMNOTUS OMARORUM* DURANTE EL PERÍODO NO REPRODUCTIVO

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.

LA CONDUCTA AGONISTICA MEDIA LA TERRITORIALIDAD NO REPRODUCTIVA

En el laboratorio (corto plazo)

OCURRENCIA DE CONFLICTO



ESTABLECIMIENTO DE DOMINANCIA



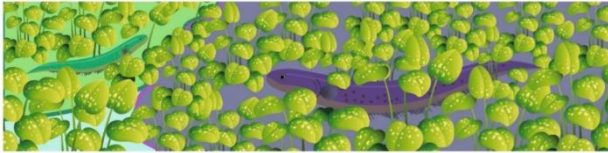
Independiente de - sexo
- hormonas gonadales
- acción androgénica rápida

Dependiente de - tamaño corporal
- acción estrogénica rápida

H: HAY PICOS DE
NEUROESTRÓGENOS
ASOCIADOS A LAS
CONTIENDAS

En el hábitat natural (largo plazo)

TAMAÑO DE TERRITORIO



Independiente de - sexo

Dependiente de - tamaño corporal

H: LOS NIVELES BASALES
DE NEUROESTRÓGENOS
CORRELACIONAN CON
EL TAMAÑO DEL
TERRITORIO

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 transcritos 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 circanales. 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.

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_Modulación 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](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](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 in *Gymnotus 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/jfo.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.ygcn.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](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=aQICAQAAQBAJ>
- 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 17 β -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](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](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](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.). Chapman 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](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](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](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 damselfish *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 5 α -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](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., Brintjes, R., Vallat, A., y Bshary, R. (2014). Intra- and interspecific

challenges modulate cortisol but not androgen levels in a year-round territorial

- damsel fish. *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](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 17 β -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 Thermoregulation*, 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](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](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](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.