



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

“Estudio de la agresión y respuesta a sustancias de alarma en hembras de pez cebra, *Danio rerio*.”

Autor: Chiara Salustri
Directora: María Florencia Scaia
Director Asistente: Luciano Cavallino

Lugar de trabajo: Laboratorio de neuroendocrinología y comportamiento en peces y anfibios, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, FCEyN-UBA.

Directora de laboratorio: Dra. Andrea Pozzi.

Tesis de Licenciatura
Abril 2023



Agradecimientos.

Me gustaría poder, con apenas unas palabras, estar a la altura de la inmensa ayuda brindada por una innumerable cantidad de personas. Me gustaría poder agradecer más y mejor, pero en la página escrita, la textura de estas palabras con que les agradezco es lo máximo que pudo ofrecer como recompensa.

En primer lugar, agradecer a Flor y a Lucho, quienes, con infinita paciencia y bondad, me enseñaron todo lo reflejado en esta tesis, siempre respondiendo, con el mayor de los entusiasmos, a mis repetidas preguntas. Ayudándome con cada inconveniente, presentes en cada paso del camino, desde lo académico hasta lo humano. Gracias a Andre y todos los integrantes del laboratorio de Neuroendocrino, por abrirme las puertas y brindarme un espacio donde alimentar mis curiosidades. Gracias a Gladys Hermida y su labo, por generosamente prestarnos reactivos para la técnica de coloración del Reactivo de Shiff.

A todos los profesores que alentaron y sustentaron mi deslumbramiento por esta profesión. A los jurados de esta tesis, por leer una buena cantidad de hojas que versan sobre peces, agresión, histología, temáticas interesantísimas, pero que quizá para otros no lo son tanto.

Gracias a mis primeros amigos y amigas, las del colegio y Fer, Pau, Rena por estar presentes en cada una de mis versiones. Después llegaron las y los chicos de la facu, haciendo de esta carrera un espacio de aprendizaje constante, en muchos más aspectos que los estrictamente académicos. Gracias por ser empuje constante en las flaquezas y alegría desmesurada en los logros.

Gracias a mi familia, por darme todas las oportunidades que me trajeron hasta aquí, por facilitar y quitar piedras de mi camino, en cada ocasión que estuvo a su alcance. Gracias por conmoverse tanto, o aún más que yo misma, por los resultados de este largo trayecto. A mis hermanos, por ser cómplices y maestros.

Por último, y obviamente no por eso menos importante, gracias a la UBA, a la educación pública, libre y gratuita, y a la excelentísima FCEN, por ser ese lugar donde transcurrí años de inmenso crecimiento personal y formativo, disfrutando y amando cada paso del camino...

(...Y a La Scaloneta, por una incalculable alegría en momentos de escritura).

INDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN..... | 5 |
| ABSTRACT | 6 |
| 1.INTRODUCCIÓN | 7 |
| 1.1 Comportamiento social y agresión. | 7 |
| 1.2 Agresión en peces teleósteos. | 8 |
| 1.2.1 Modelos para el estudio del comportamiento social | 8 |
| 1.2.2 Agresión en peces y ciclo reproductivo | 10 |
| 1.3 Modelo: <i>Danio rerio</i> | 12 |
| 1.3.1 Hábitat y biología | 12 |
| 1.3.2 Comportamiento reproductivo..... | 13 |
| 1.3.3 Agresión en <i>Danio rerio</i> | 14 |
| 1.4 <i>Club cells</i> y sustancia de alarma..... | 16 |
| 1.4.1 Histología de <i>club cells</i> e identidad de la sustancia de alarma. | 16 |
| 1.4.2 Efecto de la sustancia de alarma en el comportamiento..... | 17 |
| 2.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN..... | 19 |
| 3.MATERIALES Y MÉTODOS | 20 |
| 3.1 Animales | 20 |
| 3.2 Manejo ético de los individuos | 20 |
| 3.3 Dispositivo experimental para la evaluación de la agresión territorial..... | 21 |
| 3.3.1 Encuentros agonísticos sucesivos..... | 21 |
| 3.3.2 Protocolo con sustancia de alarma | 23 |
| 3.3.3 Controles | 25 |
| 3.4 Análisis de videos y cuantificación de las variables comportamentales | 25 |
| 3.5 Procesamiento histológico | 26 |
| 3.5.1 Histología de gónada y cortes transversales de cuerpo | 26 |
| 3.5.2 Histología de cerebro..... | 27 |
| 3.5.3 Coloración: Hematoxilina de Carazzi y Eosina alcohólica | 27 |
| 3.5.4 Coloración: Método del ácido periódico-Reactivo de Shiff (PAS) | 28 |
| 3.6 Análisis estadístico..... | 28 |

| | |
|--|----|
| Soluciones y Buffers | 31 |
| 4. RESULTADOS | 32 |
| 4.1 Medidas morfométricas..... | 32 |
| 4.2 Agresión en función del estado reproductivo | 34 |
| 4.3 Descripción de ovario en distintos estados reproductivos..... | 36 |
| 4.4 Agresión en encuentros agonísticos sucesivos..... | 39 |
| 4.5 Agresión en función de la sustancia química de alarma | 41 |
| 4.6 Agresión en encuentros agonísticos sucesivos en presencia de sustancia de alarma..... | 44 |
| 4.7 Histología de epidermis | 46 |
| 4.8 <i>Freezing</i> en los encuentros agonísticos | 49 |
| 4.8.1 <i>Freezing</i> en función del estado reproductivo | 49 |
| 4.8.2 <i>Freezing</i> en encuentros agonísticos sucesivos | 50 |
| 4.8.3 <i>Freezing</i> en función de la sustancia de alarma | 51 |
| 4.9 Histología de cerebro | 54 |
| 5.DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES | 56 |
| 6.BIBLIOGRAFÍA | 68 |
| 7.ANEXO | 81 |

RESUMEN

Los comportamientos sociales, entre ellos la agresión, se observan en una gran variedad de grupos de animales. Por ejemplo, diversas especies de peces teleósteos constituyen grandes modelos para el estudio de las bases fisiológicas y neuroendocrinas que regulan la agresión. En particular en el pez cebra, *Danio rerio*, a través de despliegues agresivos surgen un individuo dominante y otros subordinados. Al observarse en esta especie altos niveles de agresión en ambos sexos, resulta sorprendente que exista poca evidencia que profundice en la agresión en hembras. La epidermis presenta *club cells* que, al ser dañadas, liberan una sustancia de alarma (SA) que provoca en los conespecíficos cambios comportamentales, como una “respuesta de miedo” y aumento en el *freezing*, y fisiológicos, como un aumento de los niveles de cortisol. Si bien la SA está asociada a una respuesta de estrés, resta aun estudiar su efecto sobre el comportamiento agonístico. En este trabajo se utilizó como modelo experimental a hembras adultas del pez cebra, con el objetivo de evaluar si el comportamiento de agresividad puede ser modulado por el estado reproductivo y/o por las señales químicas de alarma. Para ello, se realizaron encuentros agonísticos entre dos hembras de pez cebra en el mismo estado reproductivo (Pre o Postpuesta de huevos), y en presencia o no, de SA obtenida mediante el raspado de piel de hembras. En todos los casos, se analizó la modulación del comportamiento agresivo a través de la medición de la latencia y el tiempo total de agresión en cada uno de los encuentros diádicos en días sucesivos, así como también el comportamiento de *freezing*. Se realizaron también técnicas histológicas con el fin de observar los distintos estadios de la oogénesis y observar también *club cells* en la epidermis de *D. rerio*. Los resultados sugieren que ni la agresividad ni el *freezing* varían entre los distintos estados reproductivos. Además, si bien los resultados en ausencia de SA sugieren que la agresividad no se modifica en días sucesivos, en presencia de SA disminuye el tiempo total de agresión al segundo día de encuentros agresivos. Sin embargo, tanto en ausencia como en presencia de SA, no se observan diferencias estadísticas significativas en el *freezing* en los encuentros en días sucesivos. Por último, se observa un aumento de la latencia en los encuentros en presencia de SA. Los resultados de esta tesis sugieren que, si bien la agresión entre hembras no está modulada por el estado reproductivo, podría estar modulada por la SA. La SA modifica la dinámica temporal de las contiendas al disminuir la motivación por iniciar un encuentro agresivo, lo cual podría deberse al sensado de un posible peligro en el ambiente. La disminución del tiempo total de agresión al segundo día en presencia de SA podría deberse a un efecto acumulativo de la SA y una menor inversión de energía en despliegues agresivos.

Aggression and alarm substance response in females of zebrafish, *Danio rerio*

ABSTRACT

Social behaviors, for example aggression, are common in a wide variety of animal groups. Teleost fishes represent great models for the study of neuroendocrine as well as physiological basis that modulate aggression. In zebrafish, (*Danio rerio*), a dominant individual will emerge through aggressive displays, while the others remain as subordinates. Surprisingly, although this species shows high levels of aggression, females remain understudied. Zebrafish's epidermis shows club cells, which when damaged release an alarm substance (SA) which generates behavioral changes on individuals of the same species, such as a fear response and increase of the freezing behavior, and physiological changes, as an increase in cortisol levels. The SA has been associated with a stress response, but still further research needs to be done on the effect over agonistic behavior. In this study we used zebrafish adult females as the experimental model, with the objective of evaluating if aggressive behavior can be modulated by the reproductive status of the females, and/or by the alarm substance. Agonistic encounters were performed between two females of the same reproductive status (pre- or post-spawning), and in presence or absence of SA, which was obtained from scraping the skin of a female. Measures of latency and total time of aggression, along with the freezing time, were determined to analyze behavioral modulation on dyadic encounters on successive days. Furthermore, histological techniques were performed in order to confirm the reproductive status of the females, and skin was sampled to observe club cells in the epidermis of *D. rerio*. The results suggest that neither the aggression, nor the freezing vary among the different reproductive status. Moreover, even though the results in absence of SA suggest that the aggression is not modified in successive days of agonistic encounters, when SA is present the total time of aggression decreases on the second day of encounters. However, in presence of SA, as when SA is absent, there are no significant differences on the freezing. Finally, there is a significant increase in the latency on the encounters with SA. The results of this work suggest that, even though aggression between females is not modulated by their reproductive status, it can vary in presence of SA. The temporal dynamic of the encounters is modified by the alarm substance, due to a reduction in the motivation to start an aggressive encounter, which probably relates to the sensing of latent danger in the environment. The SA may have an accumulative effect which translates in a decrease in the total time of aggression on the second day of encounters, leading to a reduced investment of energy on aggressive displays.

1 INTRODUCCION

1.1 Comportamiento social y agresión

El comportamiento social puede entenderse como el despliegue de determinados comportamientos de interacción entre individuos de una misma especie. Ciertos comportamientos sociales se encuentran muy conservados en distintos grupos de vertebrados. Por ejemplo, en especies jerárquicas, los individuos suelen emprender encuentros agonísticos durante los cuales intentan mostrar su dominancia mediante despliegues de agresión. En estas contiendas se determina el estatus social de los individuos, emergiendo así un dominante y al menos un subordinado. La dominancia, para una especie social, se traduce directamente en una mayor posibilidad de acceder a recursos como territorio, alimento y pareja (Pandolfi et al. 2021), lo cual refuerza la mayor posibilidad de seguir ocupando un lugar de dominancia. Por otro lado, la exposición a un conflicto social supone un aprendizaje, donde los individuos ganadores incrementan sus posibilidades de ganar el próximo encuentro, otra vez, reforzando su estatus dominante (Dugatkin, 1997; Hsu et al. 1999; Oliveira et al. 2009; Oliveira et al. 2011). Por lo tanto, la agresión animal es plástica y los niveles de agresión expresados dependerán de muchos factores que interactúan entre sí, como por ejemplo de diversas vías fisiológicas y hormonales, experiencias previas y los estímulos externos que estén sensando los animales.

En una jerarquía social se suelen encontrar individuos dominantes y también subordinados. En el contexto de una pelea entre dos individuos, cuando el conflicto se resuelve, emerge un ganador y un perdedor, donde los comportamientos más característicos de los perdedores son descritos como escapes y elevados niveles de *freezing*. Al contrario de lo que sucede con los ganadores de las contiendas, los subordinados refuerzan su rol sumiso al perder una contienda, aumentando sus chances de continuar siendo subordinados en una posible contienda futura a la vez que pierden las probabilidades de acceso a los recursos. Este fenómeno, conocido como efecto ganador/perdedor, fue observado en el pez cebra por Oliveira et al. (2011).

Sin embargo, existen distintos tipos de comportamientos sociales, y particularmente, distintos tipos de comportamientos agresivos. Algunas especies establecen jerarquías sociales solamente durante épocas reproductivas, ya que de esta manera los individuos que mejor resuelven un conflicto social y tienen más acceso a recursos, son los que tienen mayor acceso a reproducirse (Dewsbury, 1982). Los conflictos sociales pueden ser de al menos tres tipos diferentes: entre individuos subordinados y dominantes (Clement et al. 2005), entre subordinados (Alonso et al. 2012), y entre vecinos territoriales (Muller y Manser, 2007).

Dependiendo del grupo de vertebrados, en algunas especies los comportamientos agresivos suelen ser más frecuentes y comunes entre machos que en hembras y estas diferencias entre sexos se suelen atribuir a la acción de hormonas esteroideas (Gatewood et al. 2006). Sin embargo, en la gran mayoría de los casos existe un sesgo en el modo en que se encaran los estudios sobre la agresión ya que la agresión en machos es más estudiada que en hembras. Esto resulta muy particular si se tiene en cuenta que en todas estas especies ambos sexos exhiben comportamientos agonísticos (Been et al. 2019). Históricamente la agresión entre hembras fue atribuida casi exclusivamente a la protección de las crías y/o los huevos, pero la evidencia muestra que existen múltiples razones por las cuales dos hembras pueden verse involucradas en una contienda agonística, como, por ejemplo, por recursos, pareja o territorio (Woodley y Moore, 1999; Hau et al. 2004; Scaia et al. 2018a, 2023). Lo que suele llamar la atención en términos evolutivos, además de la agresión intrasexual entre hembras, es la existencia de agresión intersexual, que fue observada en distintos grupos de vertebrados, pero particularmente en muchas especies de peces (Pandolfi et al. 2021).

1.2 Agresión en peces teleósteos

1.2.1 Modelos para el estudio del comportamiento social

Los peces teleósteos son el grupo de vertebrados más diverso con 31.000 especies descritas, lo que a su vez genera que en este grupo de peces se presente un amplio repertorio de comportamientos sociales, convirtiéndolos en excelentes modelos para el estudio de la agresión, de jerarquías sociales y de los mecanismos fisiológicos subyacentes a este tipo de comportamientos (Arnott y Elwood, 2009).

Dentro de los peces teleósteos, un modelo recurrente en lo que respecta a comportamiento, son los cíclidos africanos, incluyendo un abordaje de su ecología y comportamiento en su hábitat natural (Fernald y Hirata, 1977a, b). También se realizaron numerosos estudios en cíclidos bajo condiciones experimentales, con el objetivo de caracterizar los mecanismos moleculares y fisiológicos subyacentes a la dominancia social, y discernirlos de otros factores que podrían estar modulando la agresión en peces como por ejemplo el sexo y el estado reproductivo (Maruska, 2014, Renn, et al. 2012)

Otros ejemplos de modelos dentro de los peces cíclidos son los cíclidos neotropicales, en particular la especie Sudamericana *Cichlasoma dimerus*, localmente conocida como *chanchita*. *Cichlasoma dimerus* es una especie monógama secuencial, que presenta un repertorio de

comportamientos agresivos fácilmente distinguibles. Estos comportamientos consisten en una serie de despliegues agresivos y sumisos que culminan en el establecimiento de un individuo dominante, o pareja dominante en el caso de acuarios sociales, mientras que los demás individuos ocupan lugares de subordinados dentro de la jerarquía social (Ramallo et al. 2014). Estos comportamientos se observaron también en encuentros agonísticos diádicos, donde luego del conflicto emerge un ganador y un perdedor, tanto en machos como en hembras (Morandini et al. 2019; Scaia et al. 2018a).

Sin embargo, especies como *Carassius auratus*, más conocida como goldfish, son también ampliamente utilizadas en el estudio de comportamiento en laboratorio. *Carassius auratus* es un pez de agua dulce que pertenece a la familia Cyprinidae, del orden de los Cypriniformes, al igual que el pez cebra, siendo ambos nativos del este de Asia. Una de las principales ventajas que tienen estas especies para el estudio del comportamiento, frente a algunos cíclidos adultos, es que son especies fáciles de manipular debido a su pequeño tamaño, lo que facilita también a su vez el mantenimiento en laboratorio. Por otro lado, son modelos genéticos muy importantes por lo que se cuenta con vasto material acerca de estas especies (Blanco et al. 2017). Además, también se realizaron numerosos estudios sobre el comportamiento sexual de *C. auratus* en machos y hembras (Partridge et al. 1976), en particular evaluando las bases neuroendocrinas y la bipotencialidad sexual que regulan los comportamientos masculinos y femeninos en esta especie (Saoshiro et al. 2013; Shinohara y Kobayashi, 2020; para una revisión ver Munakata y Kobayashi, 2010). Por otro lado, la especie *Betta splendens*, perteneciente a la familia de los Osphronemidae en el orden de los Perciformes, constituye otro modelo muy utilizado en comportamiento, particularmente en el estudio de comportamientos agresivos (Castro et al. 2006; Halperin et al. 1998; McGregor et al. 2001; Oliveira et al. 1998). Esta especie defiende su territorio de forma muy agresiva y utilizando una serie de comportamientos altamente estereotipados y visualmente conspicuos (Simpson, 1968), por lo que resulta relativamente sencillo analizar los despliegues comportamentales.

Además, los peces teleósteos son un modelo muy utilizado para el estudio de la relación entre el contexto social y distintos ejes neuroendocrinos (Filby et al. 2010). Por ejemplo, se estudió la relación entre agresión y el metabolismo serotoninérgico en el cerebro, evidenciando diferencias crónicas en este sentido entre individuos subordinados y dominantes (Cubitt et al. 2008; Dahlbom et al. 2012; Loveland et al. 2014; Winberg y Thörnqvist 2016). Otro de los principales ejes estudiados en relación con la agresión es el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, encontrándose que los individuos dominantes y subordinados suelen presentar distintos niveles

de andrógenos y/o estrógenos en circulación (Maruska y Fernald, 2013; Ramallo et al. 2015; Scaia et al. 2020). Por otro lado, los niveles de cortisol suelen estar íntimamente relacionados con las respuestas al estrés. Esto se debe a que en situaciones de estrés ocurre una activación del eje hipotálamo-hipófisis-interrenal, activando la cascada de distintas hormonas como CRH (*corticotropin releasing hormone*), ACTH (*adrenocorticotropic hormone*) y cortisol. Por lo tanto, en zebrafish, similar a lo que ocurre en humanos, el cortisol constituye la principal hormona de respuesta a estrés (Barcellos et al. 2007). En distintas especies de peces se observa una asociación entre situaciones que son consideradas factores de estrés, como por ejemplo podría significar el establecimiento de una jerarquía social o un encuentro agonístico diádico, con los niveles de cortisol (Alonso et al. 2012; DiBattista et al. 2005; Earley et al. 2006; Fox et al. 1997; Gilmour et al. 2005; Sørensen et al. 2011, 2012). En este sentido, niveles aumentados de cortisol en sangre suelen ser indicador de estrés.

1.2.2 Agresión en peces y ciclo reproductivo

La plasticidad comportamental representa una gran ventaja adaptativa, sin embargo, esta característica, acompañada de plasticidad fisiológica, resulta particularmente importante para especies que pueden tener muchas puestas con un bajo éxito reproductivo ya que riesgos como predación o pérdida de territorio pueden tener un impacto muy importante al nivel de la población para estas especies. Por estas razones es crítico que en los individuos de especies con jerarquías sociales haya una coordinación entre el estatus que les permita la reproducción, con el momento fisiológico adecuado para que se dé un evento reproductivo exitoso. De este modo, una sincronización entre la maduración de las gametas y una posibilidad de ascenso en la jerarquía social aumenta la probabilidad de una reproducción exitosa. La gametogénesis es regulada por diversas enzimas, entre las cuales se puede mencionar la enzima aromatasa que se encuentra en las gónadas y que debido a una síntesis local de estrógenos produce la maduración de las gametas, tanto en machos (Schulz y Miura, 2002), como en hembras (Cardinali et al. 2004; Nagahama et al. 1995).

Al igual que en muchos otros aspectos, la dominancia adquirida por despliegues agresivos y enfrentamientos con otros individuos de la misma especie social supone una ventaja reproductiva. Por ejemplo, los machos dominantes del cíclido africano *Astatotilapia burtoni*, mantienen los territorios empleando comportamientos agresivos, los cuales también son utilizados en el cortejo a las hembras. Además, estos individuos tienen un mayor éxito

reproductivo debido, en parte, a que poseen elevados niveles de testosterona y 11-KT, y en concordancia con esto, presentan una espermatogénesis continua y gran disponibilidad de espermatozoides. En cambio, los machos subordinados no tienen un territorio delimitado ni niveles tan altos de hormonas sexuales, y con relación a esto presentan gónadas más pequeñas e inmaduras (Maruska, 2014; Maruska et al. 2022). Cuando las hembras poseen huevos maduros, listos para desovar, lo hacen junto a los machos dominantes que los fertilizan. Luego de fertilizados, la hembra incuba a los huevos en su cavidad bucal por varias semanas durante las cuales no ingieren alimento. Después de este periodo, la hembra permanece defendiendo el territorio y sigue realizando cuidados maternos por un corto periodo de tiempo (Fernald y Hirata, 1977a; Renn et al. 2009). Con respecto al comportamiento de agresión, históricamente se consideraba que las hembras de *A. burtoni* presentan comportamientos muy similares a los de los machos subordinados de esta misma especie, es decir, que presentan bajos niveles de agresión. Sin embargo, estudios más recientes sugieren que existen diferencias comportamentales entre individuos que han sido endocriados en laboratorio respecto de individuos recientemente colectados de poblaciones naturales, mostrando que las hembras de poblaciones recientemente colectadas presentan elevados niveles de agresión en defensa de sus crías frente a machos intrusos (Renn et al. 2009). Estos estudios plantean la importancia de estudiar animales de poblaciones naturales en su condición más natural posible para evitar sesgos en las observaciones comportamentales.

En el cíclido neotropical *C. dimerus* la dominancia en la jerarquía social involucra a ambos miembros de la pareja, siendo esta además una especie con comportamiento de cuidado biparental. La puesta de huevos se realiza sobre un sustrato como puede ser una laja y esta es defendida muy agresivamente por parte de ambos parentales dominantes, dentro de la jerarquía social. La puesta de huevos se da con alta frecuencia y después es seguida por un período de aproximadamente 20 días de cuidado parental donde tanto el macho como la hembra cuidan de los huevos, oxigenándolos y ahuyentando a los demás individuos subordinados que intentan acercarse (Tubert et al. 2012). Notablemente, se observó que luego de la puesta de huevos una posible privación de alimento no afecta el eje reproductivo de hembras mientras que induce un aumento del número de espermatozoides y del eje reproductivo en machos de esta especie (Perez-Sirkin et al. 2021). El cuidado biparental incluye comportamientos agresivos como, por ejemplo, persecuciones, mordidas, agarradas de boca y erección de las aletas (Alonso et al. 2011). En *C. dimerus* al igual que en otras especies de peces cíclidos la dominancia en machos está asociada con altos niveles de andrógenos (para una revisión, ver Scaia et al. 2020). Esto

está relacionado con numerosas evidencias en distintos grupos de vertebrados que distinguen el rol central de los andrógenos en el comportamiento de agresión (Francis et al. 1992; Hume y Wynne-Edwards, 2005; Moore, 1988). Con respecto a las hembras, en *C. dimerus* se observó que aquellas en estado de prepuesta presentan un fuerte comportamiento de agresión y esto está relacionado a altos niveles de andrógenos y de estrógenos (Tubert et al., 2012). Además, si bien los andrógenos tienen un rol importante en la regulación de la agresión, evidencias más recientes en *A. burtoni* sugieren que la aromatización de testosterona hacia estradiol constituye un paso clave en la regulación de este comportamiento (Hufmann et al. 2013). Además, en *C. dimerus* se observó que las hembras ganadoras de una contienda presentan mayores niveles de estradiol que aquellas perdedoras (Scaia et al. 2018b) y que los niveles de estradiol constituyen un factor clave para comprender la variabilidad del comportamiento de agresión (Scaia et al. 2018b, 2023). Los estrógenos suelen estar asociados a comportamientos observados típicamente en hembras, sin embargo, diversos autores demostraron que los estrógenos también tienen un papel crucial en la regulación del comportamiento agresivo en peces machos (Filby et al. 2010, Huffman et al. 2013). De este modo, no solo los andrógenos sino que también los estrógenos constituyen factores centrales para comprender la agresión intersexual, reflejando la importancia de los distintos estados reproductivos y la activación del eje reproductivo para intentar comprender el comportamiento de agresión.

En el pez cebra *D. rerio*, también existe una importante relación entre el comportamiento reproductivo y la agresión (como se detalla en la sección 1.3.2), por lo que resulta un modelo muy interesante para el estudio del comportamiento agonístico.

1.3 Modelo: *Danio rerio*

1.3.1 Hábitat y Biología

Danio rerio o vulgarmente conocido como pez cebra es un pez originario de la India, donde ocupa lagos, ríos y lagunas. Su rango de distribución natural incluye las cuencas del río Ganges y Brahmaputra y las aguas dulces tropicales de las regiones monzónicas de la India, Bangladesh, Nepal, Bután y el norte de Myanmar. Pertenece a la familia Cyprinidae, dentro del orden de los Cypriniformes. Además de ser muy utilizado en acuarismo, es un modelo que está comenzando a ser muy usado para estudios comportamentales y neuroendocrinos. Debido a que en estado larval es completamente transparente también se utilizó ampliamente en estudios embriológicos. Además, presenta una enorme homología genética con el humano, lo que

convierte esta especie en un modelo muy utilizado en laboratorio en todas las ramas de la biología (Teame et al. 2019). El tamaño medio que alcanza en edad adulta es de 4 cm y presenta dimorfismo sexual, donde la hembra tiene un vientre abultado y una coloración planteada, mientras el macho tiene una coloración más bien dorada (Crowder et al. 2018).

Esta especie vive formando bancos a media profundidad y cerca de la superficie. Se demostró que peces de diferentes poblaciones muestran diferencias inter e intra poblacionales en este comportamiento de agrupamientos, y que estas diferencias se deben a diferencias genéticas (Wright et al. 2003). El pez cebra es una especie ovípara con fecundación externa (Breder y Rosen, 1966) que no presenta cuidados parentales (Spence et al. 2007). La ovulación de la hembra depende de la exposición de esta a las feromonas gonadales masculinas, además de ser esencial la presencia de un macho para que las hembras desoven (Talling y Lemoalle, 1998).

Danio rerio se utilizó en múltiples estudios sobre comportamiento y aprendizaje. Esta especie mostró la capacidad de poder desarrollar un aprendizaje espacial con refuerzo apetitivo (Williams et al. 2002), además de aprendizajes de discriminación visual (Colwill et al. 2005), y de evitación activa (Xu et al. 2007). El pez cebra vive en grupos sociales estables, por lo tanto, el reconocimiento de los individuos que forman parte del grupo resulta adaptativo ya que permite recordar posibles interacciones pasadas y en función a esto ajustar el comportamiento de forma adecuada hacia cada uno de los individuos (Madeira y Oliveira, 2017). Además, se espera que al tratarse de una especie altamente social los peces presenten, más allá del reconocimiento individual, una memoria social. En este sentido, Madeira y Oliveira (2017) demostraron que *D. rerio* reconoce diferentes conespecíficos y que esta información es retenida en una memoria de largo termino (24 hs.).

Como se describirá más adelante, *D. rerio* presenta también marcados niveles de agresión entre individuos relacionados a el establecimiento de dominancias jerárquicas (Oliveira et al. 2011; Paull et al. 2010). Tanto machos como hembras de esta especie tienen comportamientos agresivos, por lo que resulta un modelo ideal para estudiar los mecanismos subyacentes a la agresión relacionados con niveles hormonales y de regulación neuroendocrina (Filby et al. 2010; Paull et al. 2010; Scaia et al. 2022).

1.3.2 Comportamiento reproductivo

Danio rerio presenta comportamientos reproductivos que resultan muy convenientes a la hora de trabajar en laboratorio debido a que pueden desovar cada 2 o 3 días y los comportamientos

de cortejo pueden ser desplegados tanto por machos como por hembras a diario y a lo largo de todo el año (Spence et al. 2007). Los comportamientos reproductivos observados en esta especie incluyen contacto físico entre machos y hembras, y consisten principalmente de giros abruptos del macho, siguiendo un patrón elíptico, alrededor de la hembra (Darrow y Harris, 2004). También dentro de los comportamientos asociados a la reproducción se encuentran los nados coordinados y las persecuciones, entre otros comportamientos que también involucran la proximidad entre los individuos de distintos sexos, como, por ejemplo, un comportamiento reproductivo en el cual el macho “guía” a la hembra al lugar de puesta. Si el cortejo resulta exitoso, entonces las hembras liberan los huevos a la vez que se da la fertilización de estos por parte del macho (Darrow y Harris, 2004). Las feromonas tienen un papel muy importante en la reproducción de *D. rerio*, ya que los individuos de esta especie son estimulados sexualmente por concentraciones específicas de las mismas, producidas por conespecíficos (Bloom y Perlmutter, 1977). Además, en algunos casos, los comportamientos de cortejo desplegados por machos son desencadenados por la acción de feromonas de hembras (Hurk y Lambert, 1983). Los machos son atraídos por el olor del extracto ovárico y en las hembras el extracto de testículo induce la ovulación (Hurk and Lambert 1983; Van Den Hurk et al. 1987).

En el pez cebra también existe una importante relación entre la dominancia y los comportamientos reproductivos, ya que un mayor estatus en la jerarquía social asegura una mayor probabilidad de evento reproductivo. Durante el momento de desove en un contexto de pecera social, las hembras dominantes son menos agresivas que los machos dominantes hacia los subordinados (Paull et al. 2010). Sin embargo, a pesar de esta diferencia, los tipos de despliegues agresivos para mantener la dominancia no difieren entre sexos en *D. rerio*. La dominancia en el pez cebra se traduce en un mayor éxito reproductivo en machos, pero no en hembras, aunque se observó que las hembras dominantes tienen más descendencia con los machos dominantes, razón por la cual el estatus social tiene gran importancia en ambos sexos y por lo tanto la energía invertida en la dominancia resulta benéfica para ambos sexos en el pez cebra (Paull et al. 2010).

1.3.3 Agresión en *Danio rerio*

Existe una clara relación entre la agresión y el estatus social en los individuos de *Danio rerio*. La agresión en esta especie es desplegada casi exclusivamente por los individuos dominantes, lo que les suele asegurar un territorio sobre el cual poder poner los huevos luego de la

reproducción. Además, el establecimiento de la jerarquía social se logra mediante los distintos despliegues agresivos, que también permiten mantener el estatus por parte de los dominantes hacia los subordinados (Larson et al. 2006; Paull et al. 2010; Spence et al. 2006).

Los comportamientos agresivos que se despliegan principalmente en los encuentros agonísticos entre individuos de esta especie son muy estereotipados y fueron descriptos inicialmente en machos (Oliveira et al. 2011). Las contiendas, tanto en machos como en hembras (Scaia et al. 2022), suelen iniciar con una serie de comportamientos simétricos de evaluación mutua, denominados *displays*, en los cuales los individuos que se enfrentan se ubican de forma antiparalela, a la vez que erectan las aletas. Luego, realizan círculos, rápidos y ascendentes, intercalados con mordidas. Cuando finalmente emerge un dominante, este persigue al individuo subordinado en largas y rápidas persecuciones a través de todo el acuario. A este momento del enfrentamiento se le llama resolución. Luego de la resolución, el individuo subordinado suele escapar del ganador y/o también permanecer en una esquina inferior del acuario realizando *freezing*, mientras que el ganador explora y domina todo el resto de la pecera (Kaluef et al. 2013; Oliveira et al. 2011). Además, se describió en esta especie el “efecto ganador” que consiste en que un macho ganador tiene más probabilidad de ganar un segundo encuentro, contra un oponente *naïve*, si esta se realiza 1 hs. después de la primera (Oliveira et al. 2011) pero este efecto no se mantiene si la segunda pelea se realiza 24 hs. después de que haya ganado la primera (Chou et al. 2016).

Se ha observado que, lo que sucede en machos de *D. rerio* al ser enfrentados en contiendas en días sucesivos es que los individuos recuerdan haber peleado contra su oponente. Los encuentros del segundo día tienen el mismo resultado del primer día, es decir, que el ganador al segundo día es el mismo que lo fue en la primera contienda. Además, se observó que las contiendas al segundo día muestran menores niveles de agresión y disminuye el número de mordidas, lo que resulta intuitivo si se considera el elevado gasto o inversión energética que implica embarcarse en un comportamiento agresivo si la jerarquía ya se encuentra establecida por un encuentro anterior (Cavallino et al. 2020). Estos resultados sugieren un reconocimiento individual, mostrando que los machos recuerdan haber peleado específicamente contra su oponente ya que no sucede lo mismo cuando el oponente del segundo día es distinto al del primer día de contienda incluso controlando el estatus social del oponente (Cavallino et al. 2020). Mas aun, al añadir un inhibidor de la formación de memoria, se observa que no disminuyen los niveles de agresión al segundo día de pelea, indicando nuevamente que este efecto se observa por recordar al oponente (Cavallino et al. 2023).

Cabe destacar que, si bien la memoria social se estudió en machos adultos de esta especie, aun no hay evidencias en hembras. Si bien la mayoría de los estudios acerca del comportamiento de agresión refieren a machos, también se realizaron estudios sobre la agresión en hembras de esta misma especie y se encontró que no hay diferencias en la latencia al primer ataque entre sexos, lo que muestra una similar motivación por iniciar una contienda intrasexual (Scaia et al. 2022). Por otro lado, las contiendas entre hembras de esta especie también presentan una dinámica muy similar a aquellas entre machos, descritas por Oliveira et al. (2011). De este modo, en esta especie los individuos de ambos sexos muestran altos niveles de agresión y los mismos despliegues comportamentales. Sin embargo, las contiendas entre machos tienen un mayor tiempo de resolución y además presentan una mayor cantidad de comportamientos agresivos y sumisos. A su vez, en este contexto etológico las hembras resuelven el conflicto social más rápidamente y también presentan mayores despliegues laterales, usualmente asociados a la comunicación mediante la línea lateral (Scaia et al. 2022). Sin embargo, cabe destacar que los estudios acerca del comportamiento de agresión en hembras de esta especie refieren al estado de prepuesta, y aun no se han evaluado posibles diferencias en el comportamiento agonístico según distintos estados reproductivos.

1.4 Club cells y sustancia de alarma

1.4.1 Histología de club cells e identidad de la sustancia de alarma

La epidermis del pez cebra está constituida por tres capas, una superficial, una intermedia y una basal. Tanto la basal como la superficial están compuestas por un único estrato celular, donde en la basal son células indiferenciadas y en la superficial, células queratinizadas. La capa intermedia se compone de células mucosas, ionocitos, células indiferenciadas y *club cells* (Chang y Hwang, 2011). *Danio rerio*, al igual que otras especies de peces teleósteos, posee *club cells* que están asociadas al almacenamiento de diversos compuestos que pueden provocar respuestas comportamentales en conoespecíficos (Speedie y Gerlai, 2008).

La sustancia de alarma es una sustancia química, cuya identidad fue descrita mediante diversas técnicas e histología de las *club cells* revelando que está constituida por numerosos compuestos de naturaleza diversa. Zacccone et al. (2001) demostró que en esta sustancia hay lecitinas endógenas, polipéptidos de citoqueratina, y sustancias bioactivas como serotonina, sustancia P, encefalinas, endotelina, implicadas en la regulación paracrina. Además, también se encontró presencia de bacterias en las *club cells* (Chia et al. 2019). De este modo, se sugiere que tanto las células *club cells* como también otras glándulas de la epidermis de peces

constituyen sitios de almacenamiento de diversas sustancias bioactivas (Zaccone et al. 1994). A partir de estas evidencias, se ha establecido un protocolo de obtención del contenido de las *club cells* mediante el raspado de epidermis. Este protocolo ya ha sido utilizado en diversos estudios de comportamiento en el pez cebra y, al observarse un aumento de “respuesta de miedo” en conespecíficos, se ha denominado a esta sustancia como sustancia de alarma (Speedie y Gerlai, 2008). En este sentido, esta sustancia de alarma genera una “respuesta de miedo” en conespecíficos, caracterizada por un aumento en el *freezing* (Egan et al. 2009; Rehnberg y Smith, 1988) y nados erráticos, así como también por un aumento de los niveles de cortisol, por lo que se considera que la “respuesta de miedo” está asociada a una respuesta de estrés (Egan et al. 2009).

Considerando que, desde un punto de vista evolutivo, las *club cells* y la liberación de sustancias debido a un estímulo mecánico no resultaría en un beneficio para el fitness del propio individuo sino para conespecíficos cercanos, se cuestionaron las ventajas adaptativas de mantener las *club cells*. Debido al elevado costo fisiológico de mantenimiento de estas células y de la producción de la sustancia química de alarma, se hipotetizó que las mismas podrían tener alguna otra función adaptativa para el individuo mismo, además de servir como alarma de posibles peligros o predadores para otros individuos circundantes (Pandey et al. 2021). Otras evidencias de que las *club cells* podrían tener una función adicional a la de advertir a conespecíficos radican en que algunas especies el raspado de epidermis no provoca una respuesta comportamental asociada al miedo, a pesar de presentar presencia de *club cells* (Hugie y Smith, 1987; Whitear, 1986). Se observó que el tamaño de las *club cells* aumenta en presencia de patógenos (Chivers et al. 2007; Iger et al. 1988) y que la supresión del sistema inmune genera una reducción en el número de las mismas células (Halbgewachs et al. 2009), lo que llevo a pensar que las *club cells* tienen un rol en la respuesta inmunológica (Chia et al. 2019).

1.4.2 Efecto de la sustancia de alarma en el comportamiento

La sustancia de alarma induce una respuesta comportamental de miedo en una gran variedad de especies de peces. Esta respuesta de miedo se suele caracterizar por nados erráticos a muy alta velocidad o en “zig-zag”. Estos nados suelen intercalarse con otros comportamientos como *freezing* o agrupamiento si hay más individuos en el ambiente (Gerlai et al. 1990; Gerlai et al. 2000; Miklósi et al., 1997; Pfeiffer, 1977). Estas reacciones observadas suelen ser muy parecidas tanto en acuarios artificiales como en el ambiente natural de las especies, por lo tanto,

estudiarlas en laboratorio resulta altamente relevante en un sentido biológico (Palleroni et al. 2005).

La sustancia de alarma induce este comportamiento en los animales debido a que estos pueden percibirla a través de quimiorreceptores en el epitelio olfatorio (Waldman, 1982). Sin embargo, otros individuos en el mismo ambiente pueden percibir el peligro que representa la sustancia de alarma visualmente (y a través de la línea lateral) al observar el comportamiento de miedo desencadenado por la misma en conespecíficos (Frisch, 1941). En este sentido, se ha evaluado si las claves visuales de miedo, es decir la observación de la respuesta de miedo de conespecíficos expuestos a la sustancia de alarma, pueden ser utilizadas como un estímulo incondicionado en el aprendizaje. Notablemente las evidencias sugieren que solo las claves olfativas de la sustancia de alarma, y no la observación del comportamiento de miedo desencadenado por la misma, son efectivas en un paradigma de condicionamiento de miedo (Pinho et al. 2020). Además, fue demostrado que cambios comportamentales individuales inducidos por la sustancia de alarma son independientes de la presencia física de un depredador (Speedie y Gerlai, 2008).

El pez cebra presenta comportamientos agresivos y conflictos sociales que involucran fenotipos sociales plásticos y reversibles (Cavallino et al. 2020, Oliveira et al. 2011, Scaia et al. 2022). En lo que respecta a la sustancia de alarma, aún no hay evidencias de cómo esta sustancia podría afectar los niveles de agresión y/o la dinámica de encuentros sucesivos entre los mismos oponentes en hembras de esta especie. Por otro lado, es interesante destacar que en distintas especies como, por ejemplo, en *D. rerio* y también en *Carassius gibelio* y *Phoxinus phoxinus* la proporción de *club cells* presentes en la epidermis de las hembras puede variar dependiendo del estadio reproductivo en el que se encuentren (Halačka, 2010; Irving, 1996). Además, en *P. phoxinus*, durante la época reproductiva las hembras presentan un número de *club cells* mucho mayor que los machos (Irving, 1996). Por lo tanto, es importante considerar el estado de las hembras dentro del análisis de comportamientos agresivos bajo la influencia de sustancia de alarma, ya que los mismos pueden variar, no únicamente debido al estado reproductivo por sí mismo, sino también, en relación con la proporción de *club cells* presentes en la epidermis.

2 HIPOTESIS Y OBJETIVOS DE INVESTIGACION

A partir de los antecedentes previamente comentados en los peces teleósteos en general y en *D. rerio* en particular, se propone la siguiente **hipótesis**:

“El comportamiento de agresividad y la dinámica temporal de los encuentros agonísticos en hembras de *Danio rerio* está modulado por su estado reproductivo y/o por la percepción de señales químicas de alarma.”

Para poner a prueba esta hipótesis, en primera instancia se planteó como **objetivo general** analizar el comportamiento de agresividad en hembras de *D. rerio* y determinar cómo los distintos parámetros comportamentales pueden ser modulados por las señales químicas de alarma en función del estado reproductivo.

En este sentido, para poder llevar a cabo el objetivo general previamente mencionado se propusieron los siguientes **objetivos específicos**:

1. Caracterizar y cuantificar el comportamiento de agresividad en encuentros agonísticos sucesivos entre hembras de *Danio rerio* en estado prepuesta y postpuesta.
2. Determinar si la sustancia de alarma proveniente de la piel de hembras de *Danio rerio* tiene efecto en el comportamiento de agresión en encuentros agonísticos sucesivos entre hembras.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Animales

Los ejemplares adultos de *Danio rerio* utilizados para llevar a cabo los objetivos planteados para este trabajo fueron adquiridos en acuarios comerciales de la Ciudad de Buenos Aires. Para esta tesis se utilizaron hembras adultas, sexualmente maduras, en estado reproductivo de prepuesta y de postpuesta. Los individuos permanecieron al menos tres meses en el bioterio antes de ser utilizados para estos experimentos, asegurándose así que todos los individuos utilizados eran adultos. Las hembras de distintos estados reproductivos se diferenciaron por la prominencia de su vientre, ya que un vientre más aplanado se corresponde con una hembra postpuesta (Figura 1A) y un vientre más prominente se corresponde con una hembra prepuesta (Figura 1B). Posteriormente el estado fue constatado mediante el cálculo de índice gonadosomático. Los peces se mantuvieron en peceras comunitarias, con un fotoperiodo constante (14 horas luz/10 horas oscuridad) y temperatura entre 25-26 °C. Los acuarios se mantuvieron en pH 6.8-7.5, con aireación constante. Los individuos fueron alimentados con alimento comercial, de la marca tetra color y tetra min, para peces dos veces al día.



Figura 1. A) Hembra postpuesta, B) Hembra prepuesta.

3.2 Manejo ético de los individuos

La manipulación de los individuos y todos los experimentos se realizaron bajo los estándares internacionales para el cuidado de los animales, y en regla con las regulaciones nacionales (Comité Nacional de Ética en la Ciencia y la Tecnología) e institucionales (Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Protocolo 75B). Los protocolos realizados aseguraron la utilización del número mínimo necesario de individuos.

3.3 Dispositivo experimental para la evaluación de la agresión territorial

Los experimentos fueron realizados entre las 14hs. y las 16hs. en un cuarto aclimatado para mantener condiciones constantes de luz y temperatura, en el Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, durante el periodo de septiembre 2021 - diciembre 2022. Para llevar a cabo cada encuentro agonístico se aislaron dos hembras en una pecera experimental (15 cm x 24 cm x 9 cm, 2 L). Las hembras que fueron seleccionadas tenían tamaño similar y provenían de distintas peceras comunitarias, es decir, que no ha habido ningún tipo de interacción social entre ellas. Los dos peces dentro de cada pecera experimental permanecieron aislados visual y físicamente durante 24 horas por una barrera opaca que permitía el intercambio químico, minimizando así el estrés debido al aislamiento social (Oliveira et al. 2011).

3.3.1 Encuentros agonísticos sucesivos

Con el objetivo de evaluar si el comportamiento de agresión está modulado por el estado reproductivo en encuentros agonísticos sucesivos, se seleccionaron díadas de hembras que pertenecían al mismo estado reproductivo. Además, teniendo en cuenta que el comportamiento de agresión en peces puede variar según el tamaño corporal, se tomó el recaudo que las hembras sean similares en peso corporal y el largo estándar, que se considera como el largo del pez desde el extremo anterior de la cabeza hasta la base de la aleta caudal.

Para evaluar la agresión entre hembras en encuentros sucesivos se utilizó un protocolo de tres días. Para ello, luego de 24hs de aislamiento en el segundo día de protocolo se enfrentaron a ambas contrincantes en un encuentro agonístico durante un período de 30 minutos, durante el cual se filmó el experimento con una filmadora JVC HD Everio. Previo a levantar la compuerta e iniciar la contienda, se filmaron 5 minutos con el fin de analizar el comportamiento individual de cada una de las hembras por separado. Luego de los 30 minutos del encuentro agonístico, las hembras fueron separadas mediante la barrera volviendo a un estado de aislamiento visual durante otras 24 horas. Al cabo de este tiempo, en el tercer día de protocolo, las hembras fueron enfrentadas nuevamente en un segundo encuentro que se filmó durante 30 minutos, para evaluar si los distintos parámetros comportamentales se modifican en encuentros sucesivos (Figura 2) (Cavallino et al. 2020). Al igual que en el primer encuentro, también se filmaron los 5 minutos previos a levantar la compuerta. Al finalizar la contienda en el tercer día de protocolo, los individuos permanecieron aislados por la barrera visual por otros 30 minutos antes de realizar la eutanasia. Esto fue necesario debido a que posteriormente se tomaron muestras de

cerebro para evaluar activación neuronal en las distintas áreas cerebrales asociadas con agresión y comportamientos sociales mediante inmunohistoquímica de pS6, protocolo que requiere este tiempo para permitir la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (Scaia et al. 2022). Este objetivo será llevado a cabo por fuera del alcance de esta tesis.

Luego de transcurrido este tiempo, los individuos fueron anestesiados por un shock frio y sacrificados por un corte cervical, se los diseccionó para comprobar su estado reproductivo. Para esto, se define un índice gonadosomático (IG) que se calcula como: $(\text{peso gónada} / \text{peso corporal}) \times 100$ (Cavallino et al. 2019). Al observar la distribución poblacional de los datos observados, además de haber realizado previamente una discriminación visual de los tamaños de los animales utilizados para este experimento, y teniendo en cuenta bibliografía acerca de *D. rerio* (Cavallino et al. 2019), se consideró que un $IG < 9$ se corresponde con hembras en estado de postpuesta y un $IG > 9$ se corresponde con hembras en estado de prepuesta. Se tomaron las siguientes medidas morfométricas: peso corporal, peso del ovario, largo total y largo estándar, con el fin de contrastar a las hembras que se enfrentan en las contiendas, esperando que la diferencia en largo estándar entre hembras sea aproximadamente menor al 10% (Oliveira et al. 2011). Se fijaron los ovarios en Bouin para llevar a cabo los correspondientes estudios histológicos (sección 3.5). Además, las cabezas fueron fijadas en formalina 10% para futuros estudios enmarcados por fuera de esta tesis. Por otro lado, posteriormente se fijaron en Bouin porciones del cuerpo de hembras prepuesta, muestras sobre las cuales también se realizaron los estudios histológicos descriptos en la sección 3.5

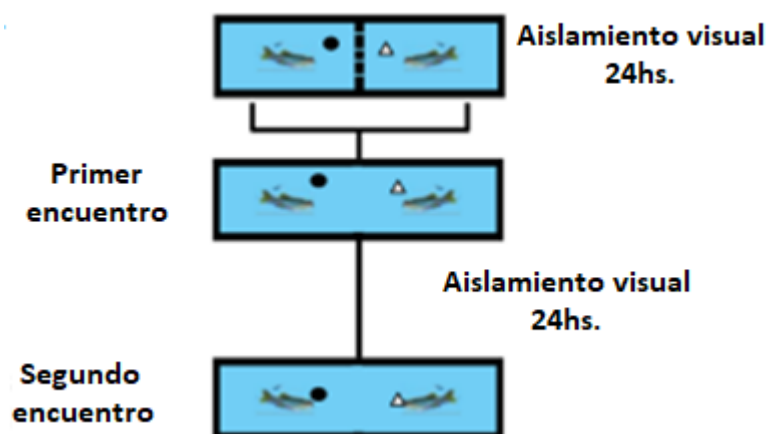


Figura 2. Modificado de Cavallino et al. 2020. Protocolo de días sucesivos de peleas en pez cebra, espaciados por 24 hs. de aislamiento visual.

3.3.2 Protocolo con sustancia de alarma

Se realizaron una serie de experimentos siguiendo el mismo dispositivo experimental mencionado en 3.3.1 pero con la adición de la sustancia de alarma. Para ello, se realizó un protocolo de extracción de sustancia de alarma ya puesto a punto y utilizado en diversos estudios comportamentales en esta misma especie (Akinrinade et al. 2021; Egan et al. 2009, Faustino et al. 2017; Speedie y Gerlai, 2008). Cabe destacar que en otras especies de peces teleósteos se ha determinado que la presencia de *club cells* en hembras depende del estado reproductivo: mientras que en *C. gibelio* ocurre una reducción significativa de la proporción de estas células durante la puesta y el desove (Halacka et al. 2010), en *P. phoxinus* las hembras presentan un número de *club cells* mucho mayor que los machos durante la época reproductiva (Irving, 1996). A partir de estos estudios, con el objetivo de encontrar una mayor proporción de *club cells*, para llevar a cabo estos experimentos la sustancia de alarma fue obtenida a partir de la epidermis de una hembra en estado reproductivo de prepuesta. Para ello, se siguió un protocolo de obtención de sustancia de alarma ya utilizado en nuestro laboratorio para otras especies de peces de tamaño similar a *D. rerio* (Goodall et al 2021, tesis de licenciatura Goodall 2021).

En cada experimento la hembra donante fue anestesiada por un shock frío y sacrificada por un corte cervical, luego se procedió a realizar un raspado de su epidermis con el fin de dañar las *club cells* y liberar la sustancia de alarma del modo que ya fue descrito por Speedie y Gerlai (2008). Se raspó 10 veces cada flanco del individuo, y 10 veces el dorso y el vientre del mismo, a medida que se fueron añadiendo 20 ml de agua de clorada. Este proceso de obtención de la sustancia de alarma se llevó a cabo en 3 minutos, luego de los cuales se retiró el individuo de la solución de sustancia de alarma y se la fraccionó en jeringas de 2,5 ml que fueron mantenidas en hielo para mantenerlas refrigeradas. La sustancia de alarma no fue congelada y este procedimiento se repitió para cada uno de los experimentos realizados el mismo día, con el fin de utilizar sustancia de alarma fresca.

En este caso, para llevar a cabo los encuentros agonísticos también se emplearon díadas de hembras que pertenecían al mismo estado reproductivo. En el segundo día de protocolo, es decir luego de las 24hs de aislamiento y antes de iniciar el primer encuentro agonístico, las hembras fueron filmadas durante 5 minutos para observar los comportamientos individuales de las mismas, de la misma forma que se realizó en el apartado 3.3.1. Luego de transcurridos estos 5 minutos iniciales, se añadieron 5 ml de la solución de sustancia de alarma al agua de la pecera experimental de modo equilibrado (2,5 ml en cada uno de los extremos, correspondientes a

cada compartimento individual, evitando así un sesgo en el flujo y en la intensidad del estímulo para ambas contrincantes) (Egan et al. 2009). Después de añadir la sustancia de alarma a la pecera se filmaron 5 minutos adicionales antes de levantar la compuerta que separa a las hembras e iniciar la contienda, con el fin de registrar la respuesta individual frente a esta sustancia. Una vez transcurrido este tiempo, se levantó la compuerta y se dio comienzo a el encuentro agonístico que, al igual que para lo mencionado en la sección 3.3.1, también fue filmado durante 30 minutos (Figura 3).

Los efectos de la sustancia de alarma sobre el comportamiento social fueron también estudiados en días sucesivos. Para ello, antes de realizar el segundo encuentro agonístico, al día siguiente se siguió el mismo protocolo utilizado para el primer día de contienda. Se añadieron 5 ml de la sustancia de alarma al agua de la pecera previamente al encuentro agonístico. Al finalizar el segundo encuentro agonístico, las hembras fueron sacrificadas y se llevó a cabo el mismo procedimiento mencionado para en 3.3.1. De este modo, se evaluó si la exposición a sustancia de alarma modula el comportamiento de agresión en hembras pre y postpuesta y también si esta modulación presenta diferencias en las contiendas en días sucesivos.

Como será descrito en la sección 3.4, los videos de los encuentros fueron analizados del mismo modo que para 3.3.1. Además, en un futuro, se busca evaluar el comportamiento individual durante los 5 minutos filmados luego del agregado de la sustancia de alarma mediante el programa Ethovision, evaluando diferentes variables como la distancia recorrida, velocidad y posición en la pecera, para cada hembra por separado.

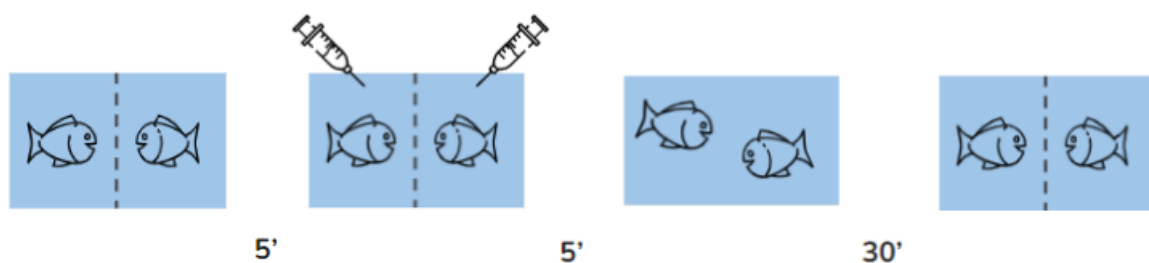


Figura 3. Protocolo utilizado, tanto en el primer como en el segundo día de contiendas, para analizar los efectos de la adición de sustancia de alarma sobre la agresión y la dinámica de los encuentros agonísticos entre hembras.

3.3.3 Controles

Para poder determinar si los efectos observados en los experimentos realizados con sustancia de alarma se deben específicamente a la misma y no son producto del flujo generado al introducir una corriente con la jeringa en la pecera, se realizaron los siguientes controles.

Se llevó a cabo el mismo diseño experimental explicado en 3.3.2, con la diferencia de que en vez de añadir sustancia de alarma al agua de las peceras experimentales se añadió agua filtrada que también se mantuvo refrigerada hasta la finalización de los experimentos de cada día. El agua se agregó de la misma forma que la sustancia de alarma, utilizando jeringas e introduciendo 2,5 ml en el agua, a cada lado de la pecera. El mismo procedimiento se realizó al segundo día de contiendas. Los pasos siguientes en el diseño experimental se realizaron de la misma forma que lo explicado en 3.3.1.

3.4 Análisis de videos y cuantificación de las variables comportamentales

Los videos fueron analizados según el etograma ya descrito para machos y hembras de esta especie en este mismo contexto etológico (Oliveira et al. 2009, Scaia et al. 2022, respectivamente). Para comparar la dinámica del comportamiento de agresión territorial de las hembras de ambos estados reproductivos, en el primer encuentro agonístico se cuantificó la latencia, el tiempo de agresión total, el tiempo de resolución, y el tiempo de *freezing*. Estas mismas variables fueron utilizadas para comparar la dinámica de los encuentros agonísticos entre ambos estados reproductivos en días sucesivos, y también para comparar encuentros en presencia y ausencia de la sustancia química de alarma.

La latencia se define como el tiempo que transcurre desde que se levanta la compuerta que separa a las hembras contrincantes en la pecera experimental hasta que se observa el primer despliegue agresivo, dentro de los ya descritos por Oliveira et al. (2009). El tiempo de agresión total hace referencia a todo el tiempo que las hembras invierten realizando despliegues agresivos, desde el primer despliegue hasta que se observa una resolución del conflicto, o si no existiera una resolución del conflicto social, hasta que se cumplen los 30 minutos que dura cada encuentro. El tiempo de resolución fue cuantificado solo en aquellas contiendas en las que se pudo observar una resolución clara, con una consecuente ganadora y una perdedora. En estos casos, el tiempo de resolución es el tiempo en el que una hembra comienza rápidas persecuciones hacia su contrincante, estableciéndose como ganadora, y a su vez la hembra perseguida estableciéndose como perdedora. Por último, el tiempo de *freezing* se define como

el tiempo total que cada una de las hembras invierte en un período de inactividad y de ausencia de movimiento desde que se levanta la compuerta que las aísla visualmente hasta que se termina el encuentro agonístico.

3.5 Procesamiento histológico

3.5.1 Histología de gónada y cortes transversales de cuerpo

Se realizaron disecciones de los ovarios de las hembras utilizadas en los encuentros agonísticos, con el objeto de observar los distintos estadios de la oogénesis y caracterizar histológicamente los ovarios correspondientes a hembras en estado de prepuesta y de postpuesta. Para ello, los ovarios fueron fijados en Bouin (70% solución saturada de ácido pícrico, 25% formol, 5% ácido acético) y transcurridas 24hs. las muestras se conservaron en alcohol 70° hasta el momento de su deshidratación en alcoholes de graduación creciente. Brevemente, la deshidratación consistió en dos pasajes por alcohol 70%, 80%, 90% y finalmente 96%, siendo cada pasaje de 30 minutos. Luego se realizó un pasaje a alcohol 96%: Xilol (50:50) (30 minutos) y luego a Xilol puro (20 minutos). Todos los procedimientos que involucren Xilol fueron realizados bajo campana. Antes de incluir las muestras en parafina se realizó un último pasaje a Xilol-parafina, dejando las muestras en la estufa histológica por 15 minutos. Por último, las muestras permanecieron en parafina (dos tandas de 1hs. y 30 minutos en cada una). Las muestras fueron incluidas en parafina y, luego de armar los tacos histológicos, se realizaron cortes histológicos de 7 µm a micrótopo, con un micrótopo MICROM HM 350.

Con el objetivo de comprobar la presencia de *club cells* en la epidermis de hembras *D. rerio* se analizaron cortes transversales de cuerpos completos. Para ello, se muestrearon secciones del cuerpo (porción anterior con cabeza, porción media con el tronco y porción posterior con aleta caudal) de hembras prepuesta. Se llevó a cabo el mismo protocolo de fijación, deshidratación e inclusión que para las muestras de ovarios aislados, mencionado en anteriormente en esta sección. Se obtuvieron cortes histológicos de 7 µm, con un micrótopo MICROM HM 350, correspondientes a cortes transversales de la porción media del tronco. Además, estos cortes transversales de tronco fueron también utilizados para el análisis histológico de gónadas de hembras prepuesta, mencionado anteriormente.

Los cortes se observaron y fotografiaron con un Microscopio Zeiss Primo Star acoplado a una cámara fotográfica Zeiss Axiocam 208 color.

3.5.2 Histología de cerebro

Con el objetivo de obtener muestras para la evaluación de la activación de las áreas cerebrales involucradas en el cerebro social mediante inmunohistoquímica, las cabezas fueron fijadas en formalina 10% y decalcificadas luego de 72hs. Para ello, se realizaron dos lavados de 30 minutos con PBS, luego de los cuales se pasaron las muestras a EDTA (0,5 M pH:8) donde permanecieron por 48hs (Scaia et al. 2022). Después de transcurridas las 48hs. se realizaron dos lavados de 30 minutos en PBS, seguidos de dos lavados más de 30 minutos en agua destilada, para finalmente comenzar el mismo protocolo de deshidratación descrito en la sección 3.5.1. Las cabezas fueron orientadas e incluidas en parafina, y se realizaron cortes transversales (con un microtomo MICROM HM 350) con el objetivo de cuantificar la activación neuronal en las distintas áreas cerebrales y así poder identificar las redes neuronales involucradas en los distintos grupos experimentales. La activación cerebral se realizará mediante inmunohistoquímica del marcador de activación neuronal pS6 (Scaia et al. 2022), aunque este análisis se realizará por fuera del alcance de esta tesis de licenciatura.

3.5.3 Coloración: Hematoxilina de Carazzi y Eosina alcohólica

Se seleccionaron cortes histológicos de gónadas, secciones transversales de cuerpo y de cabeza para ser coloreados con hematoxilina-eosina (H&E). Para hacer la coloración es necesario antes desparafinar los cortes e hidratarlos debido a la base acuosa de los colorantes utilizados. Los cortes ya montados en los portaobjetos fueron desparafinados en Xilol y en concentraciones decrecientes de alcohol. La hidratación consistió en pasajes por alcohol 96%, 90% y 70% dejando los cortes por 1 minuto en cada uno de los alcoholes. Luego de un pasaje por agua destilada durante 2 minutos, los cortes fueron coloreados con Hematoxilina de Carazzi (Merck) durante 10 minutos. Luego del viraje en agua de canilla por 1 minuto, los cortes fueron coloreados con Eosina alcohólica por 1 minuto. Finalmente, los cortes fueron deshidratados en concentraciones crecientes de alcohol y en Xilol para aclarar. Por último, los cortes fueron montados con bálsamo de Canadá y un cubreobjetos

3.5.4 Coloración: Método del ácido periódico-Reactivo de Shiff (PAS)

Con el objetivo de realizar una técnica histoquímica que permita la detección de glicoconjugados neutros y así distinguir las distintas células presentes en la epidermis del pez cebra, se colorearon muestras de cuerpo utilizando la técnica de Reactivo de Shiff (PAS). Luego de desparafinar e hidratar los cortes, fueron tratados con ácido periódico 0.5% en agua destilada, durante 5 minutos. Seguido de este paso, se lavaron los cortes con agua destilada, para luego introducir los cortes en el Reactivo de Shiff, que debe permanecer en constante oscuridad, por lo cual se debe cubrir el recipiente que se utilice, protegiéndolo de la luz. En el Reactivo de Shiff los cortes permanecieron por aproximadamente 15-20 minutos, para posteriormente ser pasados por agua tibia de la canilla durante 2 minutos aproximadamente. En este paso se debería comenzar a ver la coloración sobre los cortes, y el tiempo que permanezcan dependerá de la intensidad de la coloración que vayan adquiriendo. Después de este pasaje, se procedió a colorear con Hematoxilina de Carazzi, donde los cortes permanecieron por 10 minutos, tiempo luego del cual se les colocó agua, por goteo, por 1 minuto para que se realice el viraje de la coloración. En algunos cortes, además, se realizó una variante de esta técnica, agregando verde luz acético (VL), durante apenas unos segundos, luego del viraje de la hematoxilina. Esta variante se realizó con el objetivo de obtener una coloración de fondo que permita distinguir mejor a las células de la epidermis.

Finalmente se procedió a deshidratar nuevamente los cortes, pasándolos por concentraciones crecientes de alcohol y finalmente en Xilol durante 2 minutos, para después ser montados de la misma forma que se realizó en las coloraciones con hematoxilina y eosina (sección 3.5.3).

3.6 Análisis estadístico

En primer lugar se analizaron las diferencias en las medidas morfométricas (peso total y largo estándar) entre hembras contrincantes, con una prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras pareadas, para poder determinar que no hay diferencias significativas entre las dos hembras de una misma contienda, y poder así descartar que los efectos observados sobre el comportamiento se deban a una diferencia morfométrica entre las contrincantes.

Con el objetivo de comparar los encuentros de distintos estados reproductivos (prepuesta y postpuesta) se contrastaron la latencia y el tiempo total de agresión con la prueba no paramétrica de Wilcoxon.

Para evaluar cómo varían los encuentros agonísticos en días sucesivos de contiendas se comparó la latencia y el tiempo total de agresión con la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras pareadas, tanto para la serie de experimentos realizados sin sustancia de alarma, como también en la serie de experimentos donde se agregó la sustancia de alarma.

Con el objetivo de evaluar el posible efecto de la sustancia de alarma sobre el comportamiento agonístico se comparó el tiempo total de agresión y la latencia en hembras expuestas o no a sustancia de alarma con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, contrastando en esta prueba también a los controles hechos con agua destilada. En los casos en que este análisis dio significativo, se realizaron comparaciones a posteriori utilizando el método de Holm.

Por otro lado, se evaluó el *freezing* del encuentro global. Esto se realizó obteniendo un indicador del *freezing* total de la pelea, calculado como (*freezing* hembra derecha + *freezing* hembra izquierda) / 2. Se comparó así el *freezing* de los encuentros correspondientes a ambos estados reproductivos utilizando la prueba no paramétrica de Wilcoxon. Se comparó también el *freezing* de los encuentros en días sucesivos mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras pareadas. Por último, se comparó el nivel de *freezing* en las contiendas realizadas sin sustancia de alarma con el de las con sustancia de alarma, contrastando siempre además contra los controles realizados con agua mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. En este caso también, al haber diferencias significativas, se realizaron comparaciones a posteriori utilizando el método de Holm.

En todos los casos se utilizaron pruebas estadísticas no paramétricas para el análisis de los datos debido a que se evaluaron los supuestos de Normalidad y Homocedasticidad de las varianzas en cada uno de los casos, supuestos necesarios para realizar un análisis paramétrico de los datos. El supuesto de Normalidad fue evaluado mediante el test estadístico de Shapiro Wilks, mientras que la Homocedasticidad se evaluó mediante el análisis gráfico de los residuos, además de con el test estadístico de Levene en los casos en que no se realizó un análisis de un diseño de medidas repetidas (DMR). En todos los casos, a excepción de un tratamiento, no se cumplió alguno (o ninguno) de los dos supuestos requeridos. En el caso en que se evalúa el *freezing* en función del estado reproductivo se cumplen ambos supuestos, pero, al igual que en el resto de los demás experimentos, el n utilizado en cada uno de los grupos es relativamente

pequeño (prepuesta=9 y postpuesta=5). Teniendo en cuenta que en la mayoría de los experimentos los grupos están desbalanceados y que además presentan un n pequeño, se consideró más adecuado realizar un análisis no paramétrico de los datos, antes que realizar una transformación de los datos para cumplir con el supuesto de normalidad. Los p-valores de cada una de las pruebas realizadas para probar los supuestos necesarios para el análisis paramétrico de los datos se presentan en el anexo.

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa R-studio y el nivel de significancia utilizado en todas las pruebas fue del 95%, es decir que se consideraron diferencias significativas aquellos casos en los que $p < 0,05$. Las medidas morfométricas se presentan como la media \pm SD. Teniendo en cuenta los análisis estadísticos no paramétricos utilizados, todos los siguientes datos son presentados como medianas y su rango intercuartílico (RI), que muestra diferencia entre el tercer y el primer cuartil de una distribución, representando la dispersión estadística de los datos..

En todos los casos donde los resultados se presentan en forma de Box-plot, se representa la mediana con la línea central, la caja representa el rango intercuartílico (75%-25%) y los bigotes el máximo y el mínimo (100%-0%). Los puntos se corresponden los valores de cada dato, respectivamente.

Soluciones y buffers

Solución de Bouin: 70% solución saturada de ácido pícrico, 25% formol, 5% ácido acético.

Formalina 10%: Dilución 1:10 de formol 40% en PBS.

PBS: A partir de NaCl (137 mM), KCl (2,7 mM), Na_2HPO_4 (10 mM), KH_2PO_4 (2 mM) en agua destilada. pH 7,4.

EDTA: A partir de EDTA 0,5M sólido, en agua destilada. Llevar a pH 8 utilizando pellets de NaOH.

Hematoxilina de Carazzi: A partir de la Hematoxilina de Carazzi Merck se realizó una dilución 1/8 de esta en agua destilada. Antes de ser utilizada se filtró para eliminar residuos.

Eosina alcohólica: Se diluyó en alcohol 70% al 0,25%.

Reactivo de Shiff: Fucsina básica (CI 42510), ácido clorhídrico puro, metabisulfito de Na y agua destilada.

Verde luz acético 0,2%: Verde luz (CI 42095), agua destilada, ácido acético.

4 RESULTADOS

4.1 Medidas morfométricas

Se midió el largo estándar y el peso de las hembras utilizadas en todas las contiendas y se contrastó la hembra derecha con la izquierda de cada uno de los encuentros a fin de determinar si existen diferencias para estas medidas morfométricas entre las hembras contrincantes (Figura 4 y Figura 5, respectivamente).

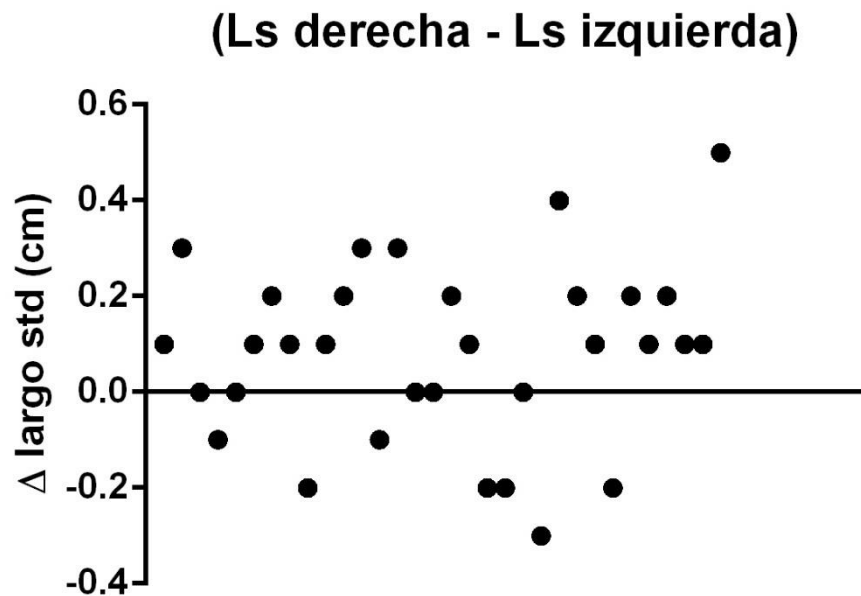


Figura 4. Diferencia entre el largo estándar (cm) de las hembras que se enfrentaron en cada una de las contiendas. Cada punto representa una díada de hembras. Los puntos se distribuyen alrededor del cero, donde una diferencia de cero representa que las hembras enfrentadas tienen el mismo largo estándar.

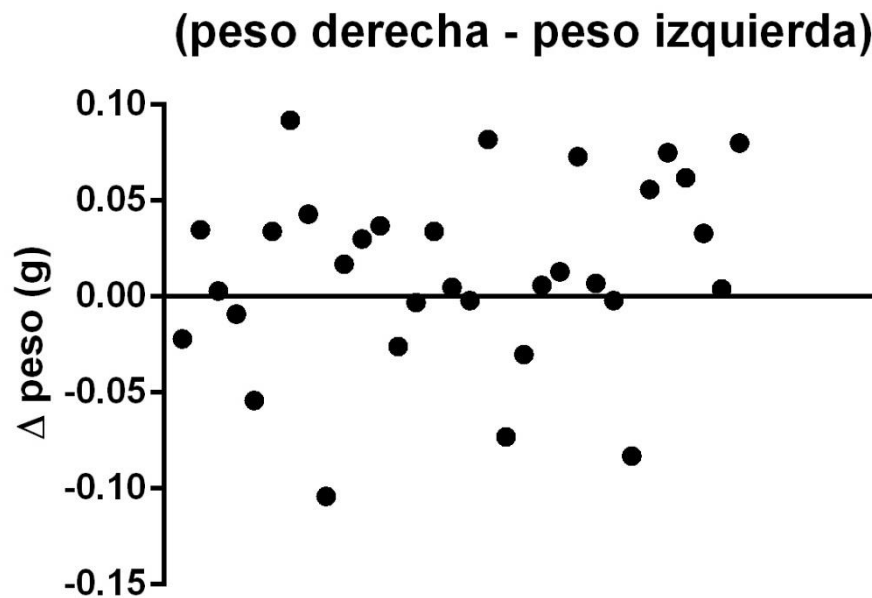


Figura 5. Diferencia en el peso (g) de las hembras que se enfrentaron en cada una de las contenedores. Cada punto representa una diada de hembras. Los puntos se distribuyen alrededor del cero, donde una diferencia de cero representa que las hembras enfrentadas tienen el mismo peso total.

Mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras pareadas no se observan diferencias en el largo estándar de las hembras contrincantes ($p = 0,5643$). La media \pm SD obtenida para las hembras del compartimento derecho de la pecera fue de $2,425\text{cm} \pm 0,220\text{cm}$, mientras que para las hembras del compartimento izquierdo fue de $2,344\text{cm} \pm 0,224\text{cm}$. Si bien en algunos casos se vio una diferencia mayor a la esperada, la diferencia entre las medias es de $0,081\text{ cm}$, es decir, menor al 10%, por lo que esta diferencia se considera biológicamente insignificante, basándonos en bibliografía previa (ver materiales y métodos, sección 3.3.1).

Por otro lado, al realizar la prueba de Wilcoxon para pruebas pareadas tampoco se obtuvieron diferencias significativas para el peso de las hembras enfrentadas en los encuentros agonísticos ($p = 0,4058$). El peso medio \pm SD de las hembras del compartimento derecho fue de $0,258\text{g} \pm 0,07\text{g}$ y para las hembras del compartimento izquierdo de $0,245\text{g} \pm 0,07\text{g}$. La diferencia en los pesos de las hembras es de $0,013\text{ g}$, es decir, menor al 10%, por lo que se considera esta diferencia biológicamente irrelevante. Lo que indica que lo observado en las siguientes secciones no se debe a diferencias en las medidas morfométricas entre las contrincantes.

4.2 Agresión en función del estado reproductivo

Se cuantificó la latencia (Figura 6) y el tiempo de agresión (Figura 7) en el primer día de contienda entre hembras prepuesta (PreP) y entre hembras postpuesta (PostP). Al comparar la latencia de los encuentros entre hembras en estado de prepuesta y aquellas en estado de postpuesta mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon no se observaron diferencias significativas entre ambos estados reproductivos (PreP: mediana = 4 s; RI = 4; N = 9; PostP: mediana = 5 s; RI = 3; N = 5; p-valor = 0,2819). Además, al comparar el tiempo de agresión de las contiendas de ambos estados reproductivos mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon no se observaron diferencias significativas entre ambos estados reproductivos (PreP: mediana = 31 s; RI = 123; N = 9; PostP: mediana = 43 s; RI = 64; N = 5; p-valor = 0,5934). En todas las pruebas estadísticas se utilizó un $\alpha = 0,05$, es decir que se consideraron diferencias significativas aquellos casos en los que $p < 0,05$. Estos resultados sugieren que en ambos estados reproductivos las hembras de esta especie muestran similar motivación hacia iniciar una contienda y que no muestran diferencias en los niveles de agresión durante los encuentros agonísticos. Al no observar diferencias estadísticas en la dinámica temporal ni en los niveles de agresividad territorial entre distintos estados reproductivos, a continuación, y para las siguientes secciones se analizaron todas las contiendas en conjunto, las de hembras prepuesta junto con los enfrentamientos entre hembras postpuesta y las mixtas (entre hembras de distinto estado reproductivo).

Latencia en función del estado reproductivo

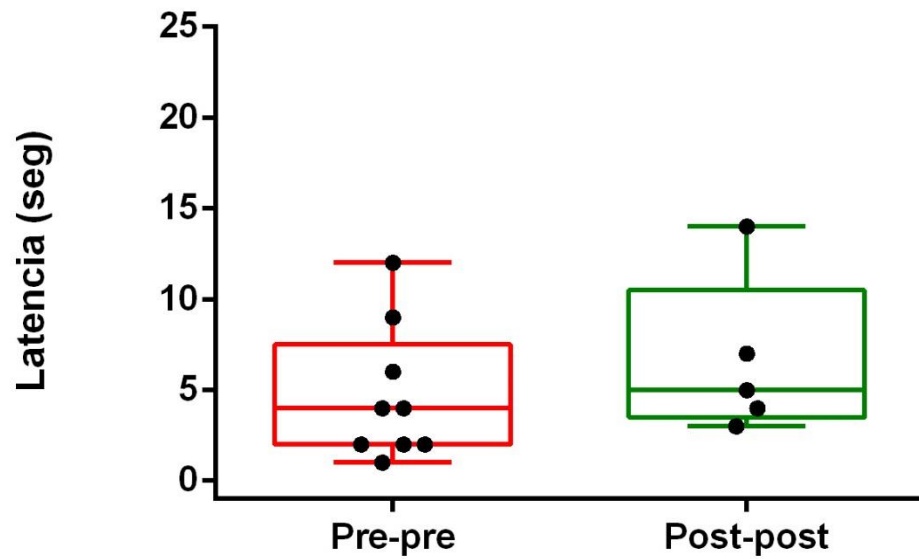


Figura 6. Latencia en función del estado reproductivo. Ambas contrincantes corresponden al mismo estado reproductivo, ya sea de Prepuesta (Pre-pre) o de Postpuesta (Post-post). En este gráfico se analizan las latencias de los encuentros agonísticos correspondientes al primer día de contienda. No se observan diferencias en la latencia de las contiendas entre hembras prepuesta de aquellas entre hembras postpuesta ($p = 0,2819$).

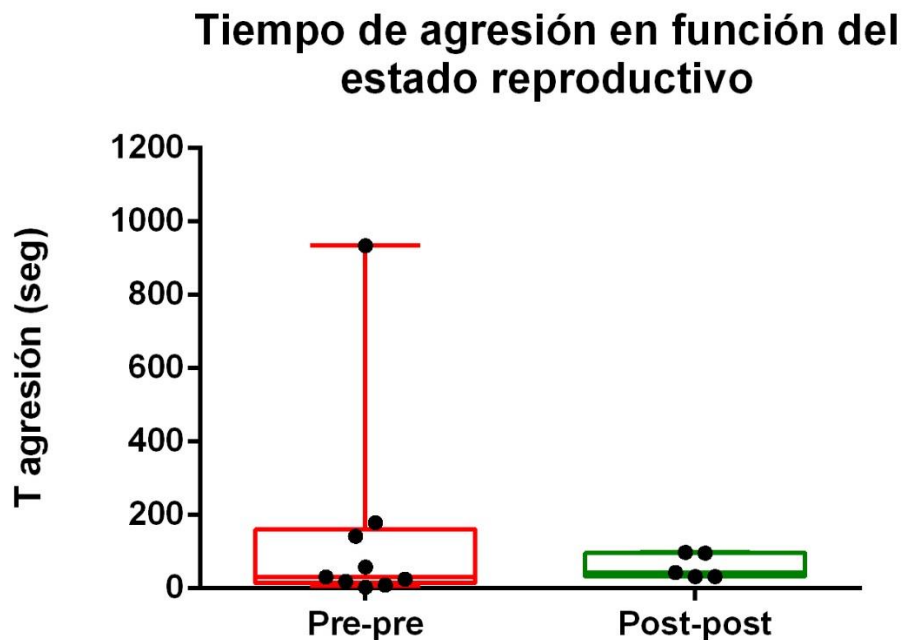


Figura 7. Tiempo total de agresión en función del estado reproductivo. Ambas contrincantes corresponden al mismo estado reproductivo, ya sea de Prepuesta (Pre-pre) o de Postpuesta (Post-post). En este gráfico se analizan los tiempos totales de agresión de los encuentros agonísticos correspondientes al primer día de contienda. No hay diferencias en la agresión de las contiendas entre hembras prepuesta de aquellas entre hembras postpuesta ($p = 0,5934$).

4.3 Descripción de ovario en distintos estados reproductivos

Como se hace mención en el apartado 3.5, se realizaron cortes histológicos de ovarios aislados y de secciones transversales del cuerpo con el fin de observar la histología de los ovarios de las hembras en estados de prepuesta y postpuesta y distinguir los distintos estadios de la oogénesis (Figura 8, A, B y C respectivamente).

En los ovarios correspondientes al estado de prepuesta se identifican folículos en distintos estadios de vitelogénesis. En primer lugar, se observan oocitos pre vitelogénicos, de crecimiento primario, que se evidencian por su citoplasma basófilo y un tamaño mucho menor que los oocitos vitelogénicos. También se observan oocitos en vitelogénesis temprana que poseen gránulos corticales y un citoplasma levemente basófilo. También, en los oocitos vitelogénicos se observa un núcleo central con nucleolos periféricos. Además, en los ovarios de hembras prepuesta se observan oocitos vitelogénicos tardíos, con una abundante cantidad de vitelo y un

citoplasma acidófilo. Los oocitos vitelogénicos tardíos poseen un mayor tamaño en comparación a los vitelogénicos de maduración más temprana. Por último, en estos cortes se ven también pocos folículos post ovulatorios. (Figura 8, A y B).

En cambio, el corte de ovario de hembras postpuesta muestra en su gran mayoría oocitos pre vitelogénicos de crecimiento primario, de tamaño pequeño y folículos post ovulatorios. Aun así, en este corte también hay presencia de oocitos vitelogénicos y vitelogénicos tardíos, con mayor cantidad de vitelo, en estados más avanzados de maduración (Figura 8, C).

Cabe destacar que en ambos estados reproductivos se pueden evidenciar los distintos estadios de la oogénesis, sin embargo, la diferencia entre estos estados radica en la proporción de los distintos oocitos. Mientras los ovarios de hembras prepuesta presentan una mayor cantidad de folículos en estados más avanzados de la maduración, los ovarios de hembras postpuesta, además de ser de un menor tamaño, tienen en su mayoría folículos de crecimiento primario.

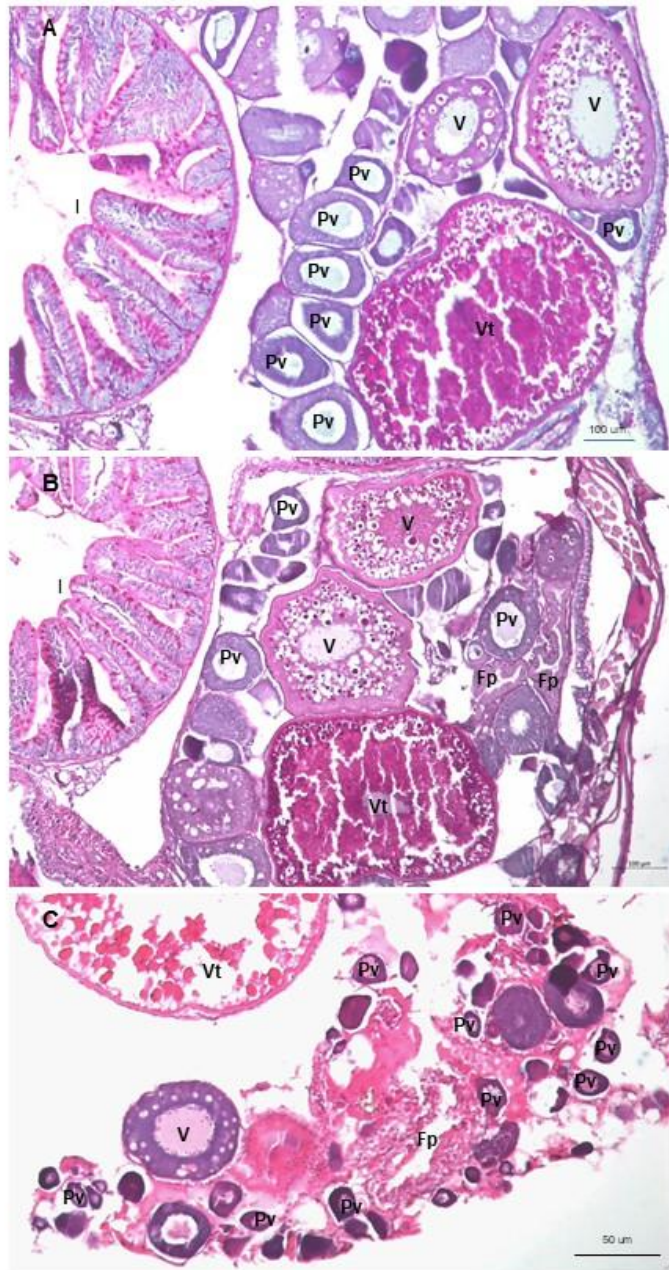


Figura 8. A) Corte histológico de hembra prepuesta. Coloración: PAS y verde luz B) Corte histológico de hembra prepuesta. Coloración: PAS C) Corte de ovario de hembra postpuesta. Coloración: H&E . Pv= oocitos pre vitelogénicos, V= distintos estadios de oocitos vitelogénicos, Vt= oocitos vitelogénicos tardíos, Fp= folículos post ovulatorios, I= intestino.

4.4 Agresión en encuentros agonísticos sucesivos

Para evaluar si el comportamiento de agresividad entre hembras de *D. rerio* se modifica en encuentros agonísticos sucesivos se comparó la latencia (Figura 9) y el tiempo total de agresión (Figura 10) de las contiendas entre las mismas contrincantes, en los días sucesivos. Para ello se evaluaron los datos de un modo pareado, es decir, comparando el primer día y el segundo dentro de cada contienda.

La latencia, al igual que el tiempo de agresión, se analizó mediante un test de Wilcoxon para pruebas pareadas. Si bien en varias contiendas se observó una tendencia al aumento de la latencia en el segundo encuentro agonístico, no se encontraron diferencias entre los días sucesivos de contiendas (día 1: mediana = 5 s; RI = 4; N = 17; día 2: mediana = 11 s; RI = 13; N = 17; p-valor = 0,0534). Si bien no se hallaron diferencias significativas en la motivación por iniciar una contienda en función del día, cabe mencionar que este análisis se encuentra muy cercano a la significancia ($p < 0,05$). Por lo tanto, la falta de significancia estadística acerca de la variación en la motivación por pelear podría deberse a una falta de potencia de la prueba o a un bajo n.

The graph displays the change in latency for 15 subjects over two days. The Y-axis represents Latencia (sec) from 0 to 80. The X-axis represents the day (Día) from 0 to 2. Each line connects the data points for a single subject on Day 1 and Day 2. Most subjects show an increase in latency, with one subject showing a particularly large increase from about 35 seconds to 70 seconds.

| Subject | Day 1 Latency (sec) | Day 2 Latency (sec) |
|---------|---------------------|---------------------|
| 1 | 35 | 70 |
| 2 | 15 | 25 |
| 3 | 12 | 18 |
| 4 | 10 | 15 |
| 5 | 8 | 12 |
| 6 | 7 | 10 |
| 7 | 6 | 8 |
| 8 | 5 | 7 |
| 9 | 4 | 6 |
| 10 | 3 | 5 |
| 11 | 2 | 4 |
| 12 | 1 | 3 |
| 13 | 1 | 2 |
| 14 | 1 | 1 |
| 15 | 1 | 1 |

Al comparar la agresividad de los encuentros entre hembras, en días sucesivos, utilizando un test de Wilcoxon para pruebas pareadas, no se observaron diferencias en función del día (día 1: mediana = 43 s; RI = 73; N = 17; día 2: mediana = 43 s; RI = 116; N = 17; p-valor = 0,8851). Estos resultados sugieren que los niveles de agresión territorial en hembras de esta especie no se modifican durante encuentros agonísticos sucesivos.

Tiempo de agresión en función del día de pelea

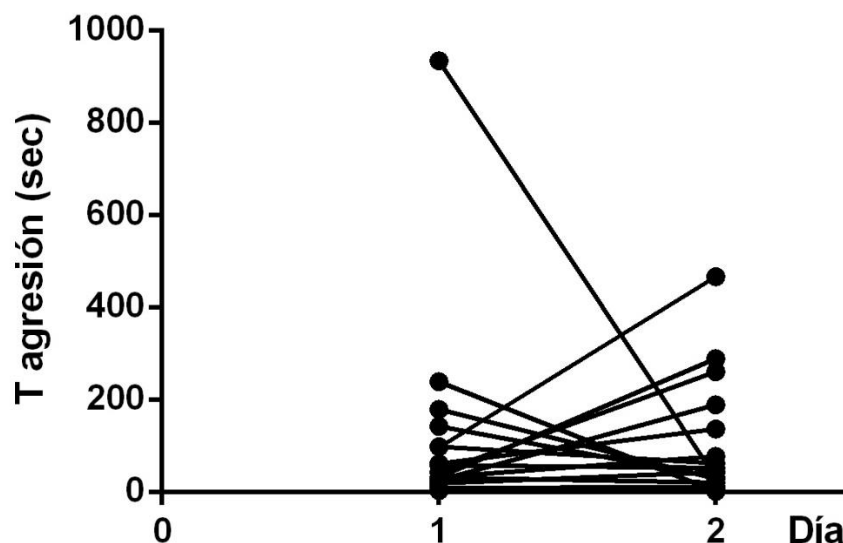


Figura 10. Tiempo de agresión total de cada una de las contiendas pareadas, en días sucesivos. Se tuvieron en cuenta todos los encuentros, independientemente del estado reproductivo de las hembras. Cada punto representa una pelea y las líneas conectan aquellas pareadas entre las mismas contrincantes. No se encontraron diferencias significativas en la agresión de las contiendas en días sucesivos ($p = 0,8851$).

4.5 Agresión en función de la sustancia química de alarma

Para llevar a cabo el objetivo que consiste en determinar si la sustancia química de alarma tiene efecto en el comportamiento de agresión de hembras de *D. rerio*, se comparó la latencia y el tiempo total de agresión durante el primer encuentro de tres grupos experimentales mediante un test de Kruskal-Wallis. Como ya se mencionó previamente, al no observarse diferencias significativas en la latencia y en el tiempo total de agresión entre los distintos estados reproductivos (sección 4.2), se optó por evaluar las contiendas de los distintos estados reproductivos en conjunto. Como se explicita en la sección 3.3.2, el primer grupo analizado son las contiendas realizadas sin sustancia de alarma ni corriente de agua agregada (Sin SA), el segundo grupo se compone de los controles realizados con el agregado de la corriente de agua

filtrada (Ctrol) y el tercer grupo son aquellas contiendas en las cuales se añadió sustancia de alarma al agua de la pecera (Con SA).

Se evaluó la latencia y, al comparar los distintos grupos experimentales mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, se observaron diferencias significativas (Sin SA: mediana = 5 s; RI = 4; N = 17; Ctrol: mediana = 5,5 s; RI = 3,5; N = 8; Con SA: mediana = 15 s; RI = 177; N = 15; p-valor = 0,01474) (Figura 11).

Por lo tanto, con el objetivo de discernir las diferencias estadísticas entre los grupos experimentales, se realizaron comparaciones a posteriori utilizando el método de Holm. Este análisis sugiere que se observan diferencias significativas entre el grupo Sin SA y Con SA ($p = 0,025$) y también entre el grupo Control y Con SA ($p = 0,0348$). Cabe destacar que no se observaron diferencias significativas entre el grupo Sin SA y el grupo Control ($p = 0,537$). Estos análisis muestran que la latencia es mayor en aquellas contiendas que recibieron el agregado de la sustancia de alarma y que este efecto no se debe al flujo de corriente generado por el agregado del tratamiento. De este modo, estos resultados sugieren que la percepción de la sustancia de alarma de conespecíficos disminuye la motivación de las hembras de esta especie a embarcarse en un comportamiento agonístico de agresión.

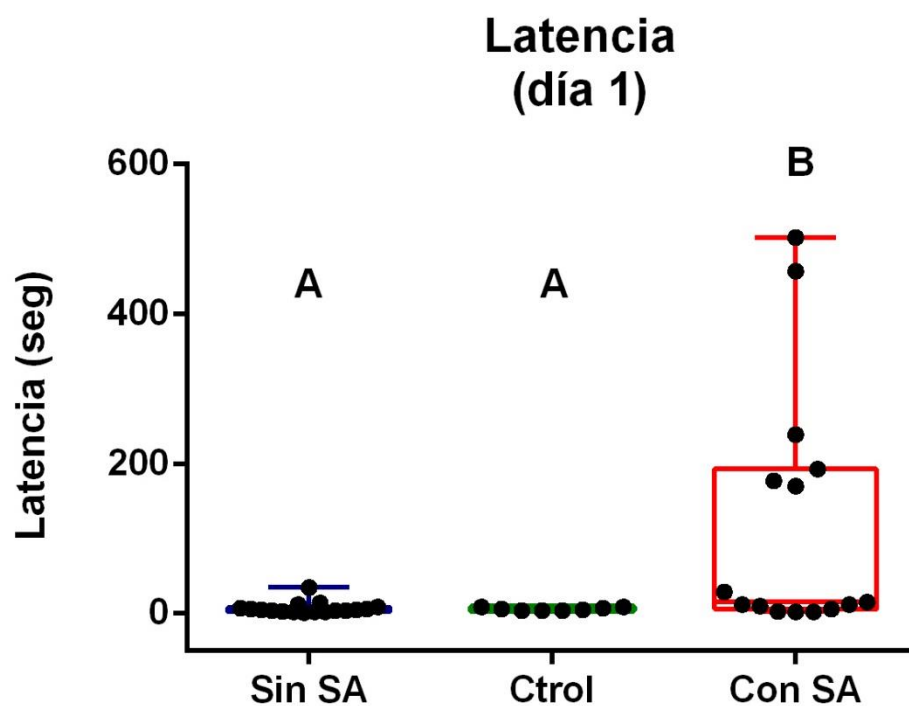


Figura 11. Efecto de la sustancia de alarma sobre la latencia en encuentros agonísticos. Se registró la latencia en el primer día de contienda y se tuvieron en cuenta todos los encuentros, independientemente del estado reproductivo de las hembras. Letras diferentes representan diferencias significativas (p valor = 0,01474). Sin SA: sin sustancia de alarma ni flujo de agua. Ctrol: con flujo de agua. Con SA: con sustancia de alarma.

En cuanto al tiempo de agresión, no se observan diferencias significativas entre los tres grupos experimentales (Sin SA: mediana = 43 s; RI = 73; N = 17; Ctrol: mediana = 105 s; RI = 223,25; N = 8; Con SA: mediana = 86 s; RI = 265; N = 15; p -valor = 0,3474) (Figura 12).

Estos resultados sugieren que la agresividad en hembras no se ve modificada por el agregado de sustancia de alarma ni por el flujo de corriente utilizado como vehículo.

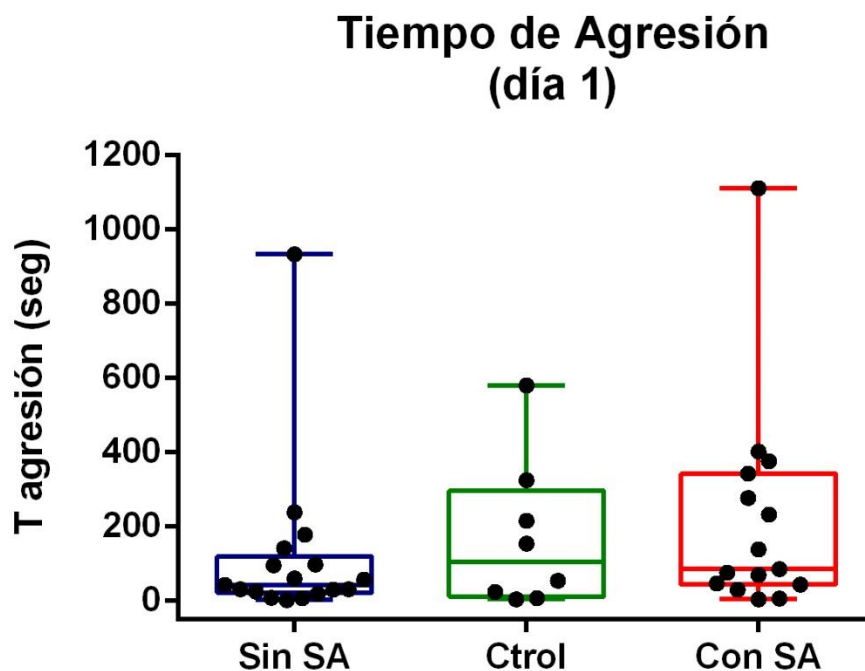


Figura 12. Efecto de la sustancia de alarma sobre el tiempo de agresión en encuentros agonísticos. Se cuantificó el tiempo de agresión en el primer día de contienda. No se hallaron diferencias en la agresividad de las hembras debido a la presencia de sustancia de alarma en el agua (p global = 0,3474). Sin SA: sin sustancia de alarma ni flujo de agua. Ctról: con flujo de agua. Con SA: con sustancia de alarma

4.6 Agresión en encuentros agonísticos sucesivos en presencia de sustancia de alarma

Con el objetivo de determinar si la agresión territorial en hembras se ve modificada en encuentros sucesivos en presencia de sustancia de alarma, se comparó la latencia (Figura 13) y el tiempo total de agresión (Figura 14) entre el primer y el segundo día de contiendas luego del agregado de la sustancia de alarma. Para ambas variables se realizó un test no paramétrico de Wilcoxon para pruebas pareadas, de modo tal de poder comparar cada pareja de contrincantes entre el primer y segundo encuentro.

No se encontraron diferencias para la latencia entre los días sucesivos de pelea (día 1: mediana = 15 s; RI = 177; N = 15; día 2: mediana = 65 s; RI = 168,5; N = 15; p -valor = 0,7197),

lo cual sugiere que la motivación por iniciar una contienda en presencia de sustancia de alarma no se ve modificada en encuentros sucesivos (Figura 13).

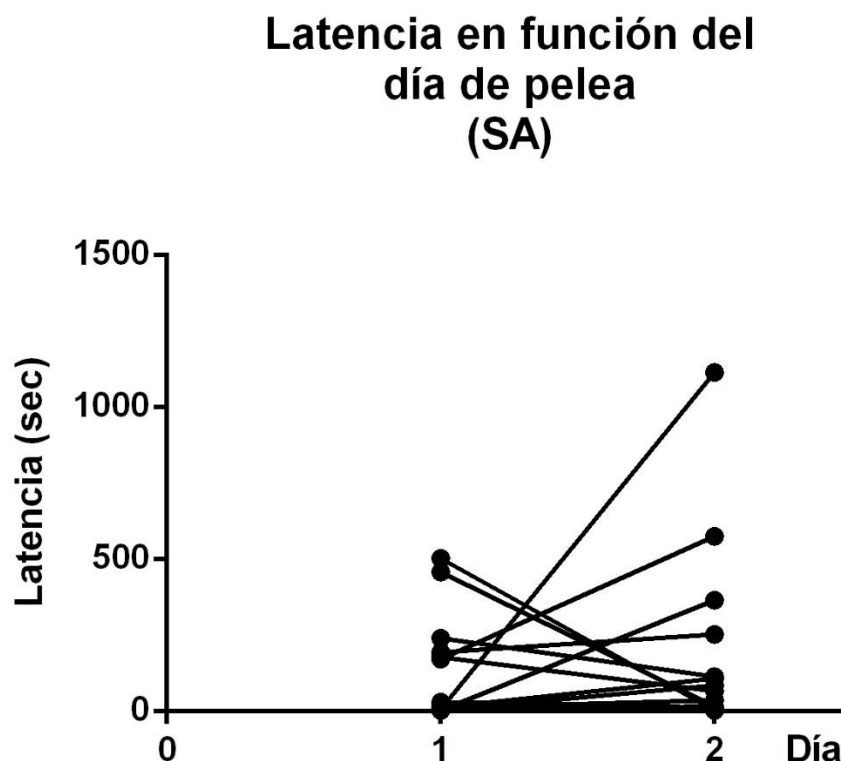


Figura 13. Latencia en función del día de contienda, para hembras tratadas con sustancia de alarma. Cada punto representa una pelea y las líneas conectan aquellas pareadas entre las mismas contrincantes. No se encontraron diferencias significativas en la latencia de los encuentros en días sucesivos, por lo que la sustancia de alarma no modifica la dinámica temporal de las contiendas en días sucesivos. Las hembras muestran igual motivación por iniciar una pelea, siendo tratadas con sustancia de alarma ambos días ($p = 0,7197$).

Al comparar el tiempo de agresión total en los encuentros de días sucesivos, se observan diferencias significativas y una marcada disminución del tiempo de agresión en el segundo encuentro al compararlo con el primero (día 1: mediana = 86 s; RI = 265; N = 15; día 2: mediana = 40 s; RI = 39,5; N = 15; p-valor = 0,01245).

De este modo, a diferencia de lo observado en la sección 4.4 en ausencia de sustancia de alarma, el tiempo de agresión total de las contiendas en presencia de sustancia de alarma se

ve modificado en los encuentros sucesivos, ya que en este caso las contiendas del segundo día son significativamente menos agresivas que las del primer día (Figura 14).

Tiempo de agresión en función del día de pelea (SA)

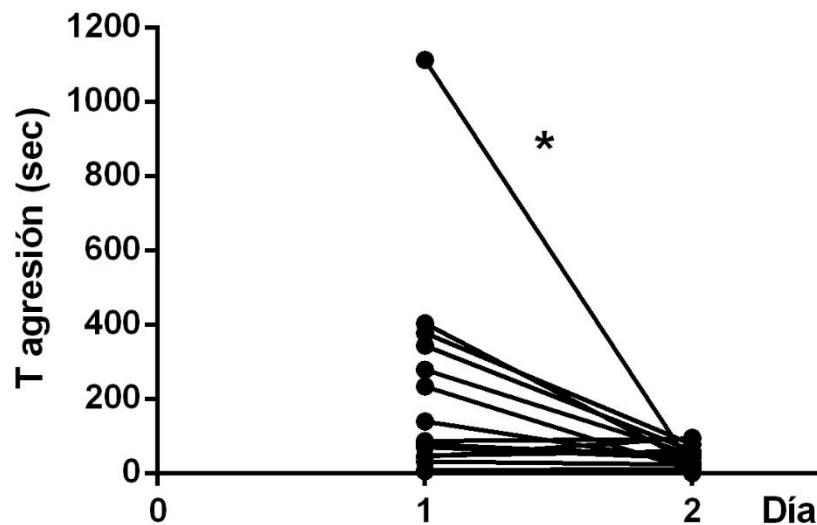


Figura 14. Tiempo de agresión en función del día de contienda, para hembras tratadas con sustancia de alarma. Cada punto representa una pelea y las líneas conectan aquellas pareadas entre las mismas contrincantes. Se encontraron diferencias significativas en la agresión de los encuentros con sustancia de alarma en días sucesivos Disminuye la agresión al segundo día de pelea cuando las hembras son tratadas con sustancia de alarma ($p = 0,01245$).

4.7 Histología de epidermis

Con el objetivo de localizar y visualizar a las *club cells* en el lote de individuos utilizados para realizar esta tesis, se realizaron cortes histológicos transversales de secciones del cuerpo de hembras prepuesta *D. rerio*. En dichos cortes se lograron observar células en la epidermis que

se corresponden histológicamente con las *club cells* ya descritas para pez cebra. Las *club cells* se identifican como células grandes circulares, con abundante cantidad de citoplasma y un núcleo central (Figura 15). Las células epidérmicas, que se encuentran circundantes a las *club cells* se distinguen por ser de menor tamaño y tener una relación de proporciones menor entre el núcleo y el tamaño total de la célula, respecto a las *club cells*, donde el núcleo es pequeño en relación al tamaño total de la célula. Además, en estos cortes se pueden observar células mucosas, que son PAS positivas debido a su contenido rico en glucoconjugados neutros. Consecuentemente, si bien las células mucosas tienen un tamaño celular grande y similar al de las *club cells*, se colorean de un magenta intenso con esta técnica y se distinguen intercaladas con las *club cells* en la epidermis de *D. rerio*. Estos tres tipos celulares se pueden evidenciar en los detalles epidérmicos de pez cebra, tanto en la epidermis de pared del cuerpo en secciones del tronco (Figura 15, A y D), como incluso también en la epidermis de la cabeza a la altura de las branquias (Figura 15, B y C), en cortes transversales de cabeza.

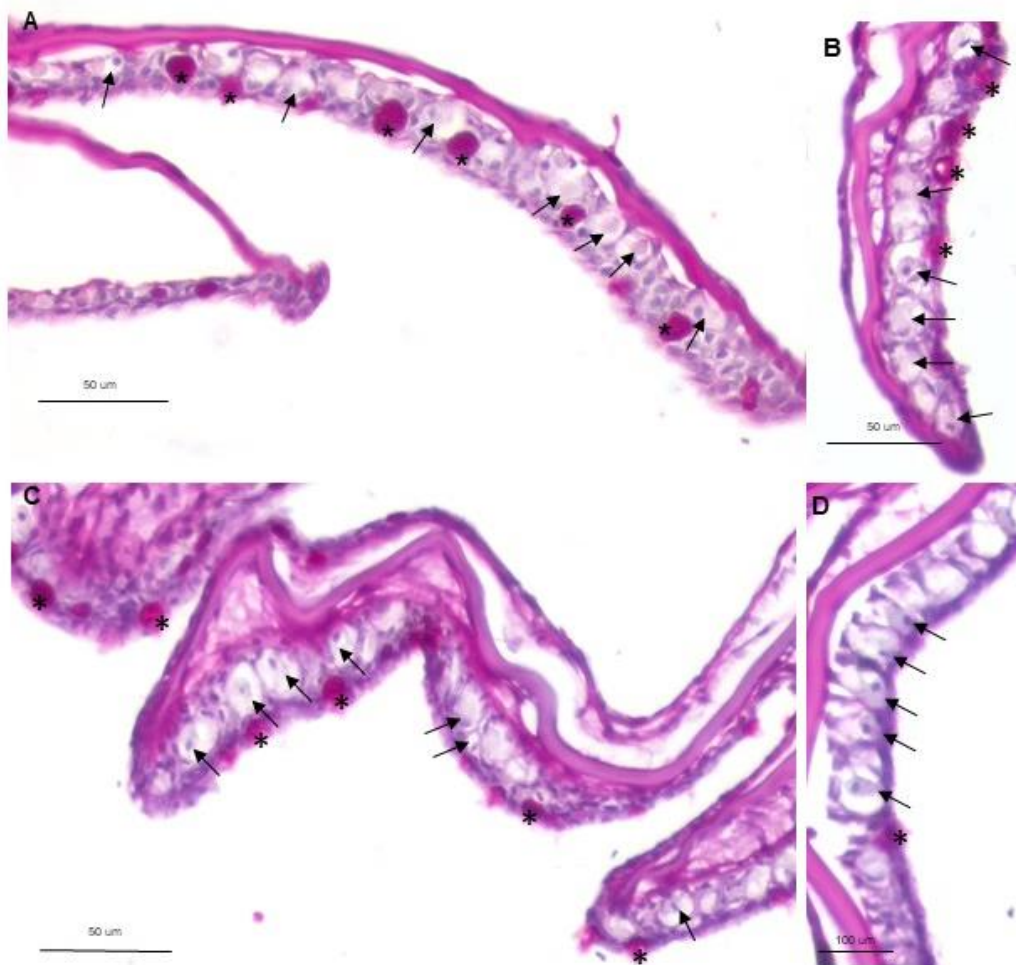


Figura 15. Detalle de epidermis de hembra prepuesta de *Danio rerio*. A) Epidermis de pared del cuerpo en una sección del tronco. Coloración: PAS. B) Epidermis en cabeza a la altura de las branquias. Coloración: PAS. C) Epidermis en cabeza a la altura de las branquias. Coloración: PAS y verde luz. D) Epidermis de pared del cuerpo en una sección del tronco. Coloración: PAS y verde luz. Las flechas indican *club cells* y los asteriscos (*) células mucosas.

4.8 *Freezing* en los encuentros agonísticos

4.8.1 *Freezing* en función del estado reproductivo

Como fue detallado en la introducción, el cortisol constituye la principal hormona de estrés y se ha observado un aumento de los niveles de esta hormona y de *freezing* en individuos expuestos individualmente a la sustancia de alarma. El *freezing* fue medido en primera instancia en los encuentros donde se añadió sustancia de alarma, debido a que se observó que las contrincantes pasaban gran parte de la pelea realizando este comportamiento. Luego, en función de haber analizado el *freezing* en los encuentros con sustancia de alarma, resultó correcto analizar qué pasaba con esta variable comportamental en los distintos estados reproductivos (Prep y PostP), tanto como en días sucesivos de encuentros agonísticos en las contiendas donde no se añade sustancia de alarma.

Se compararon los distintos estados reproductivos mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon y no se obtuvieron diferencias significativas indicando que el *freezing* no difiere entre hembras de *D. rerio* de distintos estados reproductivos (PreP: mediana = 121 s; RI = 692,5; N = 9; PostP: mediana = 0 s; RI = 24,5; N = 5; p-valor = 0,1933). Sin embargo, al observar los datos se identifica una mayor dispersión en los encuentros entre hembras prepuesta (Figura 16).

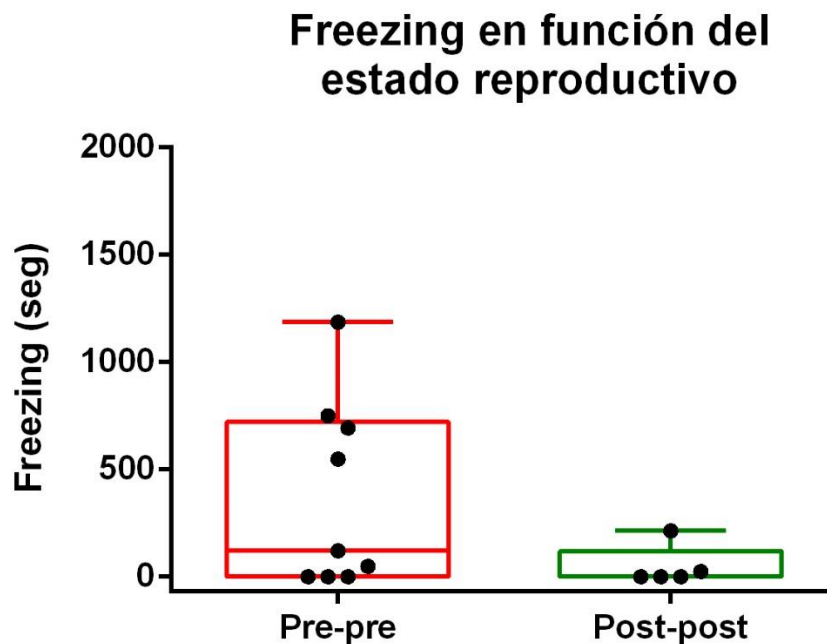


Figura 16. *Freezing* en el primer día de contienda en función del estado reproductivo de las hembras que se enfrentan. No hay diferencias en el *freezing* de las peleas entre hembras prepuesta de aquellas entre hembras postpuesta ($p = 0,1933$).

Debido a que no se encontraron diferencias en el tiempo de *freezing* entre contiendas de distintos estados reproductivos, para los siguientes análisis se consideraron todas las peleas en conjunto sin distinguir por estado reproductivo.

4.8.2 *Freezing* en encuentros agonísticos sucesivos

Considerando que el cortisol es la principal hormona de estrés y que este, a su vez, se ve reflejado en una respuesta comportamental de *freezing*, como una posible variable para caracterizar estrés ocasionado por los encuentros agonísticos sucesivos entre hembras de *D. rerio*, se comparó el tiempo en que las hembras realizaban el comportamiento de *freezing* en las contiendas pareadas de los días sucesivos (Figura 17). Al comprar el tiempo de *freezing* utilizando un test de Wilcoxon para pruebas pareadas no se obtuvieron diferencias significativas para esta variable en función del día (día 1: mediana = 24,5 s; RI = 521,5; N = 17; día 2: mediana = 27 s; RI = 110; N = 17; p -valor > 0,999). Estos resultados muestran que las hembras no

presentan niveles diferenciales de *freezing* en peleas realizadas en días sucesivos, sugiriendo que los niveles de estrés no se verían alterados en encuentros sucesivos.

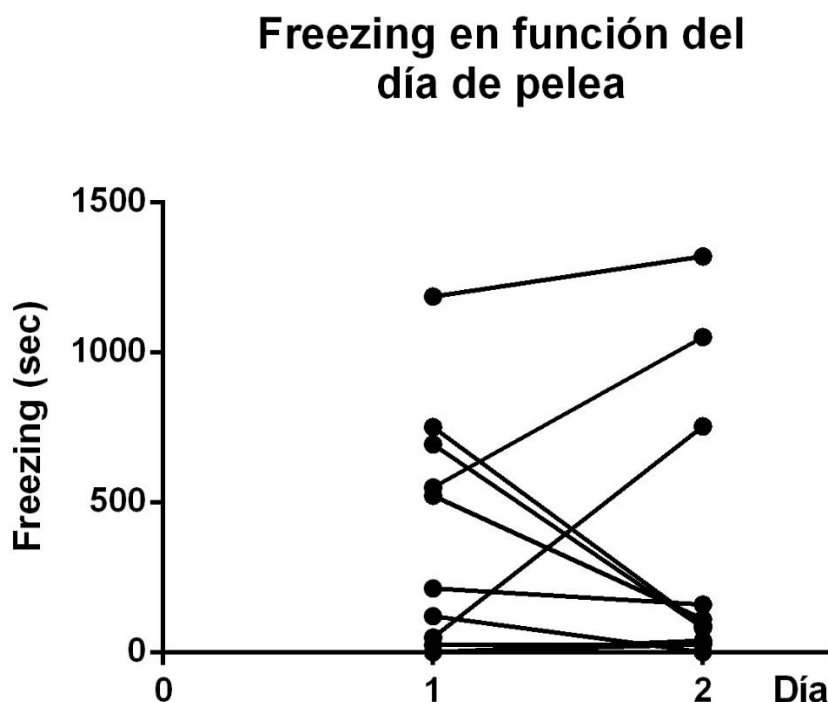


Figura 17. *Freezing* en cada una de las contiendas pareadas, en días sucesivos. Se tuvieron en cuenta todos los encuentros, independientemente del estado reproductivo de las hembras. Cada punto representa una pelea y las líneas conectan aquellas pareadas entre las mismas contrincantes. No se encontraron diferencias significativas en el tiempo de *freezing* de las contiendas en días sucesivos ($p > 0,999$).

4.8.3 *Freezing* en función de la sustancia de alarma

Se comparó el tiempo de *freezing* entre contiendas sin ningún tipo de tratamiento (sin SA), contiendas control, donde al agua de la pecera se añadió agua filtrada (Ctrol) y contiendas donde se añadió sustancia de alarma al agua de la pecera (con SA) mediante un test de Kruskal-Wallis. Existen diferencias en el *freezing* global de las contiendas (promedio del *freezing* de ambas hembras involucradas en una contienda), entre los distintos tratamientos (Sin SA:

mediana = 24,5 s; RI = 521,5; N = 17; Ctról: mediana = 288,75 s; RI = 342; N = 8; Con SA: mediana = 550,5 s; RI = 667,75; N = 15; p-valor = 0,022) (Figura 18).

Para saber cuáles son los tratamientos que difieren en su tiempo de *freezing* global se realizaron comparaciones a posteriori con el método de Holm. Hay diferencias entre las peleas de hembras tratadas con sustancia de alarma (con SA) y aquellas de hembras sin tratar (sin SA), en cuanto a sus niveles de *freezing* ($p = 0,024$). Sin embargo, al hacer los contrastes con el control realizado con agua se obtuvo que éste no muestra diferencias significativas respecto a las hembras tratadas con SA ($p = 0,338$), como así tampoco con las sin tratar ($p = 0,338$). Cabe destacar que, a pesar de no encontrarse diferencias significativas entre el grupo con SA y el grupo control, este último muestra una mediana y un rango intercuartílico menor que el grupo tratado con SA. Estos resultados sugieren que, si bien el agregado de SA induce un aumento de *freezing* al comparar con los encuentros sin SA, sería necesario aumentar el número de peleas control que es considerablemente menor a los otros grupos ya que probablemente así se logre disminuir la variabilidad en este grupo.

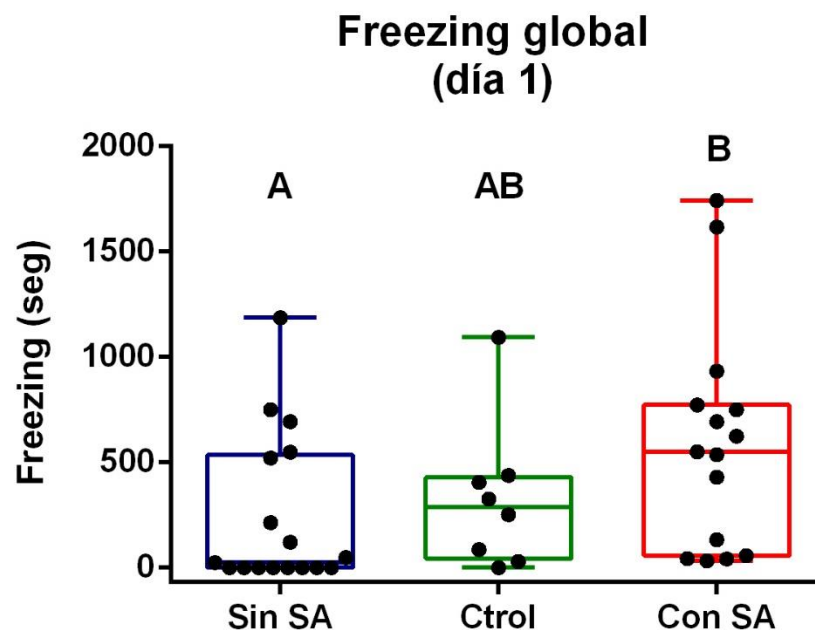


Figura 18. *Freezing* en función de los distintos tratamientos, contienda sin sustancia de alarma (Sin SA), control (Ctról) y con sustancia de alarma en el agua de la pecera (Con SA). Se registró el *freezing* en el primer día de pelea y se tuvieron en cuenta todos los encuentros, independientemente del estado reproductivo de las hembras. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p = 0,022$).

Por otro lado, para determinar qué sucede con el tiempo de *freezing* global de las contiendas en días sucesivos al añadir sustancia de alarma a la pecera se comparó este tiempo en encuentros pareados, entre el día 1 y día 2 de contienda, teniendo en cuenta los enfrentamientos de todos los estados reproductivos (Figura 19).

Al comprar el tiempo de *freezing* utilizando un test de Wilcoxon para pruebas pareadas no se obtuvieron diferencias significativas para esta variable en función del día (día 1: mediana = 550,5 s; RI = 667,75; N = 15; día 2: mediana = 775,5 s; RI = 1393,5; N = 15; p-valor = 0,0946). Las hembras no muestran niveles diferenciales de *freezing* en encuentros realizados en días sucesivos al añadir sustancia de alarma a la pecera en ambos días, por lo que no se ven diferencias en este aspecto respecto a los encuentros realizadas sin sustancia de alarma (Figura 17).

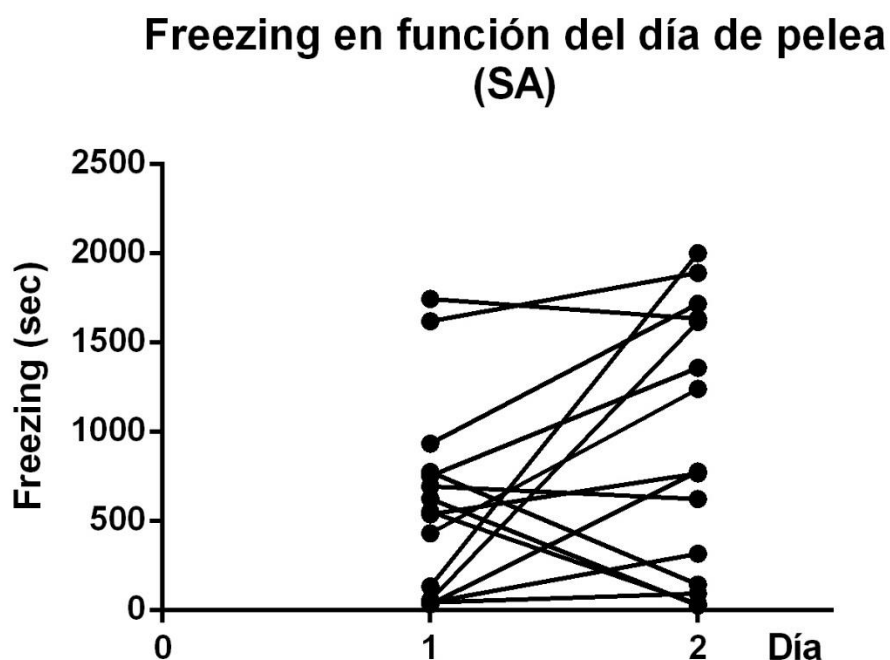


Figura 19. *Freezing* en cada una de las contiendas pareadas en días sucesivos, tratadas con sustancia de alarma. Cada punto representa una pelea y las líneas conectan aquellas pareadas entre las mismas contrincantes. No se encontraron diferencias significativas en el tiempo de *freezing* de los encuentros en días sucesivos ($p = 0,0946$).

4.9 Histología de cerebro

Los cortes transversales de cabeza permitieron tener una visualización topográfica del cerebro de *Danio rerio*, como así también, de la epidermis (Figura 20). Si bien, en un futuro se utilizaran cortes transversales de cabeza para analizar la activación cerebral de las distintas áreas que conforman el cerebro social en hembras expuestas a contiendas agresivas, en este trabajo se obtuvieron cortes con el propósito de visualizar la presencia de *club cells* también en la epidermis dorsal de cabeza. En el detalle de la figura (Figura 20, B) se identifican *club cells* que coinciden con la morfología mencionada para estas células en la sección 4.7.

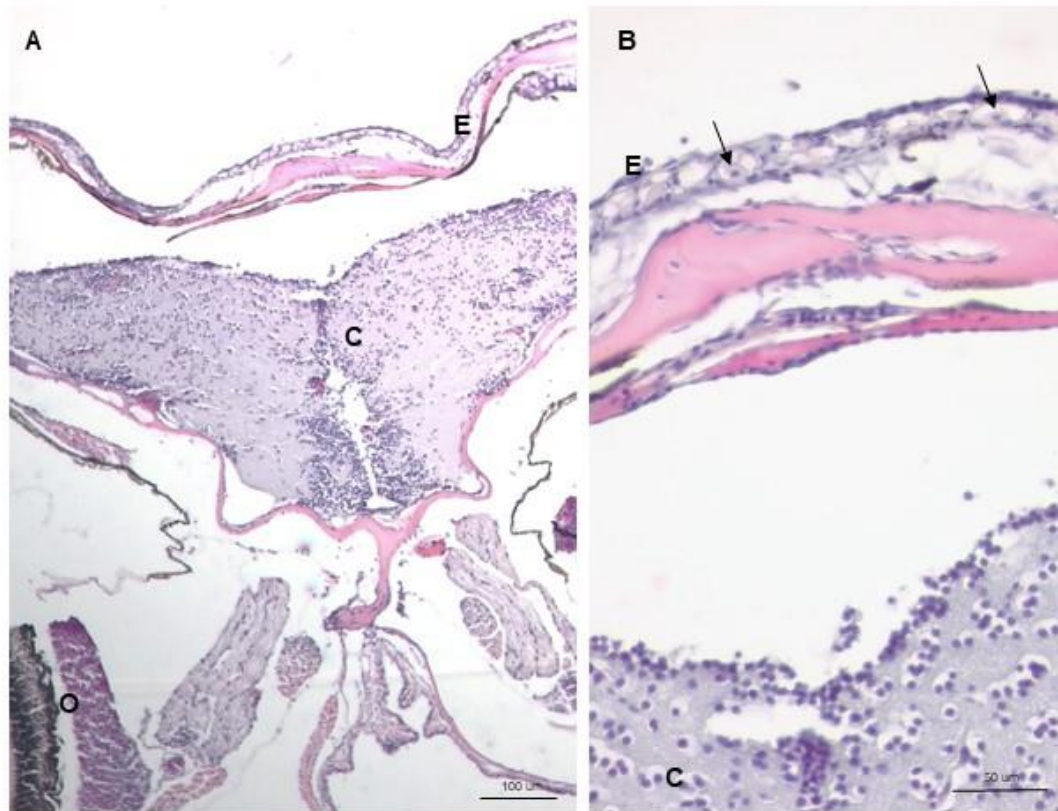


Figura 20. Cortes histológicos de cabeza. A) Corte transversal de cabeza. Coloración: H&E. B) Detalle de corte transversal de cabeza. Coloración: H&E. E= epidermis, C= cerebro, O= ojo. Las flechas indican *club cells* presentes en la epidermis.

5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Este estudio tiene particular relevancia dentro del paradigma de estudios comportamentales actuales, donde la mayoría de los estudios de agresión realizados son en machos (Cavallino et al. 2020; Madeira y Oliveira, 2017; Oliveira et al. 2011; Paull et al. 2010), aún incluso en una especie ampliamente utilizada como modelo experimental, como lo es *D. rerio*. Por otro lado, muestra cómo son las dinámicas temporales y agonísticas en un paradigma de agresión territorial entre hembras, en las que la agresión ha sido habitualmente relacionada a cuestiones reproductivas o de cuidado parental. Por lo tanto, este estudio brinda información novedosa sobre los comportamientos agresivos en hembras en un territorio neutral en ausencia de recursos como pareja o crías, es decir no relacionados a comportamientos sexuales o parentales, y pretende sentar las bases para continuar en esta línea de investigación, generando un nexo entre lo que ocurre comportamentalmente y su correlato en las distintas áreas que conforman el cerebro social. En lo que respecta a la sustancia de alarma, no se había estudiado hasta este momento el efecto de esta sobre un comportamiento agonístico. La mayoría de los trabajos que estudian el efecto de la sustancia de alarma sobre el comportamiento, lo hacen en un contexto individual y no sobre comportamientos sociales, como lo son los encuentros diádicos en este caso.

La agresión está regulada por múltiples factores (Filby, et al. 2010; Singh et al. 2007) y los estudios en laboratorio dilucidaron algunas de las bases neuronales y genéticas de estos comportamientos (Anderson, 2012; Asahina, 2017; Nelson, 2006). También hay distintas hormonas implicadas en la regulación de los comportamientos agresivos, incluyendo las involucradas en el eje reproductivo hipófisis-hipotálamo-gonadal (Filby, et al. 2010). En este sentido, no solo los andrógenos incrementan los niveles de agresión, sino que dependiendo de la especie también los estrógenos tienen un rol central regulando este comportamiento (Huffman et al. 2013; Payne y Swanson, 1972; Rubenstein y Wikelski, 2005; Scaia et al. 2018b, 2023; Vandenberg, 1971; Woodley y Moore, 1999). Por otro lado, la agresión territorial por fuera del periodo reproductivo fue reportada en varias especies inclusive en peces (Hau et al. 2004; Jalabert et al. 2015; Jasnow et al. 2000; Logan y Wingfield 1990). Durante este período las hormonas sexuales sintetizadas por las gónadas son muy bajas, como así los niveles circulantes de estas (Hau et al. 2004; Logan y Wingfield 1990; Soma et al. 2008a). Considerando el rol fundamental de las hormonas sexuales como moduladoras del comportamiento de agresión, y teniendo en cuenta que los niveles de hormonas sexuales varían entre los distintos

estados reproductivos siendo mayores en las hembras prepuesta, esto nos llevó a esperar diferencias en la agresión relacionadas al estado reproductivo.

En base a lo expuesto, el primer resultado que llama la atención es que no se observen diferencias en la agresión ni en la motivación por iniciar una contienda (latencia) entre los distintos estados reproductivos de las hembras de *D. rerio*. Inicialmente se esperaba una mayor agresión por parte las hembras prepuesta al comparar las contiendas con las de hembras postpuesta. En otras especies, como por ejemplo *C. dimerus*, sí se encontraron diferencias entre hembras en distintos estados del ciclo reproductivo respecto a parámetros comportamentales relacionados con la agresión, ya que al evaluar un paradigma de residente/intruso las hembras en estado de prepuesta mostraron mayores niveles de mordidas y persecuciones que las hembras en estado de postpuesta, que se encuentran al cuidado de huevos o larvas (Tubert et al. 2012). Sin embargo, la diferencia entre *D. rerio* y *C. dimerus* en cuanto al rol de los distintos estados reproductivos para comprender los niveles de agresión podría tener varias aristas a analizar. Por un lado, las diferencias entre ambas especies en cuanto a cuidados parentales y comportamientos reproductivos son cruciales, ya que mientras *C. dimerus* es una especie monógama y con alto grado de cuidados parentales (Pandolfi et al. 2009), *D. rerio* es una especie no monógama que no posee cuidados parentales (Spence et al. 2007), y esto podría afectar en la importancia y el rol de los esteroides plasmáticos regulando el comportamiento de agresión. Aunque en este trabajo se evaluó la agresión territorial en ausencia de crías, y muchas veces los niveles de agresión suelen relacionarse con el cuidado de las mismas y de los huevos, igualmente los esteroides sexuales plasmáticos podrían tener un papel importante en la regulación de este tipo de agresión. Por otra parte, cabe destacar también que los experimentos llevados a cabo en esta tesis se realizaron en un contexto etológico de arena neutral para evaluar exclusivamente la agresión territorial neutral, mientras que la evidencia reportada en *C. dimerus* refiere a la agresión de hembras residentes en distintos estados reproductivos hacia hembras intrusas (paradigma residente/intruso), por lo que también podría existir una diferencia en el valor o recompensa que representa el recurso territorio en ambos paradigmas etológicos.

Dado el contexto en el que se realizan estas contiendas (encuentros diádicos, donde no hay involucrado un macho ni otros recursos más allá del territorio), podríamos pensar que la agresión observada no se relaciona con cuestiones reproductivas. Esto podría indicar que las diferencias hormonales en los distintos estados reproductivos no estarían modulando los

comportamientos agresivos, mostrando de esta forma que las hembras de distintos estados reproductivos se comportan de forma similar, sin embargo, serían necesarios otros estudios para determinarlo. Las hormonas sexuales no son únicamente sintetizadas en gónadas, sino que la agresión podría deberse a precursores de hormonas esteroideas sintetizadas por órganos periféricos y que son convertidas a esteroides bioactivos en el cerebro (Soma et al. 2008b) o que son directamente sintetizadas *de novo* en el cerebro a partir de colesterol, independientemente de las gónadas y otros tejidos (Pradhan et al. 2010; Soma et al. 2008b; Tsutsui et al. 2000). En machos, los estrógenos sintetizados en cerebro tienen un rol principal en la regulación de la agresión no reproductiva, como lo sería en este caso (Demas et al. 2007; Soma et al. 2000; Tsutsui y Yamazaki 1995). Además, estudios muy recientes en peces han remarcado la importancia de la síntesis local de esteroides sexuales en cerebro mediante estudios de transcriptómica y evaluando el rol de distintas enzimas en la modulación de la agresión y estatus social fuera del estado reproductivo (Eastman et al. 2020). En futuros estudios se podría determinar si estos encuentros agonísticos son modulados por niveles cerebrales de hormonas esteroideas, y si estos niveles son equiparables entre los distintos estados reproductivos de las hembras, lo que explicaría que se comporten de forma similar en un contexto de agresión territorial.

En los cortes histológicos de ovarios se observó lo esperado. Se encontraron oocitos en distintos estados de desarrollo, y se encontraron todos los estadios de la oogénesis siguiendo lo observado por Koç et al. (2008). Se identificaron oocitos pre vitelogénicos de pequeño tamaño, con citoplasma basófilo y homogéneo, y oocitos en distintos estadios de la vitelogénesis, con un núcleo central y citoplasma levemente basófilo, presentando alveolos corticales, y tamaño variable pero mayores que los oocitos pre vitelogénicos. Estos dos estados predominaron en los cortes de ovarios de hembras postpuesta, encontrándose también folículos post ovulatorios y atrésicos. También se identificaron oocitos vitelogénicos tardíos, con un citoplasma acidófilo y de mayor tamaño, con gran cantidad de vitelo, siendo estos mayoría en los cortes de ovario de hembras prepuesta. Aunque, se espera que en menor cantidad, los cortes de ovarios de hembras prepuesta también presentan folículos post ovulatorios.

Cuando se analizan los parámetros comportamentales relacionados a la agresión en días sucesivos se encontró que ni la agresión total ni la latencia varían al segundo día de contiendas. En machos de esta misma especie se observó que al ser expuestos a encuentros agonísticos dos días seguidos, al segundo día la agresión de la contienda disminuye debido a que los peces

recuerdan haber peleado y recuerdan a su oponente, por lo que no resultaría adaptativo invertir una gran cantidad de energía en un encuentro agonístico muy agresivo, ya que muy probablemente la resolución sea la misma que la del día anterior. Por otro lado, si bien las contiendas en machos son menos agresivas al segundo día, no varía la latencia entre los días (Cavallino et al. 2020). En una primera instancia se esperaba que en hembras suceda lo mismo que en machos y se evidencie una disminución en la agresión. Si bien no se obtuvieron los mismos resultados que para machos, consideramos que estas diferencias no son atribuibles a diferencias entre los sexos. Además de tratarse de estudios en distintos sexos, la diferencia entre el trabajo de Cavallino et al. y este radica por un lado en el criterio utilizado para determinar las contiendas analizadas y por otro lado en el horario en el que se llevaron a cabo ambos estudios. En primer lugar, existen diferencias en el número de contiendas que culminan con una resolución clara. Una resolución clara consiste en una serie de rápidas persecuciones de la hembra que emerge como dominante, hacia la hembra subordinada, luego de los círculos ascendentes comportamientos altamente estereotipados y típicos en esta especie (Oliveira et al, 2011). Mientras que Cavallino et al. consideró para el análisis únicamente las contiendas donde se pudo evidenciar una resolución clara, con un macho ganador y uno perdedor, en este trabajo, si bien no en todas se observó escalamiento de la agresión incluyendo círculos y despliegues laterales, se consideraron todas las contiendas en las que se observó al menos un despliegue agresivo de acercamiento. Es decir si bien en todas se observó y se cuantificó la agresión como *al menos* un despliegue agresivo, que pudo haber sido solamente acercamientos o mordidas, en algunas de las contiendas entre hembras no se llegó a dar la resolución en los 30 minutos de experimento que fueron filmados o en otras se evidenció una dominancia subjetiva de alguna de las hembras, pero no en todas ellas se vio el patrón comportamental de las resoluciones descritas por Oliveira et al. (2011) en machos y por Scaia et al. (2022) en hembras. Para poder comparar con machos y establecer posibles diferencias sexuales en los encuentros sucesivos, en un futuro se podría realizar el mismo análisis teniendo en cuenta únicamente las contiendas donde se evidencia una clara resolución. Entonces, podría suceder que las diferencias entre machos y hembras no se deban al sexo, sino a una diferencia en los criterios de análisis. Aún más allá de las diferencias en el número de resoluciones de las contiendas, puede ser que las diferencias observadas se deban a que, mientras los experimentos de este trabajo se realizaron a la tarde, los analizados en Cavallino et al. (2020) se realizaron por la mañana. Esto podría ser una explicación factible para las diferencias observadas: ya se ha cuantificado la agresión y la dinámica temporal de la agresión en hembras

de esta especie en un trabajo realizado en el horario de mañana, y se observó resolución clara del conflicto social tanto en machos como en hembras de *D. rerio*, concluyéndose que ambos sexos de esta especie presentan similares grados de agresión (Scaia et al. 2022). Cabe destacar que la bibliografía menciona que existen diferencias en el número de círculos realizados (comportamiento característico del escalamiento de la agresión) entre peleas hechas a la mañana temprano, y a la mañana tardía y tarde, aunque no se encontraron diferencias entre estas dos últimas franjas horarias (Mukherjee y Bhat, 2021). Los estudios de esta tesis se realizaron en una franja temporal diferente al trabajo de Scaia et al. y Cavallino et al. debido a que los experimentos analizados en este trabajo se llevaron a cabo en el transcurso del 2021, período en el cual las restricciones para realizar trabajos de mesada eran altas, debido a la pandemia provocada por el virus SARS-CoV-2. Además, teniendo en cuenta que las franjas horarias en las cuales se pudo trabajar fueron muy limitadas, cabe destacar que se han comenzado a analizar contiendas entre hembras en encuentros sucesivos en el horario de mañana, aunque estos experimentos están aún en evaluación.

La sustancia de alarma advierte a conespecíficos de posibles peligros circundantes, debido a que es liberada al ser dañada la epidermis de los peces (Brown et al. 2000), por lo tanto, las hembras que sensan la sustancia en el agua están advirtiendo un peligro cercano. Es probable que, por esta razón, la sustancia de alarma altera el comportamiento de los peces, provocando la anteriormente mencionada “respuesta de miedo” (Egan et al. 2009; Hall y Suboski, 1995; Rehnberg y Smith, 1988). Esta respuesta incluye una gran variedad de comportamientos, entre ellos, nados erráticos y movimientos en “zig-zag” con cambios rápidos de dirección (Speedie y Gerlai, 2008). Esta respuesta se suele dar cerca del fondo de los acuarios, por lo que se hipotetizó que su función es generar turbulencias que removerían el sustrato y los sedimentos (Speedie y Gerlai, 2008). Además, esto es respaldado por el hecho de que luego de estos movimientos rápidos y erráticos, suele seguir un periodo de inmovilidad, lo que convierte a los individuos en presas difíciles de detectar. Por otro lado, trabajos previos han demostrado que en esta especie la sustancia de alarma aumenta los niveles de estrés, a través de un aumento de cortisol en circulación (Egan et al. 2009).

Al evaluar el tiempo de agresión en las contiendas, los resultados sugieren que esta sustancia no provoca grandes cambios en los niveles de agresión desplegados por las hembras. Sin embargo, la sustancia de alarma sí genera cambios en la dinámica temporal de las contiendas. En las contiendas donde se añadió sustancia de alarma al agua de la pecera se observó un

aumento en la latencia, lo que sugiere una menor motivación por iniciar la contienda. Debido a los anteriormente mencionados efectos de la sustancia de alarma sobre los peces, se podría pensar que la menor motivación por iniciar una contienda sea consecuencia directa de un mayor nivel de estrés en las hembras. Mas allá aun, teniendo en cuenta que estos resultados sugieren un aumento de la latencia, pero ningún cambio sobre los niveles totales de agresión, esto podría estar relacionado con la percepción del riesgo y la inversión energética que implica embarcarse en un comportamiento agonístico de agresión. Ya que iniciar una contienda supone un gasto energético elevado, se podría pensar que no resultaría conveniente hacerlo si se percibe un potencial peligro en el ambiente. Por lo tanto, podría ocurrir que, ante la presencia de sustancia de alarma, las hembras deciden no embarcarse inmediatamente en una contienda agresiva. De este modo, podría ser que al comprobar luego de un determinado periodo de tiempo que no hay tal peligro, se involucren en un conflicto con su contrincante, dando como resultado encuentros igualmente agresivos. Este efecto observado sobre la dinámica temporal de las contiendas puede ser atribuido específicamente a la presencia de sustancia de alarma, y no como un efecto del flujo generado al introducirla en el agua, debido a que se realizaron los controles necesarios y estos no muestran diferencias con las contiendas realizadas inicialmente sin sustancia de alarma. Luego de esta tesis se planifica continuar analizando estos videos para determinar si la sustancia de alarma tiene algún efecto sobre la cantidad relativa de cada uno de los distintos comportamientos agresivos estereotipados de *D. rerio*, evaluando los distintos despliegues comportamentales y realizando una cuantificación automática mediante el programa Ethovision. Además, en un futuro sería interesante evaluar la activación neuronal de las distintas áreas que comprenden el cerebro social conocido como Social Decision Making Network, analizando específicamente aquellas áreas involucradas en el sensado de señales químicas como los bulbos olfatorios y otras áreas de relevo relacionadas también con el estrés.

Al evaluar qué sucede en contiendas realizadas en días sucesivos en presencia de sustancia de alarma se observó que, si bien no hay diferencias en la latencia de las contiendas sucesivas, sí se observó una disminución del tiempo de agresión al segundo día de encuentros agonísticos, resultado similar a lo que se puede observar en machos (Cavallino et al. 2020). El hecho que no se observen diferencias entre días sucesivos en la latencia era de esperarse, debido a que ya en el primer día de contienda se observa una mayor latencia respecto a las contiendas control, entonces al segundo día de encuentros, cuando se volvió a añadir sustancia de alarma, seguramente la latencia siga siendo mayor en los encuentros donde se añadió sustancia de alarma. El efecto que tiene la sustancia de alarma añadida al agua sobre la latencia afecta al

comienzo de la pelea ya que genera un retraso en el inicio de la contienda posiblemente debido al sensado de un posible peligro. Sin embargo, sorprende que en el segundo día las hembras siguen respondiendo de la misma forma, aun luego de comprobar el primer día que luego de la sustancia no siguió un verdadero peligro. Podría especularse que este efecto, que se repite en ambos días de contienda, se relacione con que la sustancia de alarma estaría disparando comportamientos de naturaleza innata, por lo que, por más que el primer día las hembras comprueben que luego de la sustancia de alarma no sigue ningún peligro real, al segundo día, momento para el cual ya experimentaron estas circunstancias, no reaccionen de forma distinta, mostrando igual latencia en contiendas sucesivas. Sin embargo, esta hipótesis es meramente una posibilidad de muchas que podría haber para explicar este comportamiento. Podría ocurrir también por ejemplo que un día de exposición a la sustancia de alarma no sea suficiente para generar un aprendizaje y una memoria que provocaría una respuesta distinta en el segundo día de contienda, y por lo tanto se deberían hacer otros experimentos para probar la naturaleza de esta respuesta.

Por otro lado, al proporcionar sustancia de alarma antes de iniciar la contienda en días sucesivos se observa que al segundo día de contienda hay una disminución de la agresión global de la contienda. Este efecto puede deberse a que la sustancia de alarma se relaciona con los niveles de estrés y de cortisol (Barreto et al. 2014). Por lo tanto, en este caso un aumento de los niveles de estrés en las hembras y la exposición en dos días sucesivos a la sustancia de alarma podría ocasionar un efecto acumulado de la misma sobre la agresión. Por lo tanto, se puede pensar que, al segundo día de tratamiento, los niveles de estrés en las hembras pueden ser aún más altos por lo que invierten más tiempo en otro tipo de comportamientos, como *freezing*, exploraciones del acuario y rápidos barridos de fondo o movimientos frenéticos, que en comportamientos agresivos. De este modo, la disminución del tiempo de agresión en el segundo encuentro agonístico podría deberse a la acumulación del efecto provocado por la sustancia de alarma y a un aumento significativo del estrés, lo cual debería ser confirmado mediante la medición de cortisol en circulación o en homogenatos. En principio, no se puede afirmar que esta disminución del tiempo de agresión al segundo día de contiendas esté relacionada con la memoria asociada a la experiencia de haber participado en una contienda el día anterior, como se observó en el trabajo de Cavallino et al. (2020). Si este fuese el caso, se esperaría también que haya una disminución en el tiempo de agresión al segundo día de contienda en los enfrentamientos en los que no se añadió sustancia de alarma al agua de la pecera. Podría pensarse también que esta disminución de la agresión al segundo día de

contiendas en presencia de sustancia de alarma se deba a que en estos experimentos pudo haber un mayor porcentaje de encuentros con resolución de conflicto clara. Si este fuese el caso, al haber una mayor proporción de resoluciones claras en el primer día, se podría pensar que las contrincantes recuerden su estatus de ganadora y perdedora y así decidan no embarcarse en una segunda contienda al día siguiente debido al gasto energético que supone un encuentro agonístico, como ocurre en machos en ausencia de sustancia de alarma (Cavallino et al. 2020). Sin embargo, el hecho que la agresión disminuya en el segundo día de las contiendas en presencia de sustancia de alarma, no se relaciona con que haya un mayor porcentaje de resoluciones claras, (criterio necesario en las peleas de machos analizadas por Cavallino et al. 2020), debido a que tanto las contiendas con, como en las contiendas sin sustancia de alarma hubo un alto porcentaje de encuentros sin resolución clara (ver Figura Anexo 1 y 2). Este alto porcentaje de contiendas sin resolución se podría deber, como se discutió previamente, al horario en que fueron realizadas las peleas. Por lo tanto, la disminución del tiempo de agresión al segundo día de encuentros agonísticos en presencia de sustancia de alarma, pero no así en ausencia de la misma, podría estar relacionado con un efecto de acumulación de la sustancia y a que los individuos dediquen más tiempo a realizar otro tipo de comportamientos como *freezing* (discutido a continuación), movimientos erráticos relacionados al comportamiento de ansiedad, y toques de fondo o de superficie.

Al evaluar el *freezing*, se quiso comparar qué sucedía con esta variable comportamental en contiendas en presencia y ausencia de sustancia de alarma, debido a que en trabajos anteriores se observó que el *freezing* aumenta en situaciones de estrés (Egan et al. 2009; Rehnberg y Smith, 1988), y que, además, se asoció a la sustancia de alarma como un factor capaz de generar un aumento en el estrés del animal a través de un aumento del cortisol en circulación (Egan et al. 2009). Para hacer estas comparaciones, en primera instancia, se analizó si existen diferencias en el *freezing* en función del estado reproductivo. Se encontró que las hembras de *D. rerio* no responden de manera diferente a la sustancia de alarma según el estado reproductivo, y lo mismo se observó en las contiendas donde no se añadió sustancia de alarma. Es decir, en ambos casos no se observaron diferencias en el *freezing* entre las contiendas de hembras prepuesta y postpuesta, sugiriendo que no habría diferencias en el comportamiento relacionado al estrés entre ambos estados reproductivos evaluados en este contexto etológico. Por lo tanto, en contiendas con sustancia de alarma, como en contiendas sin sustancia de alarma, para los siguientes análisis se decidió analizar todos los estados reproductivos en

conjunto. Esto permite obtener resultados comparables entre las contiendas con y sin sustancia de alarma.

Cuando comparamos días sucesivos de contienda no encontramos diferencias en el *freezing* entre el primer y el segundo día de contienda, ni para las contiendas sin sustancia de alarma, ni para las contiendas realizadas en presencia de sustancia de alarma. El resultado obtenido para las contiendas sin sustancia de alarma no resulta sorprendente debido a que no se espera que haya ningún factor estresante más allá de la contienda en sí misma, por lo que no resulta llamativo que el *freezing* ocasionado por la experiencia agonística sea similar en ambos días de encuentros. Sin embargo, es un resultado interesante ya que también podría haber sucedido que una interacción agonística al segundo día suponga un estrés mayor, debido a que los individuos ya estuvieron expuestos a una experiencia que involucra un gasto muy grande de energía el día anterior, especialmente en el caso de las hembras que resultan subordinadas en el primer día de contienda. Quizá sería informativo analizar el *freezing* de cada una de las hembras individualmente, distinguiendo por el estatus social. Podría suceder que, para las hembras dominantes del primer día, la agresión durante un segundo encuentro no les resulte una experiencia más estresante. En cambio, sí podría serlo para las subordinadas. Si este fuese el caso, el efecto sobre el *freezing* de cada una de las hembras contrincantes quedaría enmascarado por analizar el *freezing* global de los encuentros sucesivos.

Como se mencionó en las distintas secciones a lo largo de esta tesis, el *freezing* se encuentra estrechamente relacionado con los altos niveles de estrés (Egan et al. 2009). Como la sustancia de alarma desencadena en los conoespecíficos una “respuesta de miedo” por ser indicadora de posibles predadores o peligros circundantes, era esperable que en las hembras tratadas con sustancia de alarma el *freezing* sea mayor respecto a las hembras sin tratar, debido a que este comportamiento forma parte de esta “respuesta de miedo” (Gerlai et al. 1990; Gerlai et al. 2000; Miklósi et al. 1997; Pfeiffer, 1977). Además, se puede pensar también que el comportamiento de permanecer completamente inmóviles resulta una respuesta adaptativa frente a la presencia de posibles peligros ya que, de esta forma, los individuos podrían intentar evitar que depredadores los sensen a través de la línea lateral. No obstante, si bien se encontraron estas diferencias entre las hembras tratadas y las sin tratar con sustancia de alarma, los controles no mostraron resultados tan claros. No podría descartarse que parte del efecto observado sobre el *freezing* en las hembras tratadas con sustancia de alarma se deba al flujo generado al introducirla en el agua de las peceras, debido a que los controles realizados con agua no difieren

de las hembras tratadas. Por otro lado, las hembras control, tampoco muestran diferencias respecto a las hembras sin tratar con sustancia de alarma ni flujo alguno, por lo tanto, los resultados observados podrían deberse al bajo número de contiendas control, en comparación con el número de las demás contiendas, teniendo así la prueba estadística menor potencia. Cabe destacar que sería necesario aumentar el número de los experimentos control, con el fin de determinar si el efecto observado sobre el *freezing* de las hembras se debe específicamente a la introducción de sustancia de alarma y a la inducción de la respuesta de miedo por parte de esta.

Por otro lado, el hecho que no se observen diferencias en el *freezing* en días sucesivos en las contiendas en presencia de sustancia de alarma, sugiere que la sustancia de alarma no tiene un efecto acumulativo sobre el estrés de las hembras. Este resultado resulta sorprendente, ya que teniendo en cuenta que en presencia de sustancia de alarma en la segunda contienda se observa una disminución del tiempo de agresión se esperaba que esto esté relacionado a un aumento concomitante del tiempo de *freezing*. Sin embargo, cabe también destacar que, si bien está reportado que la exposición a sustancia de alarma provoca un aumento del tiempo de *freezing* en esta especie al compararlo con el control, esto es en una exposición aguda de 6 min. mientras que en una exposición prolongada de 30 min. no se registró ningún aumento (Egan et al. 2009). En este sentido, se debe recalcar la importancia de evaluar el *freezing* individualmente en cada contrincante, además de destacar la complejidad en la interpretación del tiempo de exposición a esta sustancia. Resultaría muy informativo evaluar otro tipo de comportamientos relacionados al estrés y la ansiedad, como por ejemplo nados erráticos, transición de la parte inferior de la pecera a la parte superior, distancia recorrida y velocidad de nado, todas variables clave para la evaluación de la ansiedad y el estrés en esta especie (Egan et al. 2009). Se podría esperar que, al segundo día de contiendas en presencia de sustancia de alarma, la disminución del tiempo total de agresión no esté necesariamente relacionada a un aumento de *freezing* pero sí a un aumento de los nados erráticos y de la velocidad de exploración de la pecera. Para ello, en un futuro cercano estos videos serán también analizados mediante el programa Ethovision.

A modo de conclusión y teniendo en cuenta lo discutido en esta sección, recordemos que al comienzo de esta tesis se planteó un objetivo general para poner a prueba la siguiente hipótesis:

“El comportamiento de agresividad y la dinámica temporal de los encuentros agonísticos en hembras de *Danio rerio* está modulado por su estado reproductivo y/o por la percepción de señales químicas de alarma.”

En particular, se plantearon dos objetivos específicos que constituyeron los hilos conductores del desarrollo de este trabajo. El primer objetivo específico planteaba la caracterización y cuantificación del comportamiento de agresividad en encuentros agonísticos sucesivos entre hembras de *Danio rerio* en estado prepuesta y postpuesta. Con relación a esto, los resultados sugieren que el comportamiento agresivo en encuentros agonísticos en días sucesivos entre hembras de *D. rerio* no es modulado por el estado reproductivo. Ni la latencia, ni el tiempo total de agresión se ven modificados por el estado reproductivo de las hembras, es decir que no hay diferencias en los comportamientos agresivos de hembras prepuesta con los de hembras postpuesta. Tampoco se observan diferencias entre los distintos días de contienda en encuentros sucesivos para estos parámetros comportamentales de agresión.

Con respecto al segundo objetivo específico, proponía determinar si la sustancia química de alarma tiene efecto en el comportamiento de agresión en encuentros agonísticos sucesivos. Los experimentos llevados a cabo en esta tesina proponen un efecto de la sustancia de alarma sobre la latencia de las contiendas, siendo mayor en presencia de ésta, aunque no se encontró ningún efecto sobre el tiempo de agresión de las contiendas. Sin embargo, al analizar días sucesivos de encuentros, el tiempo de agresión disminuye al segundo día de enfrentamiento con sustancia de alarma, aunque no así la latencia. Se utilizaron diversas coloraciones para visualizar histológicamente las *club cells* en la epidermis de las hembras de *D. rerio*, y en particular se realizó la técnica de PAS para lograr distinguir las células mucosas de las *club cells*. Por otro lado, se observó que el comportamiento de *freezing* es mayor en las contiendas en presencia de sustancia de alarma que en su ausencia, aunque estos resultados no son del todo concluyentes por el bajo número de individuos en el grupo control. El *freezing* se mantiene constante en ambos días de pelea, tanto en el grupo tratado con sustancia de alarma, como en el sin tratar.

De este modo, los resultados que surgen de esta tesina sugieren que, si bien el comportamiento de agresión en hembras y la dinámica temporal no están moduladas por el estado reproductivo en encuentros agonísticos, la percepción de la sustancia de alarma afecta

la dinámica temporal y el comportamiento de agresión en encuentros agonísticos sucesivos en hembras *D. rerio*. En vista de estos resultados, se rechaza parcialmente esta hipótesis.

6. Bibliografía

- Akinrinade, I., Kareklas, K., Gliksberg, M., Petri, G., Levkowitz, G., & Oliveira, R. F. (2021). Oxytocin regulation of social transmission of fear in zebrafish reveals its evolutionary conserved role in emotional contagion. *bioRxiv*.
- Alonso, F., Cánepa, M., Moreira, R.G. & Pandolfi, M. (2011). Social and reproductive physiology and behavior of the Neotropical cichlid fish *Cichlasoma dimerus* under laboratory conditions. *Neotropical Ichthyology*, 9(3), 559-570.
- Alonso F, Honji RM, Guimarães Moreira R, Pandolfi M. (2012). Dominance hierarchies and social status ascent opportunity: anticipatory behavioral and physiological adjustments in a Neotropical cichlid fish. *Physiology & Behavior*. Jul;106(5):612-618
- Anderson, D. J. (2012). Optogenetics, sex, and violence in the brain: implications for psychiatry. *Biol. Psychiatry* 71, 1081–1089.
- Arnott, G., & Elwood, R. (2009). Probing aggressive motivation in a cichlid fish. *Biology Letters*, 5(6), 762-764.
- Asahina, K. (2017). Neuromodulation and strategic action choice in *Drosophila* aggression. *Annu. Rev. Neurosci.* 40, 51–75.
- Bales, K. L., & Saltzman, W. (2016). Fathering in rodents: neurobiological substrates and consequences for offspring. *Hormones and behavior*, 77, 249-259.
- Barcellos, L. J. G., Ritter, F., Kreutz, L. C., Quevedo, R. M., da Silva, L. B., Bedin, A. C., ... Cericato, L. (2007). *Whole-body cortisol increases after direct and visual contact with a predator in zebrafish, Danio rerio. Aquaculture*, 272(1-4), 774–778.
- Barreto, R. E., Barbosa-Júnior, A., Urbinati, E. C., & Hoffmann, A. (2014). *Cortisol influences the antipredator behavior induced by chemical alarm cues in the Frillfin goby. Hormones and Behavior*, 65(4), 394–400.
- Been, L. E., Gibbons, A. B., & Meisel, R. L. (2019). Towards a neurobiology of female aggression. *Neuropharmacology*, 156, 107451.

- Blanco, A. M., Sundarrajan, L., Bertucci, J. I., & Unniappan, S. (2018). Why goldfish? Merits and challenges in employing goldfish as a model organism in comparative endocrinology research. *General and comparative endocrinology*, 257, 13-28.
- Bloom, H. D., & Perlmutter, A. (1977). A sexual aggregating pheromone system in the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). *Journal of Experimental Zoology*, 199(2), 215-226.
- Bouissou, M. F. (1983). Androgens, aggressive behaviour and social relationships in higher mammals. *Hormone Research in Paediatrics*, 18(1-3), 43-61.
- Breder, C.M. and D.E. Rosen, (1966). Modes of reproduction in fishes. T.F.H. Publications, Neptune City, New Jersey. 941 p.
- Brown, G. E., Adrian, J. C., Smyth, E., Leet, H., & Brennan, S. (2000). Ostariophysan alarm pheromones: laboratory and field tests of the functional significance of nitrogen oxides. *Journal of Chemical Ecology*, 26, 139-154.
- Cardinali, M., Gioacchini, G., Candiani, S., Pestarino, M., Yoshizaki, G., & Carnevali, O. (2004). Hormonal regulation of vasa-like messenger RNA expression in the ovary of the marine teleost *Sparus aurata*. *Biology of reproduction*, 70(3), 737-743.
- Castro, N., Ros, A. F. H., Becker, K., & Oliveira, R. F. (2006). *Metabolic costs of aggressive behaviour in the Siamese fighting fish, Betta splendens*. *Aggressive Behavior*, 32(5), 474–480.
- Cavallino, L., Dramis, A., Pedreira, M. E., & Pandolfi, M. (2020). Effect of previous fighting on the dynamic of agonistic encounters in zebrafish males. *Animal Cognition*, 23, 999-1006.
- Cavallino, L., Scaia, M. F., Pozzi, A., & Pedreira, M. E. (2023). Recognizing the opponent: the consolidation of long-term social memory in zebrafish males. *bioRxiv*, 2023-02
- Cavallino, L., Valchi, P., Morandini, L., & Pandolfi, M. (2019). Modulation of behavior in zebrafish, *Danio rerio*, according to female reproductive status and visual and chemical cues. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 52(1), 53-66.
- Chang, W. J., & Hwang, P. P. (2011). Development of zebrafish epidermis. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 93(3), 205-214.
- Chia, J. S. M., Wall, E. S., Wee, C. L., Rowland, T. A., Cheng, R. K., Cheow, K., ... & Jesuthasan, S. (2019). Bacteria evoke alarm behaviour in zebrafish. *Nature Communications*, 10(1), 3831.

- Chivers, D. P., Wisenden, B. D., Hindman, C. J., Michalak, T. A., Kusch, R. C., Kaminskyj, S. G., & Mathis, A. (2007). Epidermal 'alarm substance' cells of fishes maintained by non-alarm functions: possible defence against pathogens, parasites and UVB radiation. *Proceedings of the Royal Society B: biological sciences*, 274(1625), 2611-2619.
- Chou, M. Y., Amo, R., Kinoshita, M., Cherng, B. W., Shimazaki, H., Agetsuma, M., ... & Okamoto, H. (2016). Social conflict resolution regulated by two dorsal habenular subregions in zebrafish. *Science*, 352(6281), 87-90.
- Clement, T. S., Parikh, V., Schruppf, M., & Fernald, R. D. (2005). Behavioral coping strategies in a cichlid fish: the role of social status and acute stress response in direct and displaced aggression. *Hormones and behavior*, 47(3), 336-342.
- Colwill, R. M., Raymond, M. P., Ferreira, L., & Escudero, H. (2005). Visual discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural processes*, 70(1), 19-31.
- Crowder, C. M., Lassiter, C. S., & Gorelick, D. A. (2018). Nuclear androgen receptor regulates testes organization and oocyte maturation in zebrafish. *Endocrinology*, 159(2), 980-993.
- Cubitt, K. F., Winberg, S., Huntingford, F. A., Kadri, S., Crampton, V. O., & Øverli, Ø. (2008). Social hierarchies, growth and brain serotonin metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) kept under commercial rearing conditions. *Physiology & behavior*, 94(4), 529-535.
- Dahlbom, S. J., Backström, T., Lundstedt-Enkel, K., & Winberg, S. (2012). Aggression and monoamines: effects of sex and social rank in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural brain research*, 228(2), 333-338.
- Darrow, K. O., & Harris, W. A. (2004). *Characterization and Development of Courtship in Zebrafish, Danio rerio*. *Zebrafish*, 1(1), 40-45.
- Demas, G. E., Cooper, M. A., Albers, H. E., & Soma, K. K. (2007). Novel mechanisms underlying neuroendocrine regulation of aggression: a synthesis of rodent, avian, and primate studies. *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology*, 337e372.
- Desjardins, J. K., Stiver, K. A., Fitzpatrick, J. L., Milligan, N., Van Der Kraak, G. J., & Balshine, S. (2008). Sex and status in a cooperative breeding fish: behavior and androgens. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62, 785-794.

- Dewsbury, D. A. (1982). Dominance rank, copulatory behavior, and differential reproduction. *The Quarterly review of biology*, 57(2), 135-159.
- DiBattista, J. D., Anisman, H., Whitehead, M., & Gilmour, K. M. (2005). The effects of cortisol administration on social status and brain monoaminergic activity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Experimental Biology*, 208(14), 2707-2718.
- Dugatkin, L. A. (1997). Winner and loser effects and the structure of dominance hierarchies. *Behavioral Ecology*, 8(6), 583-587.
- Earley, R. L., Edwards, J. T., Aseem, O., Felton, K., Blumer, L. S., Karom, M., & Grober, M. S. (2006). Social interactions tune aggression and stress responsiveness in a territorial cichlid fish (*Archocentrus nigrofasciatus*). *Physiology & Behavior*, 88(4-5), 353-363.
- Eastman, G., Valiño, G., Radío, S., Young, R. L., Quintana, L., Zakon, H. H., ... & 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.
- Egan, R. J., Bergner, C. L., Hart, P. C., Cachat, J. M., Canavello, P. R., Elegante, M. F., ... & Kalueff, A. V. (2009). Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioural brain research*, 205(1), 38-44.
- Faustino, A. I., Tação-Monteiro, A., & Oliveira, R. F. (2017). Mechanisms of social buffering of fear in zebrafish. *Scientific reports*, 7(1), 44329.
- Fernald, R. D., & Hirata, N. R. (1977). Field study of *Haplochromis burtoni*: quantitative behavioural observations. *Animal Behaviour*, 25, 964-975.
- Fernald, R. D., & Hirata, N. R. (1977). Field study of *Haplochromis burtoni*: habitats and co-habitant. *Environmental Biology of Fishes*, 2, 299-308.
- Filby, A. L., Paull, G. C., Hickmore, T. F., & Tyler, C. R. (2010). Unravelling the neurophysiological basis of aggression in a fish model. *BMC genomics*, 11(1), 1-17.
- Fox, H. E., White, S. A., Kao, M. H., & Fernald, R. D. (1997). Stress and dominance in a social fish. *Journal of Neuroscience*, 17(16), 6463-6469.

Francis, R. C., Jacobson, B., Wingfield, J. C., & Fernald, R. D. (1992). Castration lowers aggression but not social dominance in male *Haplochromis burtoni* (Cichlidae). *Ethology*, 90(3), 247-255.

Frisch, K. (1942). Über einen Schreckstoff der Fischhaut und seine biologische Bedeutung. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 29, 46-145.

Gatewood, J. D., Wills, A., Shetty, S., Xu, J., Arnold, A. P., Burgoyne, P. S., & Rissman, E. F. (2006). Sex chromosome complement and gonadal sex influence aggressive and parental behaviors in mice. *Journal of Neuroscience*, 26(8), 2335-2342.

Gerlai, R., & Csányi, V. (1990). Genotype-environment interaction and the correlation structure of behavioral elements in paradise fish (*Macropodus opercularis*). *Physiology & behavior*, 47(2), 343-356.

Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S., & Rosenthal, A. (2000). Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacology biochemistry and behavior*, 67(4), 773-782.

Gilmour, K. M., DiBattista, J. D., & Thomas, J. B. (2005). Physiological causes and consequences of social status in salmonid fish. *Integrative and comparative biology*, 45(2), 263-273.

Goodall J, Rincón L, Pandolfi M, Pozzi A. 2021. Club cells: señales químicas de alarma intraespecíficas y comportamientos antipredatorios en *Paracheirodon axelrodi* (Characiformes: characidae). XXIII Jornada Anual de la Sociedad Argentina de Biología “Evolución, desarrollo y cambio tecnológico: impacto sobre el crecimiento de los individuos y la sociedad.” Modalidad Virtual. Buenos Aires, Argentina

Goodhall 2021. Distribución de las Club Cells, comunicación química y respuestas comportamentales en Neón Cardenal (*Paracheirodon axelrodi*). Tesis de licenciatura

Halačka, K., Vetešník, L., Papoušek, I., Mendel, J., & Šlmková, A. (2010). The epidermal structure of *Carassius gibelio*: a link with ploidy status in spawning and postspawning periods. *Journal of Fish Biology*, 77(9), 2171–2179.

Halbgewachs, C. F., Marchant, T. A., Kusch, R. C., & Chivers, D. P. (2009). Epidermal club cells and the innate immune system of minnows. *Biological Journal of the Linnean Society*, 98(4), 891-897.

- Hall, D., & Suboski, M.D. (1995). Visual and Olfactory Stimuli in Learned Release of Alarm Reactions by Zebra Danio Fish (*Brachydanio rerio*). *Neurobiology of Learning and Memory*, 63, 229-240.
- Halperin JRP, Giri T, Elliott J, Dunham DW. (1998). Consequences of hyper-aggressiveness in Siamese fighting fish: Cheaters seldom prospered. *Anim Behav* 55:87–96.
- Hau, M., Stoddard, S. T., y Soma, K. K. (2004). Territorial aggression and hormones during the nonbreeding season in a tropical bird. *Hormones and Behavior*, 45(1), 40-49.
- Hsu, Y., & Wolf, L. L. (1999). The winner and loser effect: integrating multiple experiences. *Animal Behaviour*, 57(4), 903-910.
- Huffman, L. S., O'Connell, L. A., & Hofmann, H. A. (2013). *Aromatase regulates aggression in the African cichlid fish Astatotilapia burtoni*. *Physiology & Behavior*, 112-113, 77–83.
- Hugie, D. M., & Smith, R. J. F. (1987). Epidermal club cells are not linked with an alarm response in reedfish, *Erpetoichthys* (= *Calamoichthys*) *calabaricus*. *Canadian journal of zoology*, 65(8), 2057-2061.
- Hume, J. M., & Wynne-Edwards, K. E. (2005). Castration reduces male testosterone, estradiol, and territorial aggression, but not paternal behavior in biparental dwarf hamsters (*Phodopus campbelli*). *Hormones and behavior*, 48(3), 303-310.
- Hurk RVD, Lambert JGD. (1983). Ovarian steroid glucuronides function as sex pheromones for male zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Can J Zool*. 61(11):2381–2387.
- Iger, Y., Abraham, M., Dotan, A., Fattal, B., & Rahamim, E. (1988). Cellular responses in the skin of carp maintained in organically fertilized water. *Journal of Fish Biology*, 33(5), 711-720.
- Irving, P. W. (1996). *Sexual dimorphism in club cell distribution in the European minnow and immunocompetence signaling*. *Journal of Fish Biology*, 48(1), 80–88.
- Jalabert, C., Quintana, L., Pessina, P., & Silva, A. (2015). Extra-gonadal steroids modulate non-breeding territorial aggression in weakly electric fish. *Hormones and behavior*, 72, 60-67.
- Jasnow, A. M., Huhman, K. L., Bartness, T. J., & Demas, G. E. (2000). Short-day increases in aggression are inversely related to circulating testosterone concentrations in male Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Hormones and behavior*, 38(2), 102-110.

Kalueff, A. V., Gebhardt, M., Stewart, A. M., Cachat, J. M., Brimmer, M., Chawla, J. S., ... & Schneider, and the Zebrafish Neuroscience Research Consortium, H. (2013). Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish*, 10(1), 70-86.

Koç (Yön), N. D., Aytekin, Y., & Yüce, R. (2008). *Ovary maturation stages and histological investigation of ovary of the Zebrafish (Danio rerio)*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(3), 513–522.

Larson, E. T., O'Malley, D. M., & Melloni Jr, R. H. (2006). Aggression and vasotocin are associated with dominant–subordinate relationships in zebrafish. *Behavioural brain research*, 167(1), 94-102.

Logan, C. A., & Wingfield, J. C. (1990). Autumnal territorial aggression is independent of plasma testosterone in mockingbirds. *Hormones and behavior*, 24(4), 568-581.

Loveland, J. L., Uy, N., Maruska, K. P., Carpenter, R. E., & Fernald, R. D. (2014). Social status differences regulate the serotonergic system of a cichlid fish, *Astatotilapia burtoni*. *Journal of Experimental Biology*, 217(15), 2680-2690.

Madeira, N., & Oliveira, R. F. (2017). *Long-Term Social Recognition Memory in Zebrafish*. *Zebrafish*, 14(4), 305–310.

Maruska, K. P. (2014). *Social regulation of reproduction in male cichlid fishes*. *General and Comparative Endocrinology*, 207, 2–12.

Maruska, K. P., Anselmo, C. M., King, T., Mobley, R. B., Ray, E. J., & Wayne, R. (2022). Endocrine and neuroendocrine regulation of social status in cichlid fishes. *Hormones and behavior*, 139, 105110.

Maruska, K. P., & Fernald, R. D. (2013). Social regulation of male reproductive plasticity in an African cichlid fish. *Integrative and comparative biology*, 53(6), 938-950.

McGregor PK, Peake TM, Lampe HM. (2001). Fighting fish *Betta splendens* extract relative information from apparent interactions: What happens when what you see isn't what you get. *Anim Behav* 62:1059–1065.

Miklosi, A., Csanyi, V., & Gerlai, R. (1997). Antipredator behavior in paradise fish (*Macropodus opercularis*) larvae: the role of genetic factors and paternal influence. *Behavior genetics*, 27, 191-200.

- Morandini, L., Ramallo, M. R., Scaia, M. F., Höcht, C., Somoza, G. M., & Pandolfi, M. (2019). Dietary l-tryptophan modulates agonistic behavior and brain serotonin in male dyadic contests of a cichlid fish. *Journal of Comparative Physiology A*, 205, 867-880.
- Moore, M. C. (1988). Testosterone control of territorial behavior: tonic-release implants fully restore seasonal and short-term aggressive responses in free-living castrated lizards. *General and comparative endocrinology*, 70(3), 450-459.
- Mukherjee, I., & Bhat, A. (2021). Temporal patterns in interactions across same-and mixed-sex wild zebrafish dyads. *Zebrafish*, 18(5), 307-315.
- Müller, C. A., & Manser, M. B. (2007). 'Nasty neighbours' rather than 'dear enemies' in a social carnivore. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1612), 959-965.
- Munakata, A., & Kobayashi, M. (2010). *Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 456–468.
- Nagahama, Y., Yoshikuni, M., Yamashita, M., Tokumoto, T., & Katsu, Y. (1995). 4 Regulation of oocyte growth and maturation in fish. *Current topics in developmental biology*, 30, 103-145.
- Nelson, R. J. (2006). *Biology of Aggression*. Oxford, NY: Oxford University Press.
- Oliveira, R. F., McGregor, P. K., & Latruffe, C. (1998). Know thine enemy: fighting fish gather information from observing conspecific interactions. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 265(1401), 1045-1049.
- Oliveira, R. F., Silva, A., & Canário, A. V. (2009). Why do winners keep winning? Androgen mediation of winner but not loser effects in cichlid fish. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1665), 2249-2256.
- Oliveira, R. F., Silva, J. F., & Simoes, J. M. (2011). Fighting zebrafish: characterization of aggressive behavior and winner–loser effects. *Zebrafish*, 8(2), 73-81.
- Palleroni, A., Hauser, M., & Marler, P. (2005). Do responses of galliform birds vary adaptively with predator size? *Animal Cognition*, 8, 200-210.
- Partridge, B. L., Liley, N. R., & Stacey, N. E. (1976). *The role of pheromones in the sexual behaviour of the goldfish. Animal Behaviour*, 24(2), 291–299.

- Pandey, S., Stockwell, C. A., Snider, M. R., & Wisenden, B. D. (2021). Epidermal club cells in fishes: a case for ecoimmunological analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1440.
- Pandolfi, M., Cánepa, M. M., Meijide, F. J., Alonso, F., Rey Vázquez, G., Maggese, M. C., & Vissio, P. G. (2009). Studies on the reproductive and developmental biology of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes, Cichlidae). *Biocell*, 33(1), 1-18.
- Pandolfi, M., Scaia, M. F., & Fernandez, M. P. (2021). Sexual dimorphism in aggression: sex-specific fighting strategies across species. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 15, 136.
- Paull, G. C., Filby, A. L., Giddins, H. G., Coe, T. S., Hamilton, P. B., & Tyler, C. R. (2010). Dominance hierarchies in zebrafish (*Danio rerio*) and their relationship with reproductive success. *Zebrafish*, 7(1), 109-117.
- Payne, A. P. & Swanson, H. H. (1972). The effect of sex hormones on the agonistic behaviour of the male golden hamster (*Mesocricetus auratus* Waterhouse). *Physiol. Behav.*, 8, 687-691.
- Pérez-Sirkin, D. I., Di Yorio, M. P., Delgadin, T. H., Honji, R. M., Moreira, R. G., Somoza, G. M., & Vissio, P. G. (2021). Post-spawning feed deprivation effects on testicular and ovarian maturation in the neotropical cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *Fish physiology and biochemistry*, 47(5), 1527–1540.
- Pfeiffer, W. (1977). The distribution of fright reaction and alarm substance cells in fishes. *Copeia*, 653-665.
- Pinho, J. S., Castilho, M., Sollari, J. S., & Oliveira, R. F. (2020). *Innate chemical, but not visual, threat cues have been co-opted as unconditioned stimulus for social fear learning in zebrafish. Genes, Brain and Behavior.*
- Pradhan, D. S., Newman, A. E., Wacker, D. W., Wingfield, J. C., Schlinger, B. A., & Soma, K. K. (2010). Aggressive interactions rapidly increase androgen synthesis in the brain during the non-breeding season. *Hormones and behavior*, 57(4-5), 381-389.
- Ramallo, M. R., Morandini, L., Alonso, F., Birba, A., Tubert, C., Fiszbein, A., & Pandolfi, M. (2014). *The endocrine regulation of cichlids social and reproductive behavior through the eyes of the chanchita, Cichlasoma dimerus (Percomorpha; Cichlidae).* *Journal of Physiology-Paris*, 108(2-3), 194–202.

- Rehnberg, B. G., & Smith, R. J. F. (1988). The influence of alarm substance and shoal size on the behaviour of zebra danios, *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). *Journal of Fish Biology*, 33(1), 155-163.
- Renn, S. C., Carleton, J. B., Magee, H., Nguyen, M. L. T., & Tanner, A. C. (2009). Maternal care and altered social phenotype in a recently collected stock of *Astatotilapia burtoni* cichlid fish. *Integrative and comparative biology*, 49(6), 660-673.
- Renn, S. C., Fraser, E. J., Aubin-Horth, N., Trainor, B. C., & 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.
- Rubenstein, D. R., & Wikelski, M. (2005). Steroid hormones and aggression in female Galapagos marine iguanas. *Hormones and behavior*, 48(3), 329-341.
- Saoshiro, S., Kawaguchi, Y., Hayakawa, Y., & Kobayashi, M. (2013). *Sexual bipotentiality of behavior in male and female goldfish. General and Comparative Endocrinology*, 181, 265–270.
- Scaia, M. F., Akinrinade, I., Petri, G., & Oliveira, R. F. (2022). Sex differences in aggression are paralleled by differential activation of the brain social decision-making network in zebrafish. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 16.
- Scaia, M. F., Cavallino, L., & Pandolfi, M. (2020). Social control of spermatogenesis and steroidogenesis in cichlid fish: a comparative approach. *Reproduction*, 159(1), R31-R43.
- Scaia, M. F., Morandini, L., Noguera, C. A., Ramallo, M. R., Somoza, G. M., & Pandolfi, M. (2018a). *Fighting cichlids: Dynamic of intrasexual aggression in dyadic agonistic encounters. Behavioural Processes*, 147, 61–69.
- Scaia, M. F., Morandini, L., Noguera, C., Trudeau, V. L., Somoza, G. M., & Pandolfi, M. (2018). *Can estrogens be considered as key elements of the challenge hypothesis? The case of intrasexual aggression in a cichlid fish. Physiology & Behavior*, 194, 481–490.
- Scaia, M. F., Trudeau, V. L., Somoza, G. M., & Pandolfi, M. (2023). Fighting cichlids: An integrated multimodal analysis to understand female and male aggression in *Cichlasoma dimerus*. *Hormones and Behavior*, 148, 105301.
- Schulz, R. W., & Miura, T. (2002). Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish physiology and biochemistry*, 26, 43-56.

- Shinohara, Y., & Kobayashi, M. (2020). *Sexual bipotentiality of the olfactory pathway for sexual behavior in goldfish. Fisheries Science.*
- Simpson, M. J. A. (1968). The display of the Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *Animal Behaviour Monographs*, 1, i-73.
- Singh, S. M., Treadwell, J., Kleiber, M. L., Harrison, M., & Uddin, R. K. (2007). Analysis of behavior using genetical genomics in mice as a model: from alcohol preferences to gene expression differences. *Genome*, 50(10), 877-897.
- Soma, K. K., Scotti, M. A. L., Newman, A. E., Charlier, T. D., & Demas, G. E. (2008). Novel mechanisms for neuroendocrine regulation of aggression. *Frontiers in neuroendocrinology*, 29(4), 476-489.
- Soma, K. K., Tramontin, A. D., & 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.
- Sørensen, C., Bohlin, L. C., Øverli, Ø., & Nilsson, G. E. (2011). Cortisol reduces cell proliferation in the telencephalon of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Physiology & behavior*, 102(5), 518-523.
- Sørensen, C., Nilsson, G. E., Summers, C. H., & Øverli, Ø. (2012). Social stress reduces forebrain cell proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Behavioural brain research*, 227(2), 311-318.
- Speedie, N., & Gerlai, R. (2008). Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural brain research*, 188(1), 168-177.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2007). *The behaviour and ecology of the zebrafish, Danio rerio. Biological Reviews*, 83(1), 13–34.
- Spence, R., Jordan, W. C., & Smith, C. (2006). Genetic analysis of male reproductive success in relation to density in the zebrafish, *Danio rerio*. *Frontiers in Zoology*, 3, 1-6..
- Talling, J.F. and Lemoalle, J. (1998) *Ecological Dynamics of Tropical Inland Waters*. Cambridge University Press, Cambridge

- Teame, T., Zhang, Z., Ran, C., Zhang, H., Yang, Y., Ding, Q., ... Zhou, Z. (2019). *The use of zebrafish (Danio rerio) as biomedical models. Animal Frontiers, 9(3), 68–77.*
- Tsutsui, K., Saigoh, E., Ukena, K., Teranishi, H., Fujisawa, Y., Kikuchi, M., ... & Sharp, P. J. (2000). A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochemical and biophysical research communications, 275(2), 661-667.*
- Tsutsui, K., & Yamazaki, T. (1995). Avian neurosteroids. I. Pregnenolone biosynthesis in the quail brain. *Brain research, 678(1-2), 1-9.*
- Tubert, C., Nostro, F. L., Villafañe, V., & Pandolfi, M. (2012). Aggressive behavior and reproductive physiology in females of the social cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *Physiology & behavior, 106(2), 193-200.*
- Vandenbergh, J. G. (1971). The effects of gonadal hormones on the aggressive behaviour of adult golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Animal Behaviour, 19(3), 589-594.*
- Van den Hurk, R., Schoonen, W. G. E. J., Van Zoelen, G. A., & Lambert, J. G. D. (1987). The biosynthesis of steroid glucuronides in the testis of the zebrafish, *Brachydanio rerio*, and their pheromonal function as ovulation inducers. *General and comparative endocrinology, 68(2), 179-188.*
- Waldman, B. (1982). Quantitative and developmental analyses of the alarm reaction in the zebra danio, *Brachydanio rerio*. *Copeia, 1-9.*
- Whitear, M. (1986). Epidermis. *Biology of the Integument: 2 Vertebrates, 8-38.*
- Williams, F. E., White, D., & Messer Jr, W. S. (2002). A simple spatial alternation task for assessing memory function in zebrafish. *Behavioural processes, 58(3), 125-132.*
- Winberg, S., & Thörnqvist, P. O. (2016). Role of brain serotonin in modulating fish behavior. *Current Zoology, 62(3), 317-323.*
- Wingfield, J. C., Lynn, S. E., & Soma, K. K. (2001). Avoiding the 'costs' of testosterone: ecological bases of hormone-behavior interactions. *Brain, behavior and evolution, 57(5), 239-251.*
- Woodley, S. K., & Moore, M. C. (1999). Ovarian hormones influence territorial aggression in free-living female mountain spiny lizards. *Hormones and Behavior, 35(3), 205-214.*

Woodley, S. K., & Moore, M. C. (1999). *Female territorial aggression and steroid hormones in mountain spiny lizards*. *Animal Behaviour*, 57(5), 1083–1089.

Wright, D., Rimmer, L. B., Pritchard, V. L., Butlin, R. K., & Krause, J. (2003). Inter and intra-population variation in shoaling and boldness in the zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Fish Biology*, 63, 258-259.

Xu, X., Scott-Scheiern, T., Kempker, L., & Simons, K. (2007). Active avoidance conditioning in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurobiology of learning and memory*, 87(1), 72-77.

Zaccone G, Kapoor BG, Fasulo S, and Ainis L (2001) Structural, histochemical and functional approaches of the epidermis of fishes. *Adv Marine Biol* 40: 253–348.

Zaccone, G., Fasulo, S., & Ainis, L. (1994). Distribution patterns of the paraneuronal endocrine cells in the skin, gills and the airways of fishes as determined by immunohistochemical and histological methods. *The Histochemical Journal*, 26, 609-629.

7. Anexo

Agresión en función del estado reproductivo

Cuartiles

| | 0% | 25% | 50% | 75% | 100% |
|---------------|----|-----|-----|-----|------|
| Latencia pre | 1 | 2 | 4 | 6 | 12 |
| Latencia post | 3 | 4 | 5 | 7 | 14 |
| Tag pre | 3 | 19 | 31 | 142 | 934 |
| Tag post | 32 | 32 | 43 | 96 | 98 |

Tabla 1. Cuartiles de la latencia y del tiempo de agresión, en contiendas entre hembras prepuesta (Tag pre y Latencia pre) y contiendas entre hembras post puesta de huevos (Tag post y Latencia post). Los cuartiles se corresponden con los mostrados por los gráficos de cajas de las figuras 6 y 7.

| | W | p-valor |
|-------------------|-----------|---------------|
| Latencia | 32 | 0,2819 |
| T agresión | 27 | 0,5934 |

Tabla 2. Estadísticos y p valores de las pruebas de Wilcoxon realizadas para la latencia y el tiempo de agresión de las contiendas comparando los distintos estados reproductivos.

Agresión en encuentros agonísticos sucesivos

Cuartiles latencia

| | 0% | 25% | 50% | 75% | 100% |
|----------------|----|-----|-----|-----|------|
| Latencia día 1 | 1 | 3 | 5 | 7 | 35 |
| Latencia día 2 | 1 | 4 | 11 | 17 | 70 |

Tabla 3. Cuartiles de la latencia, en contiendas en días sucesivos de contienda (Latencia día 1 y Latencia día 2). Los cuartiles se corresponden con los mostrados por el gráfico de perfiles de la figura 9.

Cuartiles Tiempo de agresión

| | 0% | 25% | 50% | 75% | 100% |
|-----------|----|-----|-----|-----|------|
| Tag día 1 | 3 | 25 | 43 | 98 | 934 |
| Tag día 2 | 1 | 20 | 43 | 136 | 466 |

Tabla 4. Cuartiles del tiempo de agresión, en contiendas en días sucesivos de contienda (Tag día 1 y Tag día 2). Los cuartiles se corresponden con los mostrados por el gráfico de perfiles de la figura 10.

| | V | p-valor |
|-------------------|-------------|----------------|
| Latencia | 20,5 | 0,0534 |
| T agresión | 71 | 0,8851 |

Tabla 5. Estadísticos y p valores de las pruebas de Wilcoxon para muestras pareadas realizadas para la latencia y el tiempo de agresión de las contiendas comparando los sucesivos días de contiendas.

Agresión en función de la sustancia química de alarma

Cuartiles latencia

| | 0% | 25% | 50% | 75% | 100% |
|--------|----|-----|-----|-----|------|
| Sin SA | 1 | 3 | 5 | 7 | 35 |
| Ctrol | 4 | 4 | 5,5 | 7,5 | 9 |
| Con SA | 2 | 8 | 15 | 185 | 502 |

Tabla 6. Cuartiles de la latencia, en contiendas en función de la sustancia de alarma. Los cuartiles se corresponden con los mostrados por el gráfico de cajas de la figura 11.

Cuartiles Tiempo de agresión

| | 0% | 25% | 50% | 75% | 100% |
|--------|----|------|-----|--------|------|
| Sin SA | 3 | 25 | 43 | 98 | 943 |
| Ctrol | 5 | 20 | 105 | 243,25 | 581 |
| Con SA | 5 | 45,5 | 86 | 310,5 | 1112 |

Tabla 7. Cuartiles del tiempo de agresión, en contiendas en función de la sustancia de alarma. Los cuartiles se corresponden con los mostrados por el gráfico de cajas de la figura 12.

| | X2 | df |
|-------------------|---------------|-----------|
| latencia | 8,4343 | 2 |
| T agresión | 2,1148 | 2 |

Tabla 8. Estadísticos y grados de libertad de la prueba de Kruskal-Wallis realizadas para la latencia y el tiempo de agresión de las contiendas comparando los distintos tratamientos: control, con sustancia de alarma y sin sustancia de alarma.

Agresión en encuentros agonísticos sucesivos en presencia de sustancia de alarma

Cuartiles latencia

| | 0% | 25% | 50% | 75% | 100% |
|----------------|----|-----|-----|-------|------|
| Latencia día 1 | 2 | 8 | 15 | 185 | 502 |
| Latencia día 2 | 2 | 14 | 65 | 182,5 | 1113 |

Tabla 9. Cuartiles de la latencia, en contiendas en días sucesivos de contienda en presencia de sustancia de alarma (Latencia día 1 y Latencia día 2). Los cuartiles se corresponden con los mostrados por el gráfico de perfiles de la figura 13.

Cuartiles Tiempo de agresión

| | 0% | 25% | 50% | 75% | 100% |
|-----------|----|------|-----|-------|------|
| Tag día 1 | 5 | 45,5 | 86 | 310,5 | 1112 |
| Tag día 2 | 0 | 20 | 40 | 59,5 | 95 |

Tabla 10. Cuartiles del tiempo de agresión, en contiendas en días sucesivos de contienda en presencia de sustancia de alarma (Tag día 1 y Tag día 2). Los cuartiles se corresponden con los mostrados por el gráfico de perfiles de la figura 14.

| | V | p-valor |
|-------------------|------------|----------------|
| Latencia | 53 | 0,7197 |
| T agresión | 103 | 0,01245 |

Tabla 11. Estadísticos y p valores de las pruebas de Wilcoxon para muestras pareadas realizadas para la latencia y el tiempo de agresión de las contiendas comparando los sucesivos días de contiendas en las que se añadió sustancia de alarma.

Freezing en función del estado reproductivo

Cuartiles

| | 0% | 25% | 50% | 75% | 100% |
|----------------------|----|-----|-----|-------|------|
| <i>Freezing pre</i> | 0 | 0 | 121 | 692,5 | 1186 |
| <i>Freezing post</i> | 0 | 0 | 0 | 24,5 | 213 |

Tabla 12. Cuartiles del *freezing*, en contiendas entre hembras pre-puesta (*freezing pre*) y contiendas entre hembras post puesta de huevos (*freezing post*). Los cuartiles se corresponden con los mostrados por el gráfico de cajas de las figuras 16.

| | Z | p-valor |
|------------------------|----------------|----------------|
| <i>freezing</i> | -1.3878 | 0.1933 |

Tabla 13. Estadístico y p valor de la prueba de Wilcoxon realizadas para el *freezing* de las contiendas comparando los distintos estados reproductivos.

Freezing en encuentros agonísticos sucesivos

Cuartiles

| | 0% | 25% | 50% | 75% | 100% |
|-----------------------|----|-----|------|-------|--------|
| <i>Freezing</i> día 1 | 0 | 0 | 24,5 | 521,5 | 1186 |
| <i>Freezing</i> día 2 | 0 | 0 | 27 | 110 | 1319,5 |

Tabla 14. Cuartiles del *freezing*, de contiendas en días sucesivos (*Freezing* día 1 y *Freezing* día 2). Los cuartiles se corresponden con los mostrados por el gráfico de perfiles de la figura 17.

| | Z | p-valor |
|------------------------|----------------|-------------------|
| <i>freezing</i> | -0.0180 | > 0,999 |

Tabla 15. Estadístico y p valor de las pruebas de Wilcoxon para muestras pareadas realizadas para el *freezing* de las contiendas comparando los sucesivos días de contiendas.

Freezing en función de la sustancia de alarma

Cuartiles

| | 0% | 25% | 50% | 75% | 100% |
|-----------------|------|--------|--------|---------|--------|
| Freezing Sin SA | 0 | 0 | 24,5 | 521,5 | 1186 |
| Freezing Ctról | 0 | 71,875 | 288,75 | 413,875 | 1093,5 |
| Freezing Con SA | 32,5 | 94,5 | 550,5 | 762,25 | 1743,5 |

Tabla 16. Cuartiles del *freezing*, en contiendas en función de la sustancia de alarma. Los cuartiles se corresponden con los mostrados por el gráfico de cajas de la figura 18.

| | X² | df |
|------------------------|----------------------|-----------|
| <i>freezing</i> | 7,633 | 2 |

Tabla 17. Estadístico y grados de libertad de la prueba de Kruskal-Wallis realizadas para el *freezing* de las contiendas comparando los distintos tratamientos: control, con sustancia de alarma y sin sustancia de alarma.

Freezing en encuentros agonísticos sucesivos en presencia de sustancia de alarma

Cuartiles

| | 0% | 25% | 50% | 75% | 100% |
|-------------------------|------|-------|-------|--------|--------|
| Freezing día 1 (Con SA) | 32,5 | 94,5 | 550,5 | 762,25 | 1743,5 |
| Freezing día 2 (Con SA) | 27 | 229,5 | 775,5 | 1623 | 1998,5 |

Tabla 18. Cuartiles del *freezing*, de contiendas en días sucesivos en presencia de sustancia de alarma (*Freezing* día 1 (Con SA) y *Freezing* día 2 (Con SA)). Los cuartiles se corresponden con los mostrados por el gráfico de perfiles de la figura 19.

| | V | p-valor |
|-----------------|----|---------|
| <i>freezing</i> | 30 | 0,0946 |

Tabla 19. Estadístico y p valor de las pruebas de Wilcoxon para muestras pareadas realizadas para el *freezing* de las contiendas comparando los sucesivos días de contiendas, en presencia de sustancia de alarma.

Porcentajes de contiendas con y sin resolución



Figura Anexo 1. Porcentaje de contiendas con resolución y sin resolución, para el primer encuentro diádico.



Figura Anexo 2. Porcentaje de contiendas con resolución y sin resolución, para el primer encuentro diádico, en presencia de sustancia de alarma.

P-valores de supuestos de análisis paramétricos

#Peso Derecha VS Peso Izquierda (DMR)

***Shapiro.test* p-value = 0.1891**

#Largo Std Derecha VS Largo Std Izquierda (DMR)

***Shapiro.test* p-value = 0.6544**

#TIEMPO DE AGRESION VS ESTADIO (SIN SA)

***Shapiro.test* p-value= 2,261e-05**

***LeveneTest* p-value= 0,4084**

#LATENCIA VS ESTADIO (SIN SA)

***Shapiro.test* p-value= 0,01023**

***LeveneTest* p-value = 0,9356**

#FREEZING VS ESTADIO (SIN SA)

Shapiro.test p-value = 0.1232

LeveneTest p-value = 0.09199

#TIEMPO DE AGRESION VS TRATAMIENTOS (CTROL, SIN SA, CON SA)

Shapiro.test p-value = 8.513e-08

LeveneTest p-value= 0.6106

#LATENCIA VS TRATAMIENTOS (CTROL, SIN SA, CON SA)

Shapiro.test p-value = 1.035e-07

LeveneTest p-value = 0.006364

#FREEZING VS TRATAMIENTOS (CTROL, SIN SA, CON SA)

Shapiro.test p-value = 0.001231

LeveneTest p-value = 0.3858

#TIEMPO DE AGRESION VS DIA TRATAMIENTO (DMR, SIN SA)

Shapiro.test p-value = 1.678e-08

#LATENCIA VS DIA TRATAMIENTO (DMR, SIN SA)

Shapiro.test p-value = 1.136e-06

#FREEZING VS DIA TRATAMIENTO (DMR, SIN SA)

Shapiro.test p-value = 2.033e-07

#TIEMPO DE AGRESION VS DIA TRATAMIENTO (DMR, CON SA)

Shapiro.test p-value = 6.982e-07

#LATENCIA VS DIA TRATAMIENTO (DMR, CON SA)

Shapiro.test p-value = 1.809e-06

#FREEZING VS DIA TRATAMIENTO (DMR, CON SA)

Shapiro.test p-value = 0.1619