## Biblioteca Digital F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

## Tesis Doctoral





## Ramallo, Martín Roberto

2016-12-02

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Ramallo, Martín Roberto. (2016-12-02). Aromatasa cerebral (Cyp19a1b): caracterización y relación con el comportamiento agonístico y el período de cuidado parental en el pez cíclido Cichlasoma dimerus. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

#### Cita tipo Chicago:

Ramallo, Martín Roberto. "Aromatasa cerebral (Cyp19a1b): caracterización y relación con el comportamiento agonístico y el período de cuidado parental en el pez cíclido Cichlasoma dimerus". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-12-02.

### **EXACTAS** Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA** Universidad de Buenos Aires

**Dirección:** Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293 Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar



#### **UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

### Aromatasa cerebral (Cyp19a1b): caracterización y relación con el comportamiento agonístico y el período de cuidado parental en el pez cíclido *Cichlasoma dimerus*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

#### Martín Roberto Ramallo

Directores de tesis: Dr. Matías Pandolfi Dr. Gustavo M. Somoza

Consejero de Estudios: Dra. Paula Vissio

Lugar de trabajo: Laboratorio de Neuroendocrinología y Comportamiento. DBBE, UBA e IBBEA, CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2016

### Aromatasa cerebral (Cyp19a1b): caracterización y relación con el comportamiento agonístico y el período de cuidado parental en el pez cíclido Cichlasoma dimerus.

En todos los vertebrados, la enzima citocromo P450 aromatasa, es la responsable de la síntesis de estrógenos a partir de andrógenos. En ciertas áreas específicas del cerebro de los peces teleósteos la producción de estrógenos cerebrales es entre 100 y 1000 veces mayor comparada con las regiones homólogas del cerebro de otros grupos de vertebrados. La base de tales niveles radica en parte a la expresión de una variante de la enzima aromatasa, conocida como aromatasa cerebral, producto de uno de los dos genes parálogos que codifican para aromatasas (cerebral y gonadal) en teleósteos. Ya que la distribución neuroanatómica de las células productoras de aromatasa cerebral coincide parcialmente con áreas del cerebro involucradas en la regulación de comportamientos sociales, decidimos analizar el papel de la misma en la regulación del comportamiento agonístico y del cuidado maternal, en la chanchita Cichlasoma dimerus. Por medio de un protocolo de inmunohitoquímica se detectó la presencia de esta enzima en el cerebro anterior de la chanchita, en áreas involucradas en la regulación de comportamientos sociales. Luego, se caracterizaron la fisiología y el comportamiento de machos de chanchita de distinto estatus social (dominante vs. subordinado), y su relación con la expresión de aromatasa cerebral en el cerebro y la hipófisis. Los machos dominantes presentaron niveles mayores de andrógenos circulantes, mientras que los machos subordinados se caracterizaron por poseer niveles más altos de 17β-estradiol, y una tasa espermatogénica relativamente menor. Si bien no se observó un efecto del estatus social sobre la expresión de la enzima, los niveles de expresión de la misma en hipófisis correlacionaron con la frecuencia de comportamientos agonísticos, sugiriendo un papel novedoso de la hipófisis en la regulación del comportamiento social a través de la síntesis de estrógenos. En las hembras se analizaron los perfiles de expresión de ambas variantes de la enzima aromatasa (cerebral y gonadal) a lo largo del período de cuidado parental, y su relación con parámetros fisiológicos y reproductivos. El inicio del cuidado maternal resultó en una caída específica de la síntesis de esteroides sexuales y de la tasa de maduración ovárica, mientras que los niveles de expresión de ambas aromatasas resultaron independientes de la presencia de la progenie. Por lo tanto, el estatus social en los machos y el cuidado parental en las hembras, repercuten fuertemente sobre los niveles de esteroides sexuales y el estado de las gónadas, o viceversa, sin que resulte afectada la expresión de aromatasa en cerebro anterior e hipófisis.

**Palabras claves:** aromatasa cerebral, aromatasa gonadal, esteroides sexuales, cíclidos, comportamiento agonístico, cuidado maternal, *Cichlasoma dimerus*.

## Brain aromatase (Cyp19a1b): characterization and its relationship with agonistic behavior and parental care in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*

In all vertebrates, the enzyme aromatase cytochrome P<sub>450</sub>, is responsible for estrogen synthesis by aromatization of androgens. Estrogen synthesis within particular brain regions of the teleost brain is between 100 and 1000 times higher than that observed in the homologues brain areas of other vertebrates. The basis of such high levels lies in part due to the expression of a variant of the enzyme aromatase, known as brain aromatase, which is the product of one of two paralogous genes encoding aromatase enzymes (brain and gonadal aromatase) in teleosts. The neuroanatomical distribution of brain aromatase overlaps with brain areas involved in the regulation of social behavior. Thus, the objective of this thesis was to analyze the role of brain aromatase in the regulation of agonistic behavior and maternal care in Cichlasoma dimerus, locally known as chanchita. Through an immunohistochemical study, the presence of the enzyme was detected in forebrain regions, in areas involved in the regulation of social behaviors. Then, the physiology and behavior of male chanchitas of different social status (dominant vs. subordinate) were characterized, and their relationship with the expression of brain aromatase in the brain and pituitary was assessed. Dominant males had higher circulating androgen levels, while subordinate males were characterized by a higher 17β-estradiol plasma concentration, and a relatively lower spermatogenic rate. While the social status ha no effect on the expression of forebrain and pituitary brain aromatase, the expression levels at pituitary correlated with the frequency of agonistic behaviors, suggesting a novel role of the pituitary gland in the regulation of social behavior through estrogen synthesis. In female chanchitas, the expression profiles of both aromatase gene variants (brain and gonadal) were examined throughout the parental care period, and their relation to physiological and reproductive parameters were analyzed. The onset of maternal care resulted in a specific downregulation in sex steroid synthesis and ovarian maturation rate, while levels of expression of both aromatases were independent of the presence of the progeny. Therefore, the social status in males and parental care in females of the cichlid chanchita, have a strong effect on sex steroids levels and gonadal state, or vice versa, though aromatase expression in whole forebrain and pituitary samples was unaffected.

**Keywords**: brain aromatase, gonadal aromatase, sex steroids, cichlids, agonistic behavior, maternal care, *Cichlasoma dimerus*.

#### Agradecimientos

La emergencia o el surgimiento hacen referencia a aquellas propiedades o procesos de un sistema no reducibles a las propiedades o procesos de sus partes constituyentes. El todo es más que la suma de las partes, así como este trabajo de tesis es en parte de todos.

Primero quiero agradecer a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por brindarme a mí y a muchos otros, la oportunidad de recibir una educación de calidad y desarrollarnos como profesionales. A los profesores de la carrera que se esforzaron para que las clases sean mucho más que el simple contenido de un libro académico.

A mis directores Matías Pandolfi y Gustavo Somoza. A Matías, gracias por haberme re-elegido para formar parte de tu equipo de trabajo durante 8 años! Por darme innumerables oportunidades y confiar más en mí de lo que yo confío en mí mismo. A Gustavo, por la confianza ciega y estar siempre predispuesto a darme una mano. A los dos les agradezco sus enseñanzas, sobre todo a través del ejemplo.

A los Yamamitas, los Exmamitas y los Newmamitas. Sin lugar a dudas lo mejor del laboratorio! A Feli, Vir, Ceci, Leo, Agus, Pau, Lau, Lucho, Renato, Santi, Flor y Ale. Gracias por llenar los días de diversión. En particular quiero agradecerles a: Leo por ser un dolor de cabeza constante, una fuente inagotable de generación de ira y la persona que más confío del laboratorio; a Agus, por haberme permitido ser tu director asistente, por confiar en mí y enseñarme tanto, lo mejor de mi doctorado!

A todo el laboratorio de Neuroendocrinología del Crecimiento y la Reproducción: Pau Vissio, Pao, Maxi, Mariana, Julieta, Nacho, Pau Di Yorio, Tomás y Dani. Otra gran fuente de alegría! A las Paus les agradezco los consejos y estar siempre presentes para darme una mano cuando lo necesité. A Dani y a Tomás, gracias por ser grandes compañeros (y amigos) en el sentido más amplio de la palabra. Dani, gracias por ser una gran compañera en muchas primeras veces para ambos: primer congreso nacional, internacional, primer pasantía en el exterior y primer apagón en la facultad.

Al laboratorio de Ecotoxicología Acuática: Fabi, Gracielita, Fer, Gri, Yani, Ro, Noe, Flor, Lu y Marilú, gracias por siempre recibirme con una sonrisa. A Fabi por ser la gran madraza de los labos y estar en todo, todo, todo. Preocuparte para que todo y todos funcionemos bien! Gracias por la confianza que depositaste en mí! Gracias Marilú por la gran ayuda que me brindaste desinteresadamente, con todo lo que implicó y gracias por siempre mantener la sonrisa! Gracias Noe y Lu por su alegría contagiosa!

A toda la gente del Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, de la Universidade de São Paulo, Brasil. A Renata por siempre tener la puerta abierta para recibirnos, pero sobre todo a Renato, ejemplo de persona e investigador. Gracias por toda la ayuda inmensurable a través de los años!

A la Unidade de Investigação em Eco-Etologia, Instituto Superior de Psicologia Aplicada, Lisboa, Portugal, que me hicieron sentir como en casa! Especialmente a Rui Oliveira por recibirme tan abiertamente y proveerme de todo el material para realizar el proyecto, y a Jose Miguel Simões y Pedro Viera con quienes compartí la mayor parte de mis días, matándonos de risa mientras pensábamos y evaluábamos la mejor estrategia, ángulo y posición de la cánula y cómo no freír al pez, y porque siempre me alentaron a seguir adelante. A mis amistades extralaboratoriles, Joaquim y Natalia por ocupar mis fines de semana y festejarme un excelente cumpleaños! A Mónica, António y Gabriel, por ser mi familia extendida en Lisboa!

A todos en el INTECH por siempre recibirme con lo mejor y ayudarme a encontrar las cosas! Sobre todo a Oswaldo que me tuvo paciencia infinita!! Un grande!

Al laboratorio de Biología de Desarrollo, porque los molestamos infinidad de veces y aun así nos siguieron prestando todo el instrumental sin el cual esta tesis no podría haber ocurrido! Muchas muchas gracias! Al laboratorio de Neuroepigenética por siempre tener las puertas abiertas para medir en el espectrofotómetro. Al laboratorio de Regulación Génica en Células Madre por darnos acceso a la centrífuga de placas. A Lu por dejarme usar la real time!

A todas las ingrávidas Lu(ana), Lu(cia), Ger, Peter, Flor, Ale, Maru, Mari, Ami, Juan, Sole, Marga y Juli por acompañarme desde hace añooos, por siempre haber estado y seguir estando! Gracias Juli y Marga por los alfajores y conitos de dulce de leche que le dieron el último empujón a esta tesis! A la mini ingrávida Iru, simplemente porque sí!

A toda mi familia y amigos que siempre me preguntaron (muchas veces para mi disgusto) como iba la tesis. Muchas gracias por su apoyo! Muchas gracias Patricia, Andrés, Pau y Gus (y ahora Emma) por siempre interesarse por las desventuras de la chanchita!

A mis hermanos María y su marido Pucho, Rodrigo y Sole que los quiero muuuucho!! A Santi, aunque fue más una distracción para la tesis que otra cosa jaja Gracias por aguantar todos mis malhumores!

A mi papá y mi mamá que siempre, siempre me acompañan y apoyan en todas mis decisiones y proyectos. Nada hubiese sido posible sin uds a mi lado!

A Tom por ser mi gran compañero de vida, estar siempre en cada paso, darme todo su apoyo y sobretodo aguantarse todas las distintas instancias de ánimo que implicó esta tesis!

¡Gracias!

El trabajo de investigación durante los años de realización de esta tesis recibió financiamiento de:

#### Agencia de Promoción Científica y Tecnológica:

Proyecto de I+D PICT 1482

#### CONICET:

- Becas internas doctorales tipo I y tipo II.
- Proyecto de I+D PIP-OO20
- Proyecto de I+D PIP 0059

#### Universidad de Buenos Aires

- Proyecto de I+D UBACyTX0155
- Proyecto de I+D UBACyTX053







#### Los trabajos siguientes surgieron durante la realización de esta tesis:

#### Publicaciones

Martín Roberto Ramallo, Agustina Birba, Renato Massaaki Honji, Leonel Morandini, Renata Guimarães Moreira, Gustavo Manuel Somoza y Matías Pandolfi, 2015. "A multidisciplinary study on social status and the relationship between inter-individual variation in hormone levels and agonistic behavior in a Neotropical cichlid fish". Horm. Behav. 69:139-51.

Martín Roberto Ramallo, Leonel Morandini, Felipe Alonso, Agustina Birba, Cecilia Tubert, Ana Fiszbein y Matías Pandolfi, 2014. "The endocrine regulation of cichlids social and reproductive behavior through the eyes of the chanchita, *Cichlasoma dimerus* (Percomorpha; Cichlidae)". J Physiol Paris. 108:194-202.

Martín Roberto Ramallo, Matthew Grober, Maximiliano M. Cánepa, Leonel Morandini y Matías Pandolfi, 2012. "Arginine-vasotocin expression and participation in reproduction and social behavior in males of the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*". Gen. Comp. Endocrinol. 179: 221-231.

#### Trabajos enviados

Martín Roberto Ramallo, Leonel Morandini, Agustina Birba, Gustavo Manuel Somoza y Matías Pandolfi. "From molecule to behavior: brain aromatase (*cyp19a1b*) characterization, expression analysis and its relation with social status and male agonistic behavior in a Neotropical cichlid fish".

Martín Roberto Ramallo, Renato Massaaki Honji, Agustina Birba, Leonel Morandinia, María Luisa Varela, Griselda Genovese, Renata Guimarães. Moreira, Gustavo Manuel Somoza y Matías Pandolfi. "A game of two? Gene expression analysis of brain (*cyp19a1b*) and gonadal (*cyp19a1a*) aromatase in females of a Neotropical cichlid fish through the parental care period and removal of the offspring".

#### Colaboraciones

Leonel Morandini, Martín Roberto Ramallo, Renata Guimarães Moreira, Christian Höcht, Gustavo Manuel Somoza, Ana Silva y Matías Pandolfi, 2015. "Serotonergic outcome, stress and sexual steroid hormones, and growth in a South American cichlid fish fed with an I-tryptophan enriched diet". Gen Comp. Endocrinol. 223: 27-37.

Agustina Birba, Martín Roberto Ramallo, Fabiana Lo Nostro, Renata Guimarães Moreira y Matías Pandolfi, 2015. "Reproductive and parental care physiology of *Cichlasoma dimerus* males". Gen Comp. Endocrinol. 221: 193-200.

Agustina Birba, Martín Roberto Ramallo, Leonel Morandini, Virginia Villafañe, Cecilia Tubert, Renata Guimarães Moreira y Matías Pandolfi, 2014. "The pineal complex in the cichlid *Cichlasoma dimerus*: effect of different photoperiods on its cell morphology". J. Fish. Biol. 85: 605-20.

Leonel Morandini, Renato Massaaki Honji, Martín Roberto Ramallo, Renata Guimarães Moreira y Matías Pandolfi, 2014. "The interrenal gland in males of the cichlid fish Cichlasoma dimerus: relationship with stress and the establishment of social hierarchies". Gen Comp Endocrinol. 195: 88-98.

Agustina Birba, Martín Ramallo y Matías Pandolfi, 2013. "El cerebro de los peces y sus variadas formas de reproducción". Ciencia Hoy, número 134.

#### Congresos

Martín Roberto Ramallo, Leonel Morandini, Agustina Birba, Gustavo Manuel Somoza y Matías Pandolfi. "Brain aromatase expression levels and its relationship with agonistic behaviour in a Neotropical cichlid". Presentación oral (orador Matías Pandolfi) en 8th International Symposium of Fish Endocrinology (8th ISFE). Gotemburgo, Suecia del 28 de Junio a 2 de Julio, 2016.

Martín Roberto Ramallo, Agustina Birba, Renato Massaaki Honji, Leonel Morandini, Renata Guimarães Moreira, Gustavo Manuel Somoza y Matías Pandolfi. "Hormones and agonistic behaviour: what the southamerican cichlid fish, *Cichlasoma dimerus*, tell us about them". Presentación oral en 10th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (10th ISRPF). Olhão, Portugal, 25 a 30 de Mayo, 2014.

Martín Roberto Ramallo, Agustina Birba, Renato Massaaki Honji, Leonel Morandini, Renata Guimarães Moreira, Gustavo Manuel Somoza y Matías Pandolfi. "Mordidas, persecuciones y hormonas: Relación entre el comportamiento agonístico y los esteroides sexuales". Jornadas de la Sociedad Argentina de Biología (XV Jornadas). Chascomús, Argentina, 4 a 6 de Diciembre, 2013.

Martín Ramallo, Gustavo Somoza y Matías Pandolfi. "Brain aromatase: relationship to aggressive behavior in a South-american cichlid fish". Presentación oral en 7th International Symposium of Fish Endocrinology (7th ISFE). Buenos Aires, Argentina, 1 a 6 de Septiembre, 2012.

Martín Ramallo, Leonel Morandini, Virginia Villafañe, Gustavo Manuel Somoza y Matías Pandolfi. "Caracterización y distribución de aromatasa cerebral y gonadal en el pez cíclido sudamericano: *Cichlasoma dimerus*". Segunda Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina. San Juan, San Juan, Argentina, 17 a 19 de Agosto, 2011.

Martín Ramallo, Matthew Grober y Matías Pandolfi. "Effects of arginine vasotocin on the hypothalamic-pituitary-gonads axis: a behavioural approach". Presentación oral (orador: Matías Pandolfi) en the 9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish (9th ISRPF). Cochin, India, 9 a 14 de Agosto, 2011.

A Tomás

# Tabla de contenidos

٠	Introdu	ucción: De dónde venimos y hacia dónde vamos	1
	0	¿El huevo o la gallina?¿El gallo o la endocrinología?	2
	0	Hormonas y comportamiento	4
	0	Tras bambalinas de un caso popular	7
	0	Neuroesteroides	8
	0	Aromatasa	10
	0	Aromatasa cerebral de teleósteos	12
	0	Cíclidos	17
	0	Cichlasoma dimerus	18
٠	Capítu	o I: ¿Qué? ¿Cómo? y ¿Dónde?	21
	0	Introducción	22
	0	Metodología	22
		<ul> <li>Animales</li> </ul>	22
		<ul> <li>Caracterización de la secuencia del ARN mensajero de aromatasa</li> </ul>	
		cerebral	23
		<ul> <li>Análisis de la secuencia aminoacídica predicha de aromatasa</li> </ul>	
		cerebral de chanchita	26
		<ul> <li>¿Aromatasa cerebral fuera del cerebro? Análisis de la expresión de</li> </ul>	
		aromatasa cerebral en distintos órganos	28
		<ul> <li>Análisis inmunohistoquímico de la localización y distribución de</li> </ul>	
		aromatasa cerebral en el cerebro de chanchita	32
	0	Resultados	36
		<ul> <li>Análisis de la secuencia del ADNc de aromatasa cerebral de</li> </ul>	
		chanchita	36
		<ul> <li>¿Aromatasa cerebral fuera del cerebro?</li> </ul>	42
		<ul> <li>Distribución neuroanatómica de aromatasa cerebral</li> </ul>	43
	0	Discusión	47
•	Capítu	o II: Duelo de chanchitas: fisiología del comportamiento agonístico en	
	macho	S	55
	0	Introducción	56
	0	Metodología	58
		<ul> <li>Animales</li> </ul>	58
		<ul> <li>Análisis de la filmación</li> </ul>	63

		<ul> <li>Medición de hormonas esteroideas</li> </ul>	64
		<ul> <li>Cuantificación celular del testículo</li> </ul>	65
		<ul> <li>Medición de la expresión relativa de aromatasa cerebral en</li> </ul>	
		cerebro e hipófisis	. 67
		<ul> <li>Análisis estadístico</li> </ul>	. 68
	0	Resultados	69
		<ul> <li>Estatus social y comportamiento agonístico</li> </ul>	69
		<ul> <li>Perfiles hormonales asociados al estatus social</li> </ul>	72
		<ul> <li>Potencial reproductivo de machos de distinto estatus social</li> </ul>	75
		<ul> <li>Expresión de aromatasa cerebral en machos de distinto estatus</li> </ul>	
		social y su relación con el comportamiento agonístico	76
	0	Discusión	79
٠	Capítu	o III: ¿Un juego entre dos aromatasa? Análisis de la fisiología del período	
	de cuio	lado maternal	92
	0	Introducción	93
	0	Metodología	95
		<ul> <li>Animales</li> </ul>	95
		<ul> <li>Medición de hormonas esteroideas</li> </ul>	97
		<ul> <li>Análisis histológico del ovario</li> </ul>	97
		<ul> <li>Medición de la expresión relativa de ambas variantes de la enzima</li> </ul>	
		aromatasa de teleósteos	98
		Análisis estadístico	104
	0	Resultados	105
		<ul> <li>Efecto del grado de desarrollo de la progenie sobre los ni</li> </ul>	veles
		plasmáticos de esteroides sexuales	105
		<ul> <li>Efecto del cuidado parental sobre la composición folicular</li> </ul>	del
		ovario	. 109
		<ul> <li>Patrón de expresión de ambas variantes de la enzima aromatasa a</li> </ul>	
		lo largo del período de cuidado parental	111
	0	Discusión	. 112
•	Conclu	sión	119
•	Canítu	lo anexo: Otras aproximaciones experimentales	123
-		Vida en pareia	. 124
	0	<ul> <li>Introducción</li></ul>	. 124

<ul> <li>Metodología</li> </ul>	124
Análisis estadístico	125
<ul> <li>Resultados</li> </ul>	125
<ul> <li>Discusión</li> </ul>	127
• El papel de la neurogénesis en el procesamiento cognitivo	128
<ul> <li>Introducción</li> </ul>	128
<ul> <li>Metodología</li> </ul>	129
<ul> <li>Resultados y discusión</li> </ul>	132
Referencias	134

## Introducción



Dra. Gloria Callard - Bióloga

"Al principio no había nada y entonces Dios dijo: -¡Hágase la luz!-. Y se hizo la luz. Todavía no había nada, pero se podía ver mucho mejor."

Ellen DeGeneres - Comediante

# [DE DÓNDE VENIMOS Y HACIA DÓNDE VAMOS]

Este capítulo da inicio al presente trabajo de tesis que buscó caracterizar la enzima aromatasa cerebral del pez cíclido *Cichlasoma dimerus*, y su relación con el comportamiento agonístico y el período de cuidado parental. Se presenta una breve reseña histórica de los descubrimientos principales que moldearon e inspiraron el presente estudio.

#### ¿El huevo o la gallina?

#### ¿El gallo o la endocrinología?

Es una pregunta milenaria. Surge de manera reiterada revolviendo conceptos semánticos, evolutivos e históricos. Es simple: si la gallina (*Gallus gallus*) nace de un huevo, y el huevo es producto de la gallina, ¿qué vino primero, el huevo o la gallina? Incluso más de 2000 años atrás, Aristóteles reflexionaba sobre el tema:

"De haber un primer hombre debería haber nacido sin padre o madre – lo cual es repugnante para la naturaleza. Por lo que no podría haber un primer huevo que dé inicio a las aves, o debería haber una primer ave que dio inicio al primer huevo; pues todas las aves vienen de un huevo" (Traducido de Fénelon, 1825).

Este dilema cíclico obtiene una aparente solución al considerar que el huevo amniota habría surgido unos ~310 millones de años atrás (Reisz y Müller, 2004), mientras que el origen de las aves se estima en ~160 millones de años (Brusatte y col., 2015), y tan sólo 50 millones para el género *Gallus* (Potts, 2012).

Esta pequeña ave de corral no sólo forma parte del origen de ésta reincidente y popular paradoja, sino que también fue partícipe en el surgimiento de una de las grandes disciplinas científicas. En el año 1849, el fisiólogo Suizo-alemán Arnold Adolph Berthold publicaba el que sería luego reconocido como el primer estudio formal de endocrinología (Quiring, 1944). Más aún, como algunas de las variables analizadas por Berthold fueron del tipo comportamental, constituye a su vez el primer registro formal de un trabajo de endocrinología del comportamiento.

En el segundo día de agosto de 1848, Berthold daba inicio a su experimento. Utilizó 6 gallos jóvenes sexualmente inmaduros, a los que asignó uno de tres tratamientos. En el primer grupo los animales fueron castrados a través de la remoción quirúrgica de sus testículos. Los otros sujetos experimentales también fueron sometidos al mismo procedimiento, con la particularidad que en el caso del segundo grupo uno de los testículos de cada par fue reimplantado en la cavidad abdominal del animal del cual había sido removido. Por otro lado, en el tercer grupo Berthold implantó un testículo de cada ave en la cavidad abdominal de la otra ave, es decir realizó un trasplante testicular (Figura 1).

2

Durante los siguientes meses Berthold observó el desarrollo de los jóvenes gallos a medida que ingresaban en edad reproductiva. Registró parámetros morfológicos tales como el tamaño y la coloración de la cresta y la barbilla (caracteres sexuales secundarios que se desarrollan totalmente con la madurez sexual y distinguen a los machos de las hembras), tamaño corporal y de la cabeza. Pero también tomó nota de su comportamiento: intensidad del canto, frecuencia e intensidad de enfrentamientos con otros machos y del cortejo hacia las hembras. Los machos del primer grupo, es decir aquellos únicamente castrados, dieron lugar a machos con cabezas y cuerpos pequeños, y con crestas y barbillas poco desarrolladas y de color pálido. En cuanto al comportamiento, los gallos no cantaban, evitaban a las hembras y nunca se dieron duelo con otros machos. Por el contrario, los animales de los grupos 2 y 3, aquellos con testículos re-implantados, se desarrollaron normalmente, *"cantaban entusiastamente, con frecuencia se enfrentaban a otros machos, y mostraron el comportamiento usual frente a las gallinas"* (Traducido de Quiring, 1944).



**Figura 1.** El experimento de Berthold (1848). En la fila superior se indica el tratamiento recibido por cada grupo de aves (grupo 1: castración; grupo 2: castración y re-implantación; grupo 3: castración y trasplante), y en la fila inferior el efecto del tratamiento sobre el desarrollo de los gallos, evaluado varios meses luego del procedimiento quirúrgico. Modificado de Nelson, 2011.

Sin embargo, el experimento aún no había concluido. Berthold se preguntó sobre el destino de los testículos re-implantados y procedió con la disección de los gallos del segundo y tercer grupo. En su publicación Berthold describe como los testículos se habían adosado a la pared externa del intestino grueso, presentaban un gran desarrollo vascular, en ocasiones a partir de vasos mesentéricos que ingresaban a los testículos en varios puntos, e incluso tras su análisis al microscopio, observó la presencia de espermatozoides con flagelos activos.

De su experimento Berthold concluye:

"1. Los testículos pertenecen al grupo de órganos trasplantables [...].

2. Los testículos trasplantados continúan con su crecimiento característico como órgano productor de esperma, incluso en un sitio ajeno [...].

3. [...] El hecho que los testículos puedan adosarse a una parte remota del cuerpo, esto es, al intestino, y continuar con su desarrollo y producir semen, sugiere la ausencia de un nervio secretor espermático. [...].

4. [...] Dado que los testículos trasplantados no se encuentran conectados a su inervación original, y [...] dada la ausencia de nervios secretores específicos, se concluye que los resultados en cuestión son determinados por la función productora de los testículos, es decir por su acción en el torrente sanguíneo, y luego por la correspondiente acción de la sangre en todo el cuerpo, del cual, es cierto, el sistema nervioso representa una parte considerable." (Traducido de Quiring, 1944).

De esta manera Berthold demostraba la existencia de mecanismos de control del comportamiento de origen no neural, a través de "*productos secretorios transportados por la sangre*" (Traducido de Quiring, 1944), elementos que hoy titulamos hormonas<sup>\*1</sup>. ¿Pero cuáles y cómo son los mecanismos a través de los cuales las hormonas influyen sobre el comportamiento?

#### Hormonas y comportamiento

Aplaudir, el croar de una rana, el encendido y apagado del abdomen de una luciérnaga, sonrojarse y el vuelo coordinado en formación en V de algunas aves, son todos ejemplos de comportamiento. Levitis y col. definen el comportamiento como "la respuesta del organismo completo (acciones o inacciones) internamente coordinada a estímulos externos y/o internos,

\*<sup>1</sup>El término "hormona" fue empleado por primera vez en 1905 por Ernest Starling, durante una 4 conferencia en Londres, en referencia a "*mensajeros químicos que viajando de célula a célula a través del torrente sanguíneo, pueden coordinar la actividad y el crecimiento de las distintas partes del cuerpo*" (Starling, 1905).

excluyendo aquellas respuestas más fácilmente entendidas como partes del desarrollo ontogenético" (Adaptado y traducido de Levitis y col., 2009). Si bien se suele asociar el comportamiento con el movimiento coordinado del cuerpo (es decir, el accionar de los músculos), en ocasiones la falta de movimiento es también comportamiento. Por ejemplo, un predador que acecha a su presa, o un animal que desea evitar a su predador o contrincante, o las hembras de algunas especies durante la cópula, como es el caso del hámster Sirio (Tiefer, 1970). Asimismo, la excreción de esencias y sustancias químicas, los cambios en la coloración de la piel y la producción de señales eléctricas por varias especies, son también tipos de comportamiento, y muchos de estos sistemas efectores no musculares pueden ser afectados por las hormonas (Nelson, 2011).

La adolescencia y la pubertad son ejemplos de la relación entre las hormonas y el comportamiento que todo adulto ha experimentado en primera persona, aquella etapa comprendida entre la niñez y la adultez. Este período no sólo se caracteriza por la maduración sexual mediada por la activación del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (HHG), sino que también es acompañado por una remodelación estructural y funcional del cerebro, que culmina con el desarrollo y adquisición de procesos cognitivos y de toma de decisiones, y comportamientos sociales típicos de adultos (Cheryl y Zehr, 2005). A través de efectos activacionales y organizativos, los esteroides sexuales producidos en las gónadas –principalmente el 17βestradiol (E<sub>2</sub>) y la testosterona- como productos últimos del eje HHG, moldean la estructura del sistema nervioso (Rome, 2003). En vertebrados, se ha demostrado que los esteroides sexuales son capaces de facilitar el proceso de formación de sinapsis, promover el desarrollo de espinas dendríticas en neuronas del hipocampo, afectar la liberación de neurotransmisores, regular la neurogénesis, modificar el comportamiento sexual en cuestión de minutos a través de los efectos no-genómicos activados por receptores de membrana, y mediar procesos de plasticidad sináptica (Chen y Goldman, 2013; Hara y col., 2015; Seredynski y col., 2015). Los cambios hormonales que ocurren durante la adolescencia probablemente son responsables, al menos en parte, de los trastornos del humor y ansiedad en humanos. De hecho, la prevalencia de ataques de pánico, ansiedad y depresión pasa de una relación equitativa entre niñas y niños pre-púberes, a ser doblemente probable en niñas luego de la pubertad (Paus y col., 2008).

No obstante, la relación entre las hormonas y el comportamiento no es unidireccional, desde el sistema endócrino hacia el órgano efector, por el contrario, el propio comportamiento actúa también sobre el ambiente hormonal. En este sentido, en una hembra de mamífero en período de lactancia por ejemplo, la hormona peptídica oxitocina secretada por el lóbulo posterior de la glándula hipófisis, por un lado promueve el desarrollo del comportamiento parental a nivel del cerebro (Pedersen y col., 1982), y la eyección de la leche en los alveolos de las glándulas mamarias (Young III y col., 1996), mientras que por el otro lado, el comportamiento maternal a través del estímulo del lactante o el simple contacto físico directo entre la madre y la cría, resultan en un aumento en los niveles de oxitocina (Cong y col., 2015; Moos y col., 1989). El incremento en la secreción de esta hormona ocurre incluso en forma anticipatoria, en repuesta al llanto de la cría, o durante la preparación de la madre previo al inicio del comportamiento de amamantamiento (White-Trout y col., 2009). Ganar o perder una contienda, o simplemente reír con una buena película de comedia, son también ejemplos de comportamientos que en el día a día pueden alterar la concentración de las hormonas (Berk y col., 1989; Hirschenhauser y Oliveira, 2006).

No es necesario participar en primera persona en un comportamiento para que éste afecte el sistema endocrino. Durante la final del mundial de futbol de 1994 cuando se enfrentaron Brasil e Italia, un grupo de investigadores de la Universidad de Georgia (E.E.U.U.) analizó los niveles de testosterona en muestras de saliva de simpatizantes brasileros e italianos, que miraban el partido por televisión. Finalmente, Brasil resultó victorioso en un 3 a 2 por penales, lo que se tradujo en un incremento en los niveles de testosterona salivar en los hombres psicológicamente afines al equipo brasilero, mientras que en los seguidores italianos, los valores de testosterona cayeron con respecto a la situación previa al inicio del partido (Bernhardt y col., 1998). De manera similar, en el pez cíclido Oreochromis mossambicus, la simple observación de una contienda agresiva entre dos machos por un tercero resultó en un aumento en los niveles de andrógenos en el pez testigo (Oliveira y col., 2001). Estos experimentos, en conjunto con muchos otros, revelan un tercer factor involucrado en la regulación de las hormonas y el comportamiento, que no requiere de participación física directa por parte del sujeto: el efecto del entorno social. Tal es así, que las repuestas comportamentales y los perfiles endócrinos varían acorde con el estatus social de un individuo, y con la presencia o ausencia de otros miembros de la población – y su estatus social – con los cuales interactúa (Oliveira, 2009). Efectivamente, la gran mayoría de los comportamientos sociales son dependientes del estatus, en donde los individuos subordinados y dominantes responden de manera muy distinta frente a un mismo estímulo, a la vez que se diferencian en sus perfiles endocrinos (Albert y col., 1986; Greenberg y col., 1984; Morandini y col., 2014; Oliveira y col., 2002; Renn y col., 2012; Sherman y col., 2012; Taves y col., 2009). El entorno social regula el efecto de las hormonas sobre el comportamiento. De hecho, las hormonas no son la causa de un comportamiento per se, sino que modifican la probabilidad de ocurrencia de un determinando comportamiento de manera dependiente del contexto social (Libersat y Pflüger, 2004; Nelson, 2011).

Además de los mecanismos de remodelación estructural del sistema nervioso como consecuencia de la acción de algunas hormonas, como se describiera por ejemplo para el caso de la adolescencia, las hormonas también pueden actuar como neuromoduladores vía receptores específicos, estimulando o inhibiendo la actividad de las redes neuronales involucradas en la regulación del comportamiento, mecanismo conocido como de conmutación bioquímica (Oliveira, 2009). Asimismo, el carácter sistémico de las hormonas, permite la integración y coordinación de la neuromodulación de más de un circuito neural en simultáneo (Oliveira, 2009).

#### Tras bambalinas de un caso popular

Desde Aristóteles, pasando por el experimento de Berthold, y hasta el día de hoy, un gran porcentaje de las publicaciones sobre endocrinología del comportamiento, se centran en la relación entre el comportamiento agresivo de los machos y los niveles de testosterona, el principal producto de secreción de los testículos de vertebrados (Demas y col., 2007). La asociación parecería ser extremadamente sólida y ha sido observada en diversas especies de todos los grupos de vertebrados. En primer lugar, en especies sociales, los niveles séricos de testosterona suelen ser más elevados en animales dominantes, que ejercen y sostienen su estatus a través de despliegues y enfrentamientos agresivos (Muller y Wrangham, 2004; Parikh y col., 2006). Los niveles de testosterona correlacionan además con la frecuencia del comportamiento agresivo (Cavigelli y Pereira, 2000; Lock y Bennet, 2015). Y por último, el bloqueo de la síntesis de testosterona, por ejemplo eliminando la fuente (los testículos), resulta en una caída en la intensidad o frecuencia del comportamiento, que luego es recuperada tras el tratamiento de sustitución con testosterona (Wingfield y col., 1987).

La asociación entre la testosterona y la agresividad se encuentra fuertemente arraigada incluso a nivel cultural. En un estudio realizado por Eisenegger y col. (2010), un grupo de mujeres recibió una única dosis de testosterona sublingual o un placebo, antes de iniciar un ensayo donde se evaluó el comportamiento pro-social a través de un juego de negociación. En conformidad con las normas éticas, los investigadores debieron informar a las voluntarias que recibirían o un placebo o testosterona, pero sin avisarles qué tratamiento recibieron efectivamente. El resultado reveló que las mujeres que recibieron testosterona realizaron en promedio ofertas más justas comparadas con el grupo control. Curiosamente, el porcentaje de negociaciones injustas fue mayor en aquellas mujeres que creían haber recibido el tratamiento con testosterona (Eisenegger y col., 2010).

Sin embargo, la agresividad es un comportamiento complejo y restringirlo a la regulación por una única hormona es, al menos, reduccionista. Más aún, existe un gran número de trabajos donde no se observó una correlación entre los niveles de testosterona en sangre y la agresividad (Selmanoff y col., 1977; Soma y Wingfield, 1999), o incluso el comportamiento agresivo persistió o aumentó tras la castración de los animales (Almeida y col., 2014; He y col., 2012; Wingfield, 1994). Los neuropeptidos de la familia arginina vasopresina/oxitocina, el glucocorticoide cortisol, la serotonina, andrógenos tales como la 11-cetotestosterona y la dehidroepiandrosterona y los estrógenos, son también elementos involucrados en la regulación endócrina del comportamiento agresivo en vertebrados (Cardwell y Liley, 1991; Heimovics y col., 2015; Lema y col., 2015; Montoya y col., 2011; Nelson y Chiavegatto, 2001; Soma y col., 2015).

El gorrión melódico, *Melospiza melodia morphna*, es un ave sedentaria de América del Norte, y constituye uno de los modelos más estudiados de agresividad territorial en machos fuera del período reproductivo, cuando la testosterona en circulación alcanza niveles basales, las gónadas regresan a un estado inmaduro, y la castración no afecta el comportamiento agresivo (Soma y col., 2000). Sospechando que la agresividad fuera del período reproductivo pudiese estar mediada por E<sub>2</sub>, Soma y col. (2000) trataron a gorriones melódicos machos con un inhibidor específico de la síntesis de E<sub>2</sub> (Fradozol) utilizando bombas micro-osmóticas. El fradozol disminuyó el comportamiento territorial de las aves, efecto que fue contrarrestado por el tratamiento simultáneo de fradozol con E<sub>2</sub>. Sin embargo, los niveles de E<sub>2</sub> en la circulación general de machos de *M. melodia morphna* durante el período no reproductivo son tan bajos como los observados para la testosterona. Pero entonces: ¿cuál es la fuente del E<sub>2</sub> que específicamente regula el comportamiento agresivo durante el período no reproductivo son

#### Neuroesteroides

Por muchas décadas las gónadas se consideraron como la única fuente de esteroides sexuales, con el cerebro como un simple órgano blanco de los esteroides producidos en las gónadas. Sin embargo, en los años '70 un número creciente de trabajos reportaron la síntesis de andrógenos y estrógenos en otros órganos (Nakamura y col., 1978; Tanabe y col., 1979) incluido el cerebro (Flores y col., 1973; Naftolin y col., 1971). En 1971 Frederick Naftolin y col. (1971) detectaron por primera vez la capacidad del cerebro de catalizar el pasaje de

testosterona a E<sub>2</sub>. A partir de este trabajo pionero, le siguieron muchos otros donde se demostró la presencia de la enzima aromatasa, responsable del pasaje de andrógenos de 19 carbonos a estrógenos de 18 carbonos (Figura 2), en el cerebro de los cordados (para una revisión ver Simpson y col., 2002). No obstante, para los investigadores, el cerebro seguía siendo un órgano receptor de esteroides y sólo se limitaba a su metabolización. No fue hasta la detección de la actividad de la enzima colesterol desmolasa o P450scc (del inglés *side chain clevage*), que cataliza el pasaje de colesterol a pregnenolona (el paso limitante hormonalmente regulado de la síntesis de todas las hormonas esteroideas [Yen y col., 2001]), que se reconoció el potencial endócrino del sistema nervioso (Walther y col., 1987). Hoy ya se definen a los neuroesteroides como aquellas hormonas esteroideas sintetizadas *de novo* por el sistema nervioso (Tsutsui y col., 2011), como es el caso del E<sub>2</sub> involucrado en la regulación del comportamiento territorial en *M. melodía morphna* durante el período no reproductivo (Soma y col., 2000). Actualmente se considera a la síntesis de neuroesteroides a partir de colesterol como una característica conservada de todos los vertebrados (Tsutsui, 2016).



**Figura 2.** Reacción de aromatización de testosterona a estradiol catalizada por el complejo aromatasa - NADPH-citocromo P450 reductasa.

En el cerebro de mamíferos (Shibuya y col., 2003), aves (Tsutsui, 2011), anfibios (do Rego y Vaudry, 2016) y peces teleósteos (Diotel y col., 2011) se ha descripto la presencia de la gran mayoría de las enzimas involucradas en la síntesis de los esteroides conocidos (Figura 3). Las enzimas se expresan tanto en neuronas y células gliales del sistema nervioso central y periférico así como en la glándula pineal (Haraguchi y col., 2012), donde ejercen su efecto de manera local (Shibuya y col., 2003).



**Figura 3.** Biosíntesis de neuroesteroides en el cerebro adulto del pez cebra (*Danio rerio*). Cyp11a1 (P450scc): colesterol desmolasa; Cyp17: citocromo P450 17 $\alpha$ -hidroxilasa; Cyp19a1b: aromatasa cerebral; 3 $\alpha$ -HSD: 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa; 3 $\beta$ -HSD: 3 $\beta$ hidroxiesteroide deshidrogenasa D5-D4 isomerasa; 3 $\beta$ -diol: 5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol; 17 $\beta$ -HSD: 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Modificado de Diotel y col., 2011.

#### Aromatasa

La enzima aromatasa, o citocromo P450 aromatasa, pertenece a la superfamilia conocida como citocromo P450, es producto del gen *cyp19a1*, y es la única enzima en vertebrados capaz de catalizar la aromatización del anillo A de los andrógenos al anillo fenólico característico de los estrógenos (Simpson y col., 2002) (Figura 2). La reacción requiere de 3 moles de oxígeno y 3 moles de NADPH, que son provistos por la flavoproteína NADPH-citocromo P450 reductasa, en complejo con aromatasa (Simpson y col., 1994). Inicialmente se consideraba al E<sub>2</sub> como una hormona exclusiva de las hembras de vertebrados, hasta su descubrimiento en una concentración elevada en la orina de sementales (imás de 500 veces la registrada en el ovario de yeguas!) en 1934 (Zondek, 1934). Desde entonces innumerables trabajos han demostrado la participación de la enzima aromatasa y sus productos en la regulación del metabolismo energético (hidratos de carbono y lípidos), la formación de los huesos, la modulación de la actividad de la glándula hipófisis, el comportamiento sexual, la

espermatogénesis y la foliculogénesis en machos y hembras de vertebrados (Santen y col., 2009). En los mamíferos, el gen de aromatasa se expresa en diversos tejidos a través de varios promotores tejido-específicos: células de la granulosa del ovario, células de Leydig y células de la serie espermatogénica del testículo, adipocitos, músculo, células endoteliales, placenta e hígado fetales, fibroblastos dérmicos, osteoblastos y osteoclastos, células endoteliales y el sistema nervioso (Simpson y col., 2002; Simpson, 2004).

En el cerebro de los vertebrados la enzima aromatasa se expresa mayoritariamente en neuronas (a excepción de los peces teleósteos), si bien también se ha visto que se expresa en células gliales radiales durante el desarrollo embrionario y en la glía astrocitaria en áreas del cerebro adulto luego de daño físico o isquemia (Coumailleau y Kah, 2015; Forlano y col., 2001; Garcia-Segura y col., 1999; Martinez-Cerdeno y col., 2006; Roselli y col., 2009). Análisis inmunohistoquímicos y de hibridación in situ revelan la presencia de aromatasa en determinadas regiones del cerebro de vertebrados, en particular en áreas del diencéfalo, como el hipotálamo y el área pre-óptica (APO), y del cerebro límbico, como por ejemplo el hipocampo (Roselli y col., 2009). La concentración de E<sub>2</sub> en cada una de las regiones donde se expresa la enzima aromatasa, es regulada independientemente y puede alcanzar niveles entre 50 y 200 veces superiores a los registrados en la circulación general (Hojo y col., 2004; Overk y col., 2013). A nivel celular, la actividad de la enzima aromatasa se detecta en el soma y en las neuritas de las neuronas. No obstante, el mayor porcentaje de actividad se observa en los botones pre-sinápticos en la superficie de las vesículas sinápticas (Balthazart y Ball, 2006). Más aún, la actividad enzimática es regulada diferencialmente entre ambos compartimentos (soma vs. botón sináptico) dentro de una misma neurona (Cornil y col., 2012). El aumento en la concentración de calcio intracelular como resultado de una despolarización inducida por potasio (Balthazart y col., 2001), o por la activación de los receptores AMPA y kainato de glutamato (Balthazart y col., 2006), resultan en una inactivación rápida (en cuestión de minutos) y reversible de la aromatasa dependiente de fosforilación, sin que se registren cambios en la concentración de la enzima. El ambiente social repercute también sobre la actividad de la aromatasa en regiones específicas del cerebro. En la codorniz japonesa (Coturnix japonica) por ejemplo, la simple observación de una hembra por parte de un macho, resultó en una caída en la actividad de la enzima en cuestión de minutos, únicamente en regiones del cerebro involucradas en la regulación de la motivación sexual y del comportamiento de cópula (Bournonville y col., 2013).

Acorde con la relación bidireccional entre las hormonas y el comportamiento, los cambios locales en la concentración de  $E_2$  regulan a su vez la probabilidad de ejecución de un

comportamiento determinado. Por ejemplo, en 1991 Hayden-Hixson y Ferris encontraron que la infusión directa de  $E_2$  en el hipotálamo anterior del hámster Sirio (*Mesocricetus auratus*), resultaba en un aumento en la frecuencia del comportamiento territorial (Hayden-Hixson y Ferris, 1991). Curiosamente, los cambios comportamentales ocurrieron tan sólo dentro de los 20 minutos luego de la infusión, una escala temporal que es incompatible con los efectos genómicos de los esteroides (de 1 hora a varios días). Sin saberlo, Hayden-Hixson y Ferris, abrían la puerta para cientos de trabajos posteriores que demostraron un efecto del  $E_2$  en el comportamiento a través de vías no-genómicas. Por ejemplo, el E2 es capaz de regular el comportamiento sexual en roedores y aves, la memoria y el aprendizaje social en roedores y la percepción del canto en aves, a través de vías no-genómicas (Heimovics y col., 2015). Estos efectos rápidos son mediados por receptores de membrana como GPR30, proteína de unión-STX, ER-X (con propiedades similares a receptores de membrana acoplados a proteína G), o través de los clásicos receptores nucleares (ERa y ERB), que serían capaces de asociarse a la membrana plasmática e interactuar con proteínas G (Charlier y col., 2010). La interacción ligando-receptor desencadena diversas vías de señalización intracelular que involucran a distintas quinasas y segundos mensajeros (Charlier y col., 2010).

La gran mayoría de los trabajos donde se analizó la relación entre el comportamiento y los estrógenos cerebrales se realizaron en aves. Primero, porque representan uno de los grandes modelos de neuroendocrinología y comportamiento y, segundo, porque la síntesis de estrógenos cerebrales es mayor en el cerebro de las aves con respecto a lo reportado en mamíferos (Callard y col., 1990; Forlano y col., 2006), por lo que su estudio es metodológicamente más sencillo. No obstante, en ningún otro vertebrado estudiado hasta la fecha, la actividad de la enzima aromatasa alcanza niveles tan elevados como los observados en el cerebro anterior<sup>\*2</sup> de peces teleósteos, de entre 100 y 1000 veces superiores a los informados para otros vertebrados (Forlano y col., 2006). En la figura 4 se presenta un pequeño resumen sobre la cronología del estudio de la enzima aromatasa en peces.

#### Aromatasa cerebral de teleósteos

Desde el descubrimiento de la síntesis de estrógenos cerebrales en mamíferos por Frederick Naftolin (1971), se dio inicio a una serie de estudios comparativos que buscaron determinar el grado de conservación evolutiva de la actividad de la enzima aromatasa en el cerebro de vertebrados. El grupo de Gloria Callard de la Universidad de Boston, fue pionero en la detección de la conversión de andrógenos a estrógenos en el cerebro de representantes de todas las clases de vertebrados, y publicó además el primer registro de la síntesis de estrógenos en el cerebro de peces (condrictios y teleósteos) (Callard y col., 1978). En una de sus publicaciones, Callard escribe: *"Los teleósteos parecerían ser un modelo particularmente útil para el estudio de la aromatización [...], porque la actividad es extraordinariamente alta"* (Callard, 1983). En este sentido, la actividad de la enzima aromatasa en el APO e hipotálamo del *goldfish (Carassius auratus)* fue entre 100 y 1000 veces mayor a lo registrado en las regiones homólogas en el cerebro de rata, conejo y hámster, y 10 veces superior que la aromatización de andrógenos en el ovario de la misma especie (Pasmanik y Callard, 1985, 1988). Desde entonces, se ha confirmado la existencia de una tasa elevada de metabolización de andrógenos a estrógenos en el cerebro de varias especies de teleósteos (*Heteropneustes fossilis*: Aggarwal y col., 2014; *Salmo salar*: Anderson y col., 1988; *Gasterosteus aculeatus*: Borg y col., 1986; *Dicentrarchus labrax*: Gonzalez y Piferrer, 2002; *Clarias gariepinus*: Timmers y Lambert, 1987).

Cuando Callard y col. quisieron estudiar la variación estacional de la expresión del gen de aromatasa cyp19a1 en cerebro y ovario de C. auratus, obtuvieron la secuencia del ARN mensajero de un librería de ADNc (ADN copia) creada a partir de cerebro (Callard y Tchoudakova, 1997; Gelinas y col., 1998). Para su sorpresa, sin embargo, al utilizar la secuencia obtenida como sonda de hibridación en un estudio de Northern blot, no obtuvieron una señal de respuesta en el ovario (Callard y Tchoudakova, 1997). Sospechando de "la posibilidad de dos especies de ARN mensajero distintos", Callard y Tchoudakova (1997) replicaron el experimento partiendo desde una biblioteca de ADNc de ovario. Efectivamente, detectaron la presencia de dos formas de ARN mensajero de aromatasa, uno de mayor expresión en el cerebro y otro de mayor expresión en las gónadas, con alrededor de un 64% de homología entre las variantes. Más aún, un análisis de Southern blot reveló uno o dos loci para la variante gonadal, y un único loci diferente para la variante cerebral. Para confirmar que se trataba de un patrón generalizado de teleósteos y no de un caso particular de la carpa dorada, Callard y Tchoudakova (1997) repitieron el análisis en el pez cebra (Danio rerio), obteniendo el mismo patrón que sugirió la existencia de dos genes distintos que codifican para la enzima aromatasa de teleósteos: una variante de expresión preferencial en el cerebro (cyp19a1b) y una variante de expresión preferencial en las gónadas (cyp19a1a). Desde entonces, se ha confirmado la presencia de ambos genes de aromatasa en todas las especies de peces teleósteos analizados (Algunos ejemplos: Oreochromis niloticus: Chang y col., 2005; Oncorhynchus mykiss: Dalla Valle y col., 2002; Ictalurus punctatus: Kazeto y Trant, 2005; Sebastes schlegelii: Kwon y Kim, 2013; Odontesthes bonariensis: Strobl-Mazzulla y col., 2005; Monopterus albus: Zhang y col., 2008), a

excepción de los anguílidos (Elopomorpha), que cuentan con un único gen de la enzima (Ijiri y col., 2003; Tzchori y col., 2004).

Si bien el descubrimiento de la variante cerebral de la aromatasa en teleósteos es relativamente reciente, su historia evolutiva se remonta a más de 320 millones años atrás. En la base del linaje que dio origen a los peces teleósteos, hace aproximadamente 320-350 millones de años habría ocurrido una duplicación del genoma completo (tercera ronda de duplicación de genoma completo en vertebrados, TRDGC) (Amores y col., 2011). Luego de la duplicación, el destino más probable es la perdida de una de las copias de los genes duplicados (Watterson, 1983). Sin embargo, en algunas ocasiones ambas copias persisten y pueden adquirir propiedades funcionales especializadas dentro de la función ancestral del gen (proceso conocido como subfuncionalización), o verse involucradas en funciones novedosas (neofuncionalización) (Force y col., 1999). Se estima que las variantes de cyp19a1 presentes en teleósteos habrían surgido durante la TRDGC, por lo que se trataría de dos genes parálogos producto de un proceso de subfuncionalización, a diferencia del único gen presente en el resto de los vertebrados\*<sup>3</sup>, con la excepción de los Suiformes (cerdos y pecaríes) con dos o tres parálogos funcionales (Choi et al., 1997; Corbin et al., 2007). La presencia de un único gen de la enzima en los anguílidos, un grupo basal de peces teleósteos, se cree sería consecuencia de la pérdida de la segunda copia del gen poco después de la TRDGC (Jeng y col., 2012). Una hipótesis alternativa sugiere que la TRDGC habría ocurrido posteriormente a la separación de los anguílidos del resto del linaje teleósteo. Sin embargo, el genoma de la anguila Europea (Anguilla anguilla) y la anguila Japonesa (Anguilla japonica), dos anguílidos, presenta evidencia de haber experimentado una duplicación, como lo es la presencia de ocho complejos de genes Hox, al igual que en el genoma de la mayoría de los peces teleósteos, y a diferencia de lo observado en los tetrápodos con tan sólo cuatro copias (Amores y col., 1998; Guo y col., 2010; Henkel y col., 2012).

El proceso de subfuncionalización que habría moldeado la divergencia entre la variante cerebral y la gonadal del gen de la aromatasa en teleósteos, queda en evidencia al analizar las propiedades cinéticas y de expresión génica de la enzima. En 2002 Alicia González y Francesc Piferrer, movilizados por el reciente descubrimiento de la presencia de dos genes para aromatasa en teleósteos, realizaron el primer estudio de las características cinéticas de ambas variantes de la enzima en el robalo (*D. labrax*). González y Pifferer (2002) encontraron que las enzimas presentaban igual grado de afinidad por el sustrato (evaluado a través de la constante de Michaelis-Menten), pero sin embargo, la velocidad máxima de la reacción (V<sub>max</sub>) fue cuatro

<sup>\*&</sup>lt;sup>3</sup> Hasta al momento la presencia del gen de la enzima aromatasa (*cyp19a1*) ha sido identificada únicamente en animales del filo Chordata, detectándose una única copia del gen en ejemplares de 14 Cephalochordata, Elasmobranchii y Vertebrata (a excepción de teleósteos y Suiformes). Actualmente no se cuenta con información sobre Urochordata, Ciclostomi, peces Actinopterygii basales y peces Sarcopterygii (Balthazart y Ball, 2012).

veces mayor para la variante cerebral con respecto a la gonadal. Por otro lado, y retomando los estudios pioneros de Callard y col., donde se observó que la aromatización de andrógenos era 10 veces mayor en el cerebro con respecto al ovario de *C. auratus* (Pasmanik y Callard, 1985), se halló que tales niveles de actividad se desprendían de una expresión génica más elevada de la variante cerebral (Callard y Tchoudakova, 1997). Años más tarde, Kazeto y col., (2001), describían las bases moleculares que permitieron explicar los niveles elevados de expresión de la aromatasa cerebral. En la región del promotor del gen *cyp19a1b* del pez cebra, y no así para *cyp19a1a*, detectaron la presencia de un elemento de respuesta a estrógenos (ERE, del inglés *estrogen response element*) (Kazeto y col., 2001). El ERE se encuentra perfectamente conservado en la secuencia promotora de *cyp19a1b* de teleósteos, lo que probablemente esté indicando un importante mecanismo de regulación (Diotel y col., 2010). Efectivamente, los productos de la acción enzimática, los estrógenos, promueven la expresión del gen de aromatasa cerebral actuando a través del elemento ERE (Callard y col., 2001; Diotel y col., 2010; Pasmanik y col., 1988). Este mecanismo de retroalimentación positivo, probablemente sea la base de los niveles de expresión elevados de la variante cerebral.

En el cerebro de teleósteos, al igual que en el resto de los vertebrados, la mayor concentración de actividad y niveles de expresión de la aromatasa se observan en el cerebro anterior, particularmente en el hipotálamo y en el APO (Diotel y col., 2010). Sin embargo, no fue hasta el año 2001 cuando Forlano y col. (2001) revelaron la identidad y la localización de las células que expresan aromatasa en el cerebro de teleósteos. Utilizando protocolos de hibridación in situ, de inmunohistoquímica y de doble inmunofluorescencia, encontraron que, a diferencia del resto de los vertebrados, en el pez sapo (Porichthys notatus) la aromatasa no se expresaba en neuronas, sino en un tipo particular de célula glial, las células gliales radiales (Forlano y col., 2001). Las células inmunomarcadas se localizaron en regiones periventriculares, y presentaron un pequeño cuerpo celular próximo al ventrículo, con delgadas y largas proyecciones citoplasmáticas que penetraban varios milímetros hacia el interior del cerebro, en ocasiones alcanzando la superficie basal del mismo (Forlano y col., 2001), todas características morfológicas típicas de células gliales radiales (Bentivoglio, 1999; Rakic, 1990). Más aún, en el análisis de doble inmunofluorescencia, Forlano y col. (2001), no observaron colocalización de aromatasa con un marcador neuronal, pero sí con un marcador de células gliales radiales en peces (proteína glial fibrilar ácida, GFAP). El patrón de distribución neuroanatómico general, junto con la identidad de las células que catalizan la aromatización de andrógenos descripta en P. notatus, fueron confirmados en todas las especies de peces teleósteos analizadas posteriormente, donde se estudió la localización de aromatasa cerebral

15

en el cerebro (*O. mykiss*: Menuet y col., 2003; *O. bonaerensis*: Stobl-Mazzulla y col., 2005; *Oryzias latipes*: Takeuchi y Okubo, 2013; *D. rerio*: Tong y col., 2008), incluyendo, curiosamente, a los anguílidos (Jeng y col., 2012).

En lo que respecta al estudio de la relación entre la síntesis de estrógenos cerebrales y el comportamiento en teleósteos, éste se encuentra recién en sus primeros pasos. Muy pocos trabajos analizaron específicamente el papel potencial de la variante cerebral de aromatasa en la regulación del comportamiento y viceversa (Black y col., 2011; Gonçalves y col., 2007; Hallgren y col., 2006; Huffman y col., 2013; Iwata y col., 2012; Maruska y col., 2013). No obstante, algunos mecanismos parecen estar conservados en teleósteos, aves y mamíferos. Por ejemplo y, de manera similar a lo informado para aves y mamíferos (Cornil y col., 2015), en machos de C. auratus el tratamiento intraperitoneal con una única dosis de E2 aumentó específicamente la motivación sexual de los peces dentro de los 20 minutos luego de la inyección, escala temporal que es compatible únicamente con los mecanismos de acción nogenómicos (Lord y col., 2009). Más aún, el tratamiento con testosterona emuló los resultados obtenidos para E<sub>2</sub>, mientras que la inyección simultánea de testosterona con el inhibidor específico de aromatasa, fradozol, abolió este efecto (Lord y col., 2009), lo que sugiere una clara participación de la aromatización de andrógenos en la regulación del comportamiento sexual. Recientemente, se identificó la presencia del receptor de estrógenos de membrana GPR30 en la retina y el cerebro de C. auratus, incluyendo áreas involucradas en la regulación del comportamiento sexual (Mangiamele y col., 2016). Por otro lado, el comportamiento social repercute también sobre la actividad de la aromatasa cerebral de teleósteos. En el pez hermafrodita Lythrypnus dalli, la eliminación del único macho del grupo social, estimula rápida y fuertemente un aumento en el comportamiento agresivo de la hembra dominante, que eventualmente de siete a diez días cambiará a macho (Black y col., 2011). El incremento en la agresividad sería responsable de la caída en la actividad de aromatasa cerebral, lo cual correlaciona negativamente con el aumento en la frecuencia de comportamientos agresivos (Black y col., 2011).

En las últimas décadas, un grupo particular de peces teleósteos se consolidó como modelo para el estudio de la endocrinología del comportamiento, como consecuencia de la gran diversidad de sistemas sociales que presentan: los peces cíclidos.

16

#### Cíclidos

La Familia Cichlidae (Orden: Perciformes) constituye uno de los mayores grupos de teleósteos, con 224 géneros y alrededor de 1687 especies descriptas (Froese y Pauly, 2016). La gran mayoría de los cíclidos habita ambientes dulceacuícolas, mientras tan sólo unas pocas especies frecuentan aguas salobres. Se distribuyen principalmente en África y también en Centro y Sudamérica, Indias Occidentales, Madagascar, Israel, Siria, Sri Lanka y áreas costeras de la India (Nelson, 2006).



**Figura 4.** Número de publicaciones por año sobre aromatasa en peces (período 1978-2012). Modificado de Balthazart y Ball, 2012.

Los cíclidos se caracterizan por poseer narinas simples y la línea lateral interrumpida. El número de radios duros o espinosos de la aleta dorsal varía entre 7 y 25, mientras que el de radios blandos oscila entre 5 y 30. La aleta anal presenta entre 3 y 5 espinas (3 en la mayoría de las especies) y de 5 a 30 radios blandos. El número de vértebras varía entre 24 y 42 (Nelson, 2006).

El estudio de la neuroendocrinología del comportamiento social requiere de un modelo animal con ciertas características. Entre las más obvias se encuentra la ejecución de

comportamiento social que resulte observable, cuantificable y de fácil análisis. Por otro lado, los elementos y procesos neuronales y endocrinos del modelo deben ser de fácil acceso para el investigador. Durante los últimos años, el laboratorio de Neuroendocrinología y Comportamiento (DBBE-UBA, IBBEA-CONICET, FCEyN, UBA) ha caracterizado las bases fisiológicas del comportamiento social del cíclido Neotropical, *Cichlasoma dimerus*, localmente conocido como chanchita, el cual consideramos cumple con todos los requisitos para desempeñarse como un modelo animal apropiado para el estudio del diálogo entre el comportamiento, el entorno social, y los sistemas endocrino y nervioso.

#### Cichlasoma dimerus

Cichlasoma dimerus (Figura 5) habita en aguas quietas, vegetadas y poco profundas de las cuencas de los ríos Paraná y Paraguay desde Brasil hasta el norte de la provincia de Buenos Aires (Figura 6). Se trata de una especie con territorialidad estacional y monogamia serial, en la cual la defensa del territorio es compartida por ambos miembros de la pareja. La chanchita presenta un complejo sistema jerárquico de dominancia que determina el acceso a los territorios reproductivos entre machos y hembras. Mientras que la dominancia en los machos es del tipo lineal $^{*4}$ , y por lo general dependiente del tamaño corporal, en el caso de las hembras la situación es menos clara y parece estar determinada por su estado fisiológico y reproductivo (Alonso y col., 2011). Los ejemplares de chanchita pueden clasificarse en dos grandes grupos, chanchitas territoriales y chanchitas no-territoriales, según posean o no un territorio reproductivo. La pertenencia a un estatus social (territorial vs. no-territorial), está acompañada por un repertorio comportamental, y un perfil endócrino y neuronal distintivo (Alonso y col., 2011; Morandini y col., 2014; Ramallo y col., 2012). A su vez, la chanchita es una especie con cuidado biparental de los huevos y las larvas, en donde tanto en hembras (Tubert y col., 2012) como en machos (Birba y col., 2015) los perfiles hormonales y comportamentales varían a lo largo del período de cuidado parental a la par del desarrollo de las larvas.

\*<sup>4</sup> Estructura social en la que existe una categorización lineal o casi lineal, en donde cada animal es dominante sobre aquellos de menor rango, y sumiso con respecto a aquellos de mayor posición en la jerarquía (A>B>C>D...).



Figura 5. Fotografía de un ejemplar de *Cichlasoma dimerus*, localmente conocido como la chanchita.



**Figura 6.** (a) Mapa de la distribución *Cichlasoma dimerus*. Cuanto más roja es la marca, mayor es la probabilidad de ocurrencia de la especie. Fuente: Fishbase, Froese y Pauly, 2016. (b) y (c) Fotografías del ambiente natural de *C. dimerus*, en Esperanza, Santa Fe, Argentina, de donde provinieron algunos de los ejemplares utilizados en la tesis. Fotografías por Leonel Morandini.

En conjunto, las características de la chanchita la convierten en un modelo ideal para el estudio de la relación entre aromatasa cerebral y el comportamiento social. Por esto último, y en base a lo expuesto previamente, se planteó la hipótesis que la expresión génica de la enzima aromatasa cerebral en el cerebro de chanchita, varía con el estatus social y el estatus reproductivo de los individuos. Consecuentemente, el objetivo general del presenta trabajo de tesis, fue caracterizar el sistema de síntesis de estrógenos cerebrales y su asociación con el comportamiento agresivo y sumiso en canchitas de distinto estatus social y a lo largo del período de cuidado parental. En concreto, los objetivos específicos fueron:

- Caracterizar el ARN mensajero y la secuencia aminoacídica deducida de la enzima aromatasa cerebral de la chanchita.
- Analizar la distribución neuroanatómica de aromatasa cerebral en machos y hembras.
- Analizar los niveles de expresión de aromatasa cerebral en cerebro e hipófisis de chanchitas de distinto estatus social (territorial vs. no-territorial) y su relación con la variabilidad interindividual en el comportamiento agonístico.
- Evaluar los perfiles de expresión de aromatasa cerebral en cerebro e hipófisis durante el período de cuidado parental.

## **Capítulo** I

*"En definitiva, lo importante es empezar. No importa cómo, luego habrá tiempo para pensar en los detalles."* 

Alain- Filósofo



# [¿QUÉ? ¿CÓMO? Y ¿DÓNDE?]

En este capítulo se describen y analizan las estructuras primaria, secundaria y terciaria predichas de la enzima aromatasa cerebral de chanchita. A su vez, se presenta un estudio inmunohistoquímico de la distribución neuroanatómica de aromatasa cerebral en el cerebro de chanchitas machos y hembras, utilizando un anticuerpo anti una región conservada de aromatasas de teleósteos. Esta información representa los cimientos sobre los cuales se construyó el análisis subsiguiente de la relación entre la expresión de aromatasa cerebral y el comportamiento social en chanchita.



Previo al inicio del estudio de la relación de aromatasa cerebral con el comportamiento social y reproductivo fue necesario conocer en detalle el sustrato de partida: ¿qué es, cómo es, y dónde se encuentra la aromatasa cerebral de chanchita? Existe un número creciente de trabajos en donde se analizó la estructura del gen, del ARN mensajero y de la proteína de la aromatasa cerebral de teleósteos (Böhne y col., 2013; Kumar y col., 2015). Esta información es de gran valor, sobre todo a nivel comparativo, y permite realizar inferencias sobre el grado de conservación estructural y funcional de la enzima, así como también provee evidencia sobre el efecto del entorno ecológico y social sobre la expresión de genes y la estructura cerebral en general.

En particular, el conocimiento sobre las regiones del cerebro y los núcleos neuronales donde se expresa aromatasa cerebral, y donde por lo tanto puede ejercer un efecto local, es de vital importancia para la comprensión integral de la regulación del comportamiento por estrógenos cerebrales. Si bien en algunos trabajos se analizó la expresión de aromatasa cerebral en regiones puntuales del cerebro de peces cíclidos (Huffman, y col., 2013; Maruska y col., 2013), no se encontró hasta el momento de la realización de este trabajo de tesis un estudio publicado de la distribución de la enzima en las distintas regiones cerebrales del cerebro completo de un pez cíclido.

Los objetivos de este capítulo se centraron, por lo tanto, en la caracterización del ARN mensajero, la secuencia aminoacídica deducida de la enzima aromatasa cerebral de chanchita, y el análisis de su distribución neuroanatómica tanto en machos y hembras. Esta información, junto con la puesta a punto de diversas técnicas que permitieron generarla, estableció las bases para los estudios comportamentales más complejos y multidisciplinarios que se detallan en los capítulos 2 y 3.

Metodología

#### Animales

Los ejemplares adultos de *C. dimerus* utilizados durante el desarrollo del presente trabajo de tesis, fueron capturados por pescadores locales en la región de Esteros del
Riachuelo (27°35'S; 58°45'W; Corrientes, Argentina), empleando redes de arrastre. Luego se los trasladó a las instalaciones del Bioterio de Animales no Tradicionales de la facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (UBA), en donde se mantuvieron en acuarios grupales de entre 8 y 10 peces. Cada acuario estuvo compuesto por una pecera de 150 litros con una capa de grava de dos centímetros de alto recubriendo el fondo, plantas artificiales y piedras de mediano tamaño, tratando de simular el hábitat de *C. dimerus*. Las condiciones de fotoperiodo y temperatura de los acuarios se fijaron de manera tal que emularan las características de su ambiente natural (Almirón y col., 2008) durante el período reproductivo: 25 ± 2 ° C y 14:10 hs luz:oscuridad utilizando tubos fluorescentes de espectro completo. Los peces fueron alimentados una vez por día utilizando pellets de alimento balanceado para peces (Koi Vibrance Color Enhancer Fish Food - Tetra). Una vez por mes se llevó a cabo la limpieza de los acuarios mediante cambios parciales de agua de alrededor del 30%, reemplazándola por agua limpia y libre de cloro.

El proyecto de tesis contó con la aprobación de la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA y se desarrolló dentro de las pautas establecidas por el Comité Nacional de Ética en la Ciencia y la Tecnología, del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (MINCyT).

#### Caracterización de la secuencia del ARN mensajero de aromatasa cerebral

Se inició la descripción de la enzima aromatasa cerebral de chanchita, a través del estudio de la secuencia nucleotídica de su ARN mensajero. Para ello se seleccionaron al azar 4 chanchitas macho y 3 hembras de los acuarios grupales. Debido a la dificultad en esta especie para diferenciar entre machos y hembras fuera del estadio reproductivo, los ejemplares utilizados fueron individuos territoriales de pre-puesta, momento en cual el dimorfismo sexual es más marcado (Alonso y col., 2011). Los individuos fueron anestesiados en un recipiente conteniendo 0,1% del anestésico benzocaína disuelto en alcohol 70°. Cuando los animales cesaron de respirar, evidenciado a través de la inmovilidad de los opérculos, se procedió con la medición de su longitud total (distancia entre el extremo anterior y el extremo posterior de la aleta caudal), longitud estándar (distancia entre el extremo anterior y el final del pedúnculo caudal), y se registró el peso corporal. Posteriormente continuamos con la eutanasia de los peces mediante su decapitación a la altura del opérculo. Rápidamente, utilizando material de cirugía desinfectado en alcohol 70°, se procedió con la disección del cerebro. Como se mencionó en el capítulo "Introducción", en la totalidad de los peces teleósteos analizados

hasta el momento, la expresión de aromatasa cerebral fue mayor en el cerebro anterior. Por lo tanto, y para aumentar la proporción del ARN mensajero de *cyp19a1b* con respecto a otros mensajeros, se optó por disecar aún más el cerebro, de manera tal de que el telencéfalo y derivados del diencéfalo (APO, epitálamo, tálamo e hipotálamo) fueron procesados para la extracción de ARN, mientras que se descartaron el cerebelo, el saco vasculoso, los *tecta optica* y la medula.

Inmediatamente luego de la disección, el cerebro anterior de cada pez fue colocado en 200 µL de RNAzol<sup>®</sup> RT (MRC) en baño de hielo y homogeneizado utilizando un homogeneizador de mano Bio-Gen Pro200. Los homogenatos se almacenaron a -20°C hasta el momento en que se continuó con la extracción química del ARN, basada en su solubilidad diferencial en agua, alcohol y RNAzol, acorde a las instrucciones del fabricante para ARN mensajeros. Una vez finalizada la extracción, las muestras de ARN se re-suspendieron en agua previamente tratada con el inhibidor de RNAsas, dietilpirocarbonato (DEPC), y el ARN total se cuantificó utilizando un espectrofotómetro, a través del registro de la absorbancia a 260 nm. El cociente entre las absorbancias a 260 nm y 280 nm se utilizó como indicador de la pureza de la muestra y de la eficiencia de la extracción. El volumen correspondiente a 2 µg de ARN se utilizó para la síntesis de la primera hebra de ADN-copia (ADNc) de cada una de las siete muestras, mientras que el remanente se almacenó a -80°C.

Para eliminar cualquier posible contaminación por ADN genómico que pudiese haber sido arrastrado durante la extracción, las muestras se trataron con ADNasa I (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos a 37°C. La mitad del volumen de cada muestra tratada con ADNasa I se reservó para su evaluación como control del correcto funcionamiento de la enzima (ver más adelante), mientras que la otra mitad (1 µg de ARN) se empleó para la síntesis de ADNc, utilizando la enzima retro-transcriptasa M-MLV (Invitrogen) de acuerdo a las indicaciones del fabricante en combinación con oligo (dT) o hexámeros al azar.

Para obtener la secuencia nucleotídica completa de la región codificante del ARN mensajero de aromatasa cerebral, en una primera instancia se alinearon las secuencias de cíclidos otros peces presentes la base de datos GenBank en (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/): Neolamprologus brichardi (XM 006789168), Oreochromis mossambicus (AF135850) y Oreocrhomis niloticus (NM\_001279590). A partir del alineamiento se diseñó un par de primers sobre regiones con un alto grado de conservación entre las secuencias analizadas (ChanchabaF y ChanchabaR; Tabla 1). Para el diseño se utilizó la herramienta en línea Primer *Quest* de Integrated DNA Technologies (IDT)

24

(https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index), y se analizó la posible presencia de hetero- y homodimeros y horquillas (*hairpins*) con el programa *DNA-Star Lasergene*. Se seleccionó al azar una de las muestras de ADNc de cerebro de chanchita y se utilizó como molde en una reacción de PCR (del inglés: *polymerase chain reaction*), junto con los *primers* diseñados (concentración final 0,5 μM). Se utilizó la enzima GoTaq<sup>®</sup> ADN polimerasa (Promega). Para detectar la temperatura óptima de alineamiento para el set de *primers*, se realizó una reacción de PCR con gradiente de temperatura: 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58 y 60°C. Para controlar la eventual formación de dímeros de *primers*, o la contaminación de alguno de los reactivos empleados, se realizó en paralelo un control negativo, en donde el volumen de ADNc fue reemplazado por su equivalente en agua. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes:

95ºC por 5 minutos: 1 Ciclo

95°C por 15 segundos

44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58 o 60 °C por 20 segundos

72ºC por 30 segundos

72ºC por 10 minutos: 1 Ciclo

Los productos de PCR se resolvieron mediante una electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 2%, pre-tratado con SYBR Safe (Invitrogen), y se revelaron en un transiluminador UV. En paralelo se sembraron alícuotas del control de la enzima ADNasa I y el control negativo. Tras la observación del gel, se seleccionó una temperatura de 60 °C como la óptima de la reacción, en base a la mayor intensidad de la banda del tamaño esperado con respecto a la resultante en las otras temperaturas. Por otro lado, no se observó la formación de dímeros de *primers* y no se detectaron bandas en las calles correspondientes al control negativo y de la enzima ADNasa I. Una vez determinadas las condiciones óptimas, se procedió con una nueva amplificación del posible fragmento de aromatasa cerebral de la chanchita mediante una reacción de PCR, de manera tal de obtener un producto en cantidad suficiente para su secuenciación. Las condiciones de ciclado fueron idénticas a las ya mencionadas, a excepción de la temperatura de alineamiento que fue de 60 °C. El volumen de reacción total fue de 100 µL (8 µL dNTPs, 1 µL Mg<sup>2+</sup>, 5 µL primer Forward, 5 µL primer Reverse, 20 µL 5X Reaction Buffer, 0,5 µL GoTaq ADN polimerasa, 1 µL ADNc y 59,5 µL agua autoclavada).

40 Ciclos

Una vez resuelto el producto de PCR a través de una electroforesis horizontal en un gel de agarosa 1%, se procedió con su purificación. Utilizando un bisturí se recortó la banda del tamaño esperado, y se continuó con el protocoló del kit de purificación en columnas Accuprep (Bioneer). El producto purificado se re-suspendió en agua autoclavada y se secuenció a través del método de Sanger (equipo ABI 3130xl Genetic Analyzer de Applied Biosystems) por el Servicio de Secuenciación y Genotipificado del departamento de Ecología, Genética y Evolución, de la FCEyN, UBA. Una vez que se obtuvieron los resultados de la secuenciación, la identidad del fragmento fue confirmada utilizando **BLASTN** (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/) del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

A partir de la obtención de la secuencia parcial de aromatasa cerebral, se continuó con la amplificación y posterior secuenciación de las regiones aledañas, para lo cual se diseñaron nuevos conjuntos de pares de primers. Cada set de primers estuvo conformado por un primer específico de chanchita "anclado" en la región ya conocida de la secuencia y un primer por fuera de la misma, basado en regiones conservadas del ARN mensajero de aromatasa cerebral de peces cíclidos (Tabla 1). Para la amplificación de los extremos 3' y 5' se contó con ADNc de un cerebro de hembra con adaptadores de secuencia conocida ligados en ambos extremos (primers GeneRacer<sup>™</sup> en la tabla 1). El ADNc fue sintetizado por el Dr. Maximiliano Cánepa utilizando el kit GeneRacer<sup>™</sup> (Invitrogen) basado en el método conocido como "Amplificación rápida de los extremos 3' y 5' mediados por ligasa de ARN" (Cánepa y col., 2012). En todos los casos, se procedió de igual manera que para el fragmento secuenciado inicialmente, buscando en primera instancia la temperatura óptima de alineamiento de cada par de primers, seguido de la reacción de amplificación de la secuencia parcial, secuenciación y confirmación de su identidad a través de BLASTN. Cada ADNc fue utilizado como molde con un máximo de dos pares de primers distintos, de manera tal de garantizar que los ocho individuos se encontrasen representados en la secuencia final. Por último, los fragmentos parciales fueron alineados y conectados entre sí por las regiones superpuestas, de manera tal de obtener la secuencia completa del ADNc de aromatasa cerebral de chanchita.

#### Análisis de la secuencia aminoacídica predicha de aromatasa cerebral de chanchita

Utilizando la herramienta en línea ExPASy Translate (http://web.expasy.org/translate/) se tradujo la secuencia nucleotídica a su correspondiente secuencia aminoacídica. Esta herramienta permite evaluar los tres marcos de lectura posibles y seleccionar aquel correspondiente al péptido de interés. Para verificar su identidad se realizó una búsqueda en

26

BLASTP (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins) del NCBI, introduciendo la presunta secuencia aminoácidica de aromatasa cerebral de chanchita como consulta. A su vez, a partir de los resultados de la búsqueda en la base de datos del NCBI, se seleccionaron varias secuencias aminoacídicas completas de aromatasas de otros peces teleósteos (tanto cerebral como gonadal) para la construcción de un árbol filogenético. Para ello se realizó un alineamiento múltiple utilizando la herramienta en línea ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/), y el resultado se empleó para la construcción del árbol acorde al método de máxima verosimilitud en el marco del modelo de Jones-Taylor-Thornton (Jones y col., 1992), con un total de 1000 remuestreos (bootstrap replications), utilizando el programa Mega 5.06 (Tamura y col., 2011). Se utilizó la raya hocicona o enana, Dasyatis sabina, como grupo externo dado que al tratarse de un pez condrictio presenta una única variante de la enzima aromatasa.

**Tabla 1.** Listado de *primers* utilizados para la amplificación y secuenciación del ADNc de aromatasa cerebral de chanchita. El asterisco indica los *primers* específicos de la chanchita. En los *primers* degenerados, la letra Y indica C o T, acorde a la nomenclatura IUPAC.

Nombre	Secuencia (5′ → 3′)	Región del	Temperatura de	
		amplicón (pb)	alineamiento	
GeneRacer™ 5′ Nested	GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA			
ChanchabaR 5'	AGAACTGTTTGCCAGGTC*	<0-757	53,5 °C	
ChanchabaF	TCTAAAGCTCTGACTGGAC	F17 920	60 °C	
ChanchabaR	CCTGTGCTGCTCTCTTATG	517-820		
ChanchabaF.1	AGCCTGCAGGATATGACTGAC*	F02 12F7	52,5 °C	
ChanchabaR.1	CCAGTCGTTACTTCCAGC	592-1357		
ChanchabaF.2	CTTCATGCYGATGCTGCTG	1020 1200		
ChanchabaR.2	TGCCCACACAGGAACGAG*	1020-1390	53,5 °C	
ChanchabaF.3	TCTTCATGCTGATGCTGCTG*	1010 1400		
ChanchabaR.3	TCACCATGGCGATGTGTTTG*	1019-1409	55 °C	
ChanchabaF 3'	GGCACCAACATCATTCTC*	1742 \1042		
GeneRacer™ 3' Nested	CGCTACGTAACGGCATGACAGTG	1243- 21042	55,5 C	

Para visualizar el grado de conservación espacial de la proteína predicha, se procedió a modelar la estructura tridimensional de la misma. Se empleó el programa en línea de reconocimiento de homología/analogía de proteínas Phyre2 (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/) desarrollado por Kelley y col., 2015. El mismo compara la estructura primaria de la proteína con una base de datos para construir un perfil evolutivo o estadístico de la secuencia, y seguidamente contrastar el perfil creado con una base de perfiles de proteínas cuyas estructuras son conocidas experimentalmente (ej. por cristalización). Esto resulta en un alineamiento entre la secuencia cuya estructura tridimensional es desconocida y aquella de perfil altamente similar, de estructura conocida. Por lo tanto, a partir del alineamiento fue posible modelar tridimensionalmente la enzima aromatasa cerebral de chanchita.

### ¿Aromatasa cerebral fuera del cerebro? Análisis de la expresión de aromatasa cerebral en distintos órganos

Se analizó el patrón de expresión del ADNc de aromatasa cerebral en distintos órganos. Para ello, de dos machos y dos hembras seleccionados al azar, luego de la disección del cerebro, se disecaron además la hipófisis, el corazón, gónada (derecha o izquierda al azar) y bazo, y una sección del hígado, branquia, intestino medio, músculo (de la región del tronco dorsal), riñón cefálico y riñón troncal. Los distintos órganos fueron colocados en tubos individuales con 200 µL de RNAzol fríos, homogeneizados y procesados para la extracción del ARN mensajero y síntesis del ADNc, tal y como fue descripto para el caso del cerebro anterior. Debido al pequeño tamaño de la glándula hipófisis, la misma se pre-homogeneizó con un émbolo plástico, previo a la utilización del homogeneizador manual, dado que éste último resultó incapaz de captar y disgregar la hipófisis cuando esta se encontraba entera.

La expresión en los distintos órganos fue evaluada mediante PCR en tiempo real (qPCR del inglés *quantitative* PCR). Para ello fue necesario diseñar un nuevo set de *primers* específicos, de acuerdo con los requerimientos de la técnica. En total se diseñaron cuatro sets de pares de *primers* utilizando la herramienta en línea *Primer Quest* (IDT) y el programa *DNAstar Lasergene* (qPCR-Chanchaba en la tabla 2). Los *primers* se diseñaron sobre regiones de la secuencia de aromatasa cerebral de chanchita que presentaron una baja superposición con la de aromatasa gonadal de otros cíclidos (*Astatotilapia burtoni*: XM\_014329824.1; *O. mossambicus*: AF135851.1; *O. niloticus*: NM\_001279586.1). Para la puesta a punto de los distintos pares de *primers*, se empleó como molde una mezcla de ADNc diluído 1:10 del cerebro anterior de varios machos territoriales y no territoriales de chanchita (ver capítulo 2).

28

Se utilizó una mezcla de ADNc de machos, dado que el set de *primers* seleccionado sería utilizado más adelante para evaluar la expresión de aromatasa cerebral en machos de distinto estatus social, y por lo tanto la puesta a punto se realizó con una muestra representativa de dicha población. Se evaluaron a su vez tres concentraciones de cada par de *primers* (0,3, 0,6 y 1 µM). Cada reacción consistió de 1,5 µL del par de *primers*, 5 µL de FastStart Universal SYBR Green Master (ROCHE), 2,5 µL del ADNc molde y 1 µL de agua autoclavada (volumen final: 10 µL). El FastSart Universal SYBR Green Master contiene la enzima FastStart Taq ADN Polimerasa, el buffer de reacción, mezcla de nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dUTP) y el fluoróforo SYBR Green I. Cada reacción se realizó por duplicado y se utilizó el equipo StepOnePlus<sup>™</sup> Real-Time PCR Systems (Thermo-Fisher Scientific). Las condiciones de ciclado fueron las siguientes:

95ºC por 5 minutos: 1 Ciclo

95ºC por 30 segundos

60 °C por 15 segundos



72ºC por 20 segundos (lectura SYBR Green y Rox)

Curva de disociación (95-60 °C, con una resolución de 0,5 °C)

Los pares de *primers* qPCR-Chanchaba1, 2 y 3 presentaron un alto porcentaje de productos inespecíficos, evidenciado por la presencia de picos en la curva de disociación a bajas temperaturas (Figura 7), y por lo tanto fueron descartados.



**Figura 7**. Curva de disociación para el par de primers qPCR-Chanchaba-2. En el recuadro de línea punteada se muestran picos correspondientes a productos inespecíficos, razón por la cual el par de primers fue descartado. Las curvas azul oscuro corresponden a las réplicas de la concentración de primers de 1 $\mu$ M, las rojizas a 0,6  $\mu$ M y las celestes a 0,3  $\mu$ M. URF= Unidades relativas de fluorescencia, T= temperatura. Para el par qPCR-Chanchaba-4, la concentración de 1 μM resultó la condición en la cual se registró la mayor fluorescencia (Figura 8) y por lo tanto fue seleccionada como la concentración de trabajo.



**Figura 8**. Curva de disociación para el par de primers qPCR-Chanchaba-4. Las curvas azul oscuro corresponden a las réplicas de la concentración de primers de 1 $\mu$ M, las rojizas a 0,6  $\mu$ M y las celestes a 0,3  $\mu$ M. URF= Unidades relativas de fluorescencia, T= temperatura.

Con el fin de determinar la eficiencia de la reacción para el par de *primers* qPCR-Chanchaba-4 en una concentración de 1  $\mu$ M, se llevó a cabo una nueva reacción de qPCR utilizando como molde 8 diluciones seriadas (factor de dilución: 2X) de la mezcla de ADNc de cerebros de machos. Las condiciones de la reacción y ciclado fueron idénticas a las utilizadas previamente durante la puesta a punto de los *primers* y las reacciones se realizaron por duplicado. La relación entre ciclo umbral (Ct, el ciclo al cual la fluorescencia de cada muestra supera una fluorescencia umbral, del inglés *Cycle threshold*) y el logaritmo de la cantidad de ADNc molde (o en este caso, el factor de dilución) es lineal cuando la eficiencia de la reacción es del 100%, en donde en una situación ideal el sustrato de PCR se duplica luego de cada ciclo de amplificación. Es posible estimar la eficiencia del par de *primers* qPCR-Chanchaba-4 a partir de la pendiente de la recta (Figura 9), acorde a la relación 'Eficiencia%=(10<sup>-1/PENDIENTE</sup> -1) X 100%'. Por lo tanto, Eficiencia%=(10<sup>-1/-3,2377</sup> – 1) X100% = 103,6%. La eficiencia de amplificación recomendada se halla entre 90 y 105% (Real-Time PCR Applications Guide, 2006), por lo cual el par de *primers* demostró ser adecuado y se lo empleó para el análisis de la expresión de aromatasa cerebral en chanchita. Se evaluó la posible expresión de aromatasa cerebral en cerebro anterior, hipófisis, corazón, gónada, bazo, hígado, branquia, intestino medio, músculo (de la región del tronco dorsal), riñón cefálico y riñón troncal en machos y hembras, utilizando el par de *primers* previamente puesto a punto, a partir de diluciones 1:10 de cada muestra. Se incluyó un control negativo donde el volumen del ADNc fue reemplazado por su equivalente en agua autoclavada (*No template control*). Las condiciones de la reacción de amplificación y ciclado correspondieron a las ya descriptas. La expresión de la fosfoproteína acídica ribosomal PO (ARP, por su siglas en inglés) fue utilizada como gen de referencia. La elección de ARP se sustenta en numerosas publicaciones donde se utilizó como gen de referencia en estudios de expresión génica en chanchita (Delgadin y col., 2014; Pérez Sirkin y col., 2013; Di Yorio y col., 2016). El diseño de los *primers* y su puesta a punto fueron realizados por el Dr. Cánepa como parte de su tesis doctoral (Cánepa y col., 2012). Tanto para aromatasa cerebral, como para ARP, las reacciones se evaluaron por duplicado.



**Figura 9.** Estimación de la eficiencia de amplificación para el par de *primers* qPCR-Chanchaba-4. Curva estándar del Ct cada muestra en función del logaritmo del factor de diluciónl. Arriba a la derecha se presenta la ecuación que describe la recta y el coeficiente de determinación,  $R^2$ ( $F_{1,5}$ =118,39; p<0,001).

Nombre	Secuencia (5′ → 3′)	Tamaño del	Temperatura de	
		amplicón	alineamiento	
qPCR-ChanchabaF-1	CGCTTTGGAGAAAAGTGAGG	210	60 °C	
qPCR-ChanchabaR-1	TTAGTGGCACCCTGAGGAAC	210		
qPCR-ChanchabaF-2	ATCCCACGGACGACATAA	0.9	60. <sup>9</sup> C	
qPCR-ChanchabaR-2	AGGCAGTTACACCCATTTC	98	60 °C	
qPCR-ChanchabaF-3	GCTAGAGTTACGCAGAGGA	04	60.ºC	
qPCR-ChanchabaR-3	AAAGCAGAACGGCAGTG	94	60 °C	
qPCR-ChanchabaF-4	AGAAGCATAAGAGAGCAGCC	1 1 1	60.ºC	
qPCR-ChanchabaR-4	CTCCATGATTCTGAGCGAAG	144	60 C	
ARP-F	TTTGAAAATCATCCAACTTTTGGAT	100	60. <sup>9</sup> C	
ARP-R	GCAGGGACAGACGGATGGT	100		

**Tabla 2.** Listado de *primers* utilizados para el análisis de la expresión de aromatasa cerebral por PCR en tiempo real.

Los datos crudos de fluorescencia por ciclo y de cada reacción fueron analizados con el programa LinReg PCR. El programa en primera instancia realiza una corrección sobre los valores crudos, al estimar y restar la fluorescencia de base (*baseline*), es decir aquella presente previamente a la amplificación de las moléculas molde de ADNc. Luego, a partir de la región lineal de cada una de las curvas de amplificación, se calcula la eficiencia de amplificación individual para cada muestra. El N<sub>0</sub> es el resultado de la combinación de la eficiencia de amplificación promedio del gen evaluado, el Ct, y la determinación del umbral en sí (Ramakers y col. 2003; Ruijter y col. 2009). Los N<sub>0</sub> estimados para aromatasa cerebral se relativizaron a los respectivos N<sub>0</sub> de ARP, y los valores obtenidos se promediaron entre réplicas.

## Análisis inmunohistoquímico de la localización y distribución de aromatasa cerebral en el cerebro de chanchita

Con el fin de conocer las regiones del cerebro de chanchita donde se sintetiza aromatasa cerebral y su localización celular, se llevó a cabo un estudio inmunohistoquímico. Para ello se contó con un anticuerpo elevado en conejo, gentilmente cedido por el Dr. Forlano (The City University of New York, E.E.U.U.), que fue generado para reconocer una secuencia conservada entre los dos tipos de aromatasas de teleósteos (CKLQVLESFINESLRFHPVV), y que ha sido utilizado con éxito en numerosos estudios anatómicos de aromatasa cerebral (Blázquez y Piferrer, 2004; Forlano y col., 2001; Pellegrini y col., 2007; Strobl-Mazzulla y col., 2005). Forlano y col., 2001, evaluaron la especificidad del anticuerpo a través de la pre-adsorción del mismo con exceso del péptido utilizado para su síntesis, no observando inmunomarca en el análisis inmunohistoquímico posterior. Se seleccionaron al azar 4 hembras y 4 machos de chanchita de acuarios grupales, y luego de la anestesia y eutanasia, se disecó con sumo cuidado el cerebro completo (desde los bulbos olfatorios hasta unos poco milímetros de la médula espinal) de cada uno ellos, asegurándose que la hipófisis permaneciera unida al cerebro en su región ventral. Las piezas se fijaron en solución de Bouin (ácido pícrico saturado: 70%, formaldehido 40%: 25% y ácido acético glacial: 5%) a temperatura ambiente durante 1 hora, y a 4 °C durante aproximadamente 16 hs. Al otro día se continuó con su deshidratación utilizando una serie de alcoholes de concentraciones crecientes y finalmente los cerebros junto con las hipófisis se aclararon en xilol e incluyeron en Paraplast (Fisherbrand, Fisher, Wash) durante 6 horas a 65 °C.

Posteriormente se armaron bloques individuales de Paraplast sólido conteniendo cada una de las piezas, los cuales se fijaron a tacos de madera para luego ser seccionados en un micrótomo de desplazamiento (Leitz Wetzlar) a 12 µm de espesor. La mitad de los cerebros con hipófisis de cada sexo se cortó en el plano transversal, mientras que en la otra mitad los cortes se realizaron en los planos para-sagital y sagital. En ambos casos, los cortes se montaron en portaobjetos recubiertos con gelatina 2%.

Previo a la incubación con los anticuerpos, los cortes fueron desparafinados en xilol, hidratados a través de una serie decreciente de concentraciones de etanol y se lavaron con buffer fosfato salino (PBS, pH 7,4). Parte del proceso de amplificación de la señal inmunohistoquímica involucró un anticuerpo acoplado a la enzima peroxidasa, por lo que se requirió el bloqueo de la actividad de la enzima endógena mediante la incubación de los cortes durante 5 minutos con exceso del producto de la peroxidasa, peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) al 3% en PBS. Los cortes se lavaron con PBS y luego se continuó con el bloqueo de los sitios inespecíficos de unión al anticuerpo primario mediante el uso de leche en polvo descremada 5% en PBS durante 30 minutos.

Posteriormente, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario anti aromatasa de teleosteos en cámara húmeda durante 16 hs a temperatura ambiente. En un ensayo piloto se evaluaron distintas diluciones del anticuerpo: 1:500, 1:1000 y 1:2000, optándose finalmente por la dilución 1:1000 que permitió obtener una buena intensidad de la inmunomarca (observación personal), en un tiempo de revelado corto (aproximadamente en 30 segundos).

33

Se realizó un control negativo por omisión del anticuerpo primario en el protocolo de inmunohistoquímica. Este control negativo se realizó sobre cortes transversales de cerebro a la altura del APO, donde se reportó la máxima expresión de aromatasa cerebral en otras especies (Diotel y col., 2010). Luego de un lavado en PBS, los cortes se incubaron durante 1 hora, en cámara húmeda, a temperatura ambiente, con un anticuerpo secundario biotinilado anti IgG de conejo (dilución 1:800) (Sigma, St Louis, MO). Tras un breve lavado en PBS, los cortes se expusieron a una solución de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rabanito de alta actividad (Streptavidin-HRP) en PBS (1:800), durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. El revelado se llevó a cabo con el sustrato de la enzima peroxidasa, 0,1% 3,3' diaminobenzidina (DAB) disuelto en Tris Buffer (pH 7,6) y 0,02% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La reacción se detuvo sumergiendo los portaobjetos en agua destilada.

Por último, se realizó una coloración nuclear suave con hematoxilina de Carazzi y luego los cortes se deshidrataron a través de una serie de alcoholes de concentración creciente, se los aclaró en xilol y finalmente fueron montados en medio de montaje anhidro, DPX. Una vez solidificado el medio de montaje, los cortes se fotografiaron en un microscopio Microphot FX acoplado a una cámara fotográfica (Coolpix 4500, Nikon). Para el reconocimiento de los distintos núcleos neuronales del cerebro de chanchita se utilizaron como referencia dos atlas de neuroanatomía de dos especies Perciformes, el robalo, *Dicentrarchus labrax* (Cerdá-Reverter y col. 2001a, b, 2008) y la tilapia *O. mossambicus* (Simões y col., 2012; http://www.ispa.pt/ui/uie/ibbg/TilapiaBrainAtlas/index.html).

Para conocer la identidad de las células donde se expresa aromatasa cerebral en el cerebro de chanchita, se llevó a cabo un protocolo de doble inmuno-fluorescencia utilizando el anticuerpo anti aromatasa de teleósteos en combinación con anticuerpos que permitiesen distinguir entre los dos tipos celulares que conforman el tejido nervioso, células gliales y neuronas (Tabla 3). Se procedió de igual manera que lo descripto para la técnica de inmunohistoquímica clásica hasta finalizado el bloqueo de los sitios inespecíficos de unión al anticuerpo. En ese momento los cortes se incubaron con una mezcla de dos anticuerpos primarios (anti aromatasa de teleósteos + anti tubulina acetilada, o + anti vimentina, o + anti proteína gliofibrilar ácida (GFAP)) durante 16 horas a 22 °C en cámara húmeda. Tras un lavado en PBS, las muestras se incubaron con una combinación de anticuerpos secundarios durante 90 minutos, a 37 °C, en cámara húmeda y en oscuridad. Por un lado se empleó un anticuerpo secundario anti conejo sintetizado en cabra, conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor 594 (1:100, Molecular Probe) para inmunodetectar el anticuerpo anti aromatasa de teleósteos. Por

otro lado, para inmunodetectar el anticuerpo anti marcador glial o neuronal, se utilizó un anticuerpo secundario anti ratón sintetizado en cabra conjugado con isotiocianato de fluoresceina (FITC, por sus siglas en inglés) (1:100, Sigma Aldrich). Luego de un pasaje por PBS en oscuridad, los cortes se montaron en medio de montaje para fluorescencia (Tecnolab), conteniendo 1 µL de 4,6-diamidino-2-fenilidol (DAPI) para visualizar los núcleos. Las muestras se observaron en un microscopio de fluorescencia (Nikon, Eclipse E600) equipado con una cámara digital (Evolution TM VF Fast Cooled Color 12 bits). Las fotografías tomadas en los distintos canales de fluorescencia se combinaron en una única imagen utilizando el programa Image Pro Plus. Se realizó un control negativo mediante la omisión de los anticuerpos primarios durante el protocolo de inmufluorescencia.

**Tabla 3.** Listado y especificaciones de los anticuerpos utilizados para el estudio de la identidad de las células que sintetizan aromatasa cerebral en el cerebro de chanchita. Se indican además, el conjunto de diluciones evaluadas durante la puesta a punto de cada anticuerpo. El asterisco indica la dilución del anticuerpo finalmente seleccionada.

Nombre	Marcador	Origen	Dilución	
Anti $\alpha$ tubulina acetilada	Microtúbulos de $\alpha$ tubulina acetilada		1:500, 1:100*	
Monoclonal	Neuronas post-mitóticas, centriolo y	Ratón		
(Sigma-Aldrich)	cilias primarias.			
Anti Vimentina Monoclonal (Sigma-Aldrich)	Filamentos intermedios de vimentina Astroglia	Ratón	1:500, 1:100, 1:50	
Anti GFAP Monoclonal (Sigma-Aldrich)	Filamentos intermedios de GFAP Astroglia	Ratón	1:500, 1:250	



#### Análisis de la secuencia del ADNc de aromatasa cerebral de chanchita

Tras el ensamblado de las secuencias parciales de ADNc de aromatasa cerebral de chanchita, se obtuvo un producto de 1842 pares de bases (pb), formado por una región 5'-no traducida (UTR, del inglés untranslated region) incompleta de 78 pb, un marco de lectura abierto de 1566 bp y una región 3'-UTR de 251 pb. La señal de poliadenilación (AAUAAA) putativa se situó 15 pb río arriba de la cola de poli (A) (Figura 10). La secuencia aminoacídica deducida a partir del marco de lectura abierto, presentó 495 amino ácidos y se estimó el peso molecular y punto isoeléctrico promedio del péptido en 56,24 KDa y 8,73, respectivamente, utilizando la herramienta en línea Compute Pi/Mw tool de ExPASY (http://web.expasy.org/compute pi/). Se detectó la presencia de varios posibles dominios transmembrana (Figura 11) mediante el programa en línea TMHMM Sever V. 2.0. (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/), aunque la certeza fue considerablemente mayor (cercana a 1) para la región comprendida entre los amino ácidos 20 y 37. La secuencia aminoacídica predicha presentó todos los dominios descriptos para miembro de la superfamilia citocromo P450 y el dominio característico de aromatasa en vertebrados: región transmembrana (I), región de hélice I (II), región del péptido de Ozol (III), región específica de aromatasas o región aromática (IV) y una región de unión al grupo hemo (V) (Figura 10). Estas regiones presentaron un alto grado de conservación entre los distintos grupos de vertebrados (Figura 12). Por otro lado, luego de realizar una búsqueda en BLASTp introduciendo la secuencia obtenida como consulta, los mayores valores de identidad, es decir la medida en que dos secuencias presentan los mismos residuos en la misma región, se obtuvieron para secuencias de aromatasa cerebral de otras especies de cíclidos como N. brichardi (XP\_006789231.1), O. mossambicus (AAD31030.1), O. niloticus (AAO62626.1), Haplochromis nyererei (XP\_013765009.1), y A. burtoni (XP\_014196620.1) (Tabla 4).

AGG AGG AAG ATC TEC AGG CGG ACT GCA GTC ACA GTG CAT GTG CTC CGT TET GTG TAC CTG GCT AGA GTT ACG CAG AGG ATG CTG CCG GTA bp Met Leu Pro Val 4 180 bp 34 aa ACC ACC TGG AGA CAA AGA AAA CGG TCC CAG GTT CCA GGT CCT CCC TTC TTA GCA GGA CTT GGT CCA GTT CTC TCC TAC AGC AGA TTC ATC 270 bp Thr Thr Trp Arg Gln Arg Lys Arg Ser Gln Val Pro Gly Pro Pro Phe Leu Ala Gly Leu Gly Pro Val Leu Ser Tyr Ser Arg Phe Ile 64 TGG ACT GGG ATT GGA ACA GCG TGC AAC TAC TAC AAC AAC AAA TAT GGT AGC GTT GTG CGG GTG TGG ATT AGT GGA GAG GAG ACC CTG ATT 360 bp Trp Thr Gly Ile Gly Thr Ala Cys Asn Tyr Tyr Asn Asn Lys Tyr Gly Ser Val Val Arg Val Trp Ile Ser Gly Glu Glu Thr Leu Ile 94 aa TTA AGC AGG TCC TCT GAA GTG TAC CAT GTT TTG AGA AGC GCC CAC TAC ACC TCC AGA TTT GGC AGC AAG AAA GGA CTT CAG TGT ATT GGC 450 bp Leu Ser Arg Ser Ser Glu Val Tyr His Val Leu Arg Ser Ala His Tyr Thr Ser Arg Phe Gly Ser Lys Lys Gly Leu Gln Cys Ile Gly 124 ATG TAC GGA AAT GGT ATC ATT TTC AAT AGT GAT GTC CCG CTT TGG AGA AAA GTG AGG ACA TAT TTT TCT AAA GCT CTG ACT GGA CCC GGC 540 bp Met Tyr Gly Asn Gly Ile Ile Phe Asn Ser Asp Val Pro Leu Trp Arg Lys Val Arg Thr Tyr Phe Ser Lys Ala Leu Thr Gly Pro Gly 154 aa CTG CAG AGG ACT GTG GGA ATC TGT GTG AGC TCC ACA GCC AAA CAC CTG GAC AGC CTG CAG GAT ATG ACT GAC CCC TCT GGA CAT GTG GAT 630 bp Leu Gln Arg Thr Val Gly Ile Cys Val Ser Ser Thr Ala Lys His Leu Asp Ser Leu Gln Asp Met Thr Asp Pro Ser Gly His Val Asp 184 23 GCT CTC AAT CTC CTG AGA GCC ATT GTG TTG GAC ATC TCC AAC AGG CTG TTC CTC AGG GTG CCA CTA AAC GAG AAA GAT TTA TTG ATG GCA 720 bp Ala Leu Asn Leu Leu Arg Ala Ile Val Leu Asp Ile Ser Asn Arg Leu Phe Leu Arg Val Pro Leu Asn Glu Lys Asp Leu Leu Met Ala ATT CAC AAC TAC TAT GAG ACC TGG CAA ACA GTT CTA ATA AAG CCC GAT TTA TTC TAC AAG GTG GGA TGG CTG TAC AAG AAG CAT AAG AGA 810 bp Ile His Asn Tyr Phe Glu Thr Trp Gln Thr Val Leu Ile Lys Pro Asp Leu Phe Phe Lys Val Gly Trp Leu Tyr Lys Lys His Lys Arg 244 aa GCA GCC CAA GAG CTG CAA GGT GTG ATG GAG AGC CTG CTT GAA ATT AAG AGA CAG ATG ATT AAA GAA GCT GAG AAA CTG GAT GAT GAT CTT 900 bo Ala Ala Gln Glu Leu Gln Gly Val Met Glu Ser Leu Leu Glu Ile Lys Arg Gln Met Ile Lys Glu Ala Glu Lys Leu Asp Asp Leu 274 aa TT GCA ACG GAG CTC ATC TTC GCT CAG AAT CAT GGA GAG CTT TCA GCA GAT AAT GTC AGG CAG TGT GTG CTG GAG ATG GTG ATT GCA 990 bp Asp Phe Ala Thr Glu Leu Ile Phe Ala Gin Asn His Gly Glu Leu Ser Ala <u>Asp Asn Val Arg Gin Cys Val Leu Glu Met Val Ile Ala</u> 304 aa GCG CCC GAC ACA CTT TCC ATC AGE CTC TTC ATG CTG ATG CTG CTG AAA CAA AAC CCA GAC ATA GAG TTG CAG CTA GTG GAG GAG ATG 1080 bp Leu Ser Ile Ser Leu Phe Phe Met Leu Met Leu Leu Lys Gin Asn Pro Asp Ile Glu Leu Gin Leu Val Glu Glu Met 334 aa Ala Pro Asp Thr II AGC AAC GTC TTG AAC GAT AAA GAA GCA GAA AAC ATC GAT TAT CAA AGT CTG AAA GTG ATG GAG AGT TTC ATC AAC GAG TCT TTG AGG TTT 1170 bp Ser Asn Val Leu Asn Asp Lys Glu Ala Glu Asn Ile Asp Tyr Gln Ser Leu Lys Val Met Glu Ser Phe Ile Asn Glu Ser Leu Arg Phe 364 aa III CAT CCT GTG GTG GAT TTC ACA ATG CGG AAA GCT CTG GAG GAT GAC GAC ATC GCA GGC ACA AAA ATC AAG AAA GGA ACC AAC GTC ATT CTC 1260 bp His Pro Val Val Asp Phe Thr Met Arg Lys Ala Leu Glu Asp Asp Asp Ile Ala Gly Thr Lys Ile Lys Lys Gly Thr Asn Val Ile Leu 394 aa IV AAC ATT GGT CTC ATG CAC AAG ACC GAA TTC TTC CCC AAA CCT AAA GAG TTC AAC CTC AAG AAC TTT GAA AAA ACA GTA CCC AGC CGT TAC Asn lle Gly Leu Met His Lys Thr Glu Phe Phe Pro Lys Pro Lys Glu Phe Asn Leu Lys Asn Phe Glu Lys Thr Val Pro Ser Arg Tyr 1350 bp 424 aa TTC CAG CCC TTT GGC TGC GGG CCT CGT TCC TGT GTG GGC AAA CAC ATC GCC ATG GTG ATG ATG AAG GCC ATC CTG GTC ACT CTG CTG TCT Phe Gln Pro Phe Gly Cys Gly Pro Arg Ser **Cys** Val Gly Lys His Ile Ala Met Val Met Lys Ala Ile Leu Val Thr Leu Leu Ser 1440 bp 454 aa CEG TAC ACT GTE TET CET CEC CAN GEC TEC ACA CTC AAC AGC ATC AGE CAG ACC AAC AAC CTE TCA CAG CAG CCA GTE GAG GAC GAG CAC 1530 bp Arg Tyr Thr Val Cys Pro Arg Gin Gly Cys Thr Leu Asn Ser Ile Arg Gin Thr Asn Asn Leu Ser Gin Gin Pro Val Giu Asp Giu His 484 aa AGE CTG GEC ATG CGC TTC ATC CCA CGG ACG ACG ACA TAA TCT CAG CGC AAC GAG CTG TGC AAC ACA AGT GTG CTT TCA CAC TTT GGA TGA AAA 1620 bp Ser Leu Ala Met Arg Phe Ile Pro Arg Thr Thr End 495 ACA TCT TGA AAT GGG TGT AAC TGC CTT AAC AAA GTC CTG TAC TAG GAA ATA CTA ACA TGG AAT TTG TAA TAA CAG CAC ATG CAT GCG AAT 1710 bp TTC AAC ATT ACT TAA TAC ACC CGT TAA TCG CAA GTA TAC ATT TCT AGC CCC GTT TAA AAG TTG ATG TTT TGA CAC TGT ACA TGG 1800 bp GTC ATC CTG TTA ATA ANG ACA CTT TTA CAA TGA AAA AAA AAA 1842 bp

**Figura 10.** Secuencias nucleotídica y aminoacídica predicha de aromatasa cerebral de chanchita. Sobre la secuencia nucleotídica en tipografía negrita, se indican los posibles sitios de inicio (codón de inicio ATG) y terminación de la traducción (codón STOP: TAA) y señal de poliadenilación (AATAAA). Sobre la secuencia aminoacídica, se hallan subrayados los dominios correspondientes a la región del pasaje transmembrana (I), y los dominios funcionales de aromatasa: región de hélice I (II), región del péptido de Ozol (III), región aromática (IV) y región de unión al grupo hemo (V). En negrita, dentro de la región (V) se indica el aminoácido cisteína (Cys), el cual se encuentra extremadamente conservado.



**Figura 11.** Resultado del programa TMHMM Server V. 2.0. para el análisis de hélices transmembrana en la secuencia predicha de aromatasa cerebral de chanchita. Probabilidad de ocurrencia de una topología de hélice transmembrana en función de la estructura primaria de la proteína.

	Región	Hélice	-I	Región	del p	éptido	de
					Ozo]		
Cichlasoma dimerus	DNVRQCVLEMVIAAP	DTLSISLFF	ILMLLKQNP	DYQSLK	MESFINES	SLRFHPVVD	
Amphiprion ocellaris	DNVRQCVLEMVIAAP	DTLSISLFF	ILMLLKQNP	DHQRLIVLESFINESLRFHPVVD		SLRFHPVVD	
Xenopus laevis	ENVNQCILEMLIAAP	DTMSVSLFF	LVLIAQHP	DIPNLKILESFIYESMRYQPVVD			
Lepidochelys olivacea	ENVNQCVLEMMIAAP	DTLSVTLFF	<b>ILVLIAEHP</b>	DMSNLKVVENFINESMRYQPVVD		SMRYQPVVD	
Podiceps cristatus	ENVNQCVLEMMIAAP	DTLSVTLFF	<b>ILILIAEHP</b>	DMPNLKIVENFIYESMRYQPVVD			
Homo sapiens	ENVNQCILEMLIAAP	DTMSVSLFF	<b>ILFLIAKHP</b>	DIQKLKVMENFIYESMRYQPVVD		SMRYQPVVD	
	+	+	+		+	+	
	10	20	30		10	20	
Mayoría I	Región espec	cífica asas	de	Región al gru	de uni	.ón mo	
Cichlasoma dimerus	EDDDIAGTKIKKGTN	<b>VILNIGLMH</b>	C	FGCGPRS	CVGKHIAM	1	
Amphiprion ocellaris	on ocellaris EDDDIEGTKIRKGTNIILNIGLMHK FGCGPRSCVGKHIAM						
Xenopus laevis	opus laevis EDDIIDGYYVKKGTNIILNLGRMHK		FGSGPRACAGKYIAM				
Lepidochelys olivacea	lochelys olivacea QDDVIDGYPVKRGTNIILNIGRMHK		C	FGFGPRGCVGKFIAM			
Podiceps cristatus	<b>QDDVIDGYPVKKGTN</b>	IILNIGRMH	C	FGFGPRG	CVGKFIAM	6	
Homo sapiens	EDDVIDGYPVKKGTN	IILNIGRMH	2	FGFGPRG	CAGKYIAM	1	
	++	+	5		+	5	
	10	20			10		
Consenso	.DD.I.GGTN	ILN G.MH		FG.GPR.	C.GK.IAN	i	
Mavoría	EDDVIDGYPVKKGTN	IILNIGRMH	c .	FGFGPRG	CVGKHIAN	1	

**Figura 12.** Alineamientos de las secuencias de los dominios funcionales de aromatasa cerebral de chanchita y las de otros grupos de vertebrados (Pez teleósteo: *A. ocellaris*; Anfibio: *X. laevis;* Reptil: *L. olivacea*; Ave: *P. cristatus*; Mamífero: *H. sapiens*). Los aminoácidos conservados están resaltados en amarillo. En la región de unión al grupo hemo se indica en rojo la cisteína (C, acorde a la nomenclatura IUPAC) absolutamente conservada en vertebrados.

**Tabla 4.** Porcentaje de identidad entre la secuencia aminoacídica de aromatasa cerebral dechanchita y la de otros teleósteos.

Especie	Número de acceso	Identidad
Herichthys minckleyi	AFT65529.1	96%
Neolamprologus brichardi	XP_006789231.1	92%
Oreochromis mossambicus	AAD31030.1	92%
Oreochromis niloticus	AAO62626.1	90%
Haplochromis nyererei	XP_013765009.1	90%
Astatotilapia burtoni	XP_014196620.1	89%
Monopterus albus	ABX45102.1	80%
Carassius auratus	BAA23757.1	70%
Danio rerio	AAV41033.1	69%

La construcción del árbol filogenético de aromatasa de teleósteos reveló dos grandes ramas: una correspondiente a aromatasa gonadal y otra a aromatasa cerebral. Dentro de esta última se ubicó la secuencia predicha de la enzima, agrupada junto a otros teleósteos de aparición tardía como los Cichliformes, Mugiliformes, Beloniformes y Atheriniformes (Figura 13).

El modelado de la estructura tridimensional de la proteína con el programa Phyre<sup>2</sup> (Figura 14), expuso la presencia de 23 hélices  $\alpha$  y 10 láminas  $\beta$ , y un "ramillete" central formado por 4 hélices  $\alpha$  (hélices VIII, X, XVII y XXIII), y dos láminas  $\beta$  (láminas VII y X) y la región de unión al grupo hemo cerrando el ramillete por su extremos (Figura 15).



**Figura 13.** Árbol filogenético de aromatasas de teleósteos. El asterisco indica la posición de aromatasa cerebral de chanchita. La secuencia de aromatasa de *D. sabina* se utilizó como grupo externo.



**Figura 14.** Modelo tridimensional de aromatasa cerebral de chanchita utilizando la herramienta en línea Phyre<sup>2</sup>. El modelo se basó en la estructura cristalina de aromatasa de placenta humana en asociación con androstenediona (c3eqmA). El porcentaje de identidad entre la proteína molde y la modelada fue del 56%, y la probabilidad de homología entre ambas resultó del 91%. Dentro del círculo blanco se indica el "ramillete" central característico de aromatasas de vertebrados. Nótese la cercanía entre los dominios funcionales de hélice I y la región de unión al grupo hemo. La región comprendida entre las dos cabezas de flecha representa la región inter-membrana. El fragmento entre las dos flechas fue modelado *ab initio* mediante el modelo físico de Poing simplificado (Jefferys y col., 2010), y por lo tanto su orientación es poco fidedigna.



**Figura 15.** Modelo tridimensional de aromatasa cerebral de chanchita y su interacción con el grupo hemo utilizando la herramienta en línea 3DLigandSite (Wass y col., 2010). (A) Vista general del modelo, donde puede observarse el grupo hemo contenido en el interior de la enzima. (B) Detalle del modelo donde se muestra la cisteína 435 (en violeta) del dominio de unión al grupo hemo, que actuaría como quinto ligando coordinando la unión al hierrohemínico.

#### ¿Aromatasa cerebral fuera del cerebro?

Los mayores niveles de expresión de aromatasa cerebral se registraron en el cerebro de machos de la chanchita (Figura 16). Comparativamente, los niveles de expresión fueron entre 3 y 4 veces menores en el cerebro de las hembras, la hipófisis de ambos sexos y las branquias de macho. También se detectaron niveles bajos de expresión de aromatasa cerebral en los músculos de macho, los ovarios y las branquias de hembra. Por otro lado, bajo las condiciones de qPCR empleadas, no se observó expresión de aromatasa cerebral en los demás órganos analizados.



Figura 16. Análisis de la expresión de aromatasa cerebral en distintos órganos de chanchita macho y hembra. (Arriba) Expresión de la fosfoproteína acídica ribosomal PO (ARP). (Abajo) Niveles de expresión de aromatasa cerebral relativos a la expresión ARP en los distintos órganos.

#### Distribución neuroanatómica de aromatasa cerebral

El estudio inmunohistoquímico en el cerebro de chanchita reveló la presencia de células inmunomarcadas (células-im) exclusivamente en regiones del cerebro anterior (Figura 17). Las primeras células-im en sentido antero-posterior se detectaron en el núcleo ventral del telencéfalo ventral (Vv), bordeando la pared del ventrículo medial (Figura 17a). Se registró la presencia de un número escaso de células-im en la división medial del telencéfalo dorsal (Dm), cercanas al borde del ventrículo telencefálico (Figura 17b y c). Sin lugar a dudas, el mayor número de células-im se encontró en el APO, a lo largo de toda su extensión, bordeando la pared del tercer ventrículo (Figura 17b-f). También se detectó inmunomarca en la habénula (Figura 17e), tálamo y en los núcleos hipotalámicos supraquiasmático (NSQ) (Figura 17f), periventricular posterior (NPPv), lateral tuberal (NLT) y núcleo periventricular del *tuberculum* posterior (TPp). No se detectó inmunomarcación en la hipófisis. A su vez, no se observó dimorfismo sexual alguno en lo que respecta a la distribución neuroanatómica de aromatasa cerebral en chanchita.



Figura 17. Distribución de las células inmureactivas para aromatasa de teleósteos en el cerebro de chanchita. Esquemas digitales de cortes transversales del cerebro anterior de chanchita dispuestos en sentido anteroposterior (A-F). Las áreas sombreadas en rojo representan los cuerpos celulares de las células-im bordeando los ventrículos y sus delgadas proyecciones citoplasmáticas. Abreviaturas: 3V, tercer ventrículo; A, núcleo talámico anterior; Dc, parte central del telencéfalo dorsal; Dld, división dorsal de la parte lateral del telencéfalo dorsal; Dlp, división posterior de la parte lateral del telencéfalo dorsal; Dlv, división ventral de la parte lateral del telencéfalo dorsal; Dm, parte medial del telencéfalo dorsal; Dp, parte posterior del telencéfalo dorsal; Hab, habénula; NPvA, núcleo periventricular anterior; NPOav, parte anteroventral del núcleo preóptico; NPOpc; parte parvocelular del núcleo preóptico parvocelular; NSQ, núcleo supraquiasmático; PMgc, parte gigantocelular del núcleo preóptico magnocelular; PMmc, parte magnocelular del núcleo preóptico magnocelular; PMpc, parte parvocelular del núcleo preóptico magnocelular; PPd, núcleo pretectal periventricular dorsal; SCO, órgano subcomisural; TO, tectum óptico; TOMa, tracto óptico marginal; Vd, núcleo dorsal del telencéfalo ventral; VI, núcleo lateral del telencéfalo ventral; VM, ventrículo medial; Vp, núcleo postcomisural del telencéfalo ventral; Vs, núcleo supracomisural del teléncefalo ventral; VT, ventrículo telencefálico; Vv, núcleo ventral del telencéfalo ventral. Escala: 1 mm.

Las células-im presentaron un cuerpo celular pequeño, esférico, con un único núcleo central esférico u ovoide, y una única proyección citoplasmática de longitud variable (Figura 18). La inmunomarcación denotó la presencia de la enzima, tanto en el cuerpo celular, como en la proyección citoplasmática. En todos los casos, los cuerpos celulares se localizaron en regiones periventriculares, formando una capa de una o dos células-im de espesor (Figura 18a-f). En la gran mayoría de los casos, se observó que las proyecciones citoplásmaticas se extendían más allá dela región periventricular hacia el interior del cerebro, en ocasiones finalizando en engrosamientos citoplasmáticos en la superficie pial (Figura 18c, asterisco). En particular, en la parte antero-ventral del núcleo preóptico parvocelular (NPOav) se observó un aglomerado denso de proyecciones citoplasmáticas (Figura 18c). La morfología y localización de las células-im se corresponde con aquella descripta para células gliales radiales (Bentivoglio, 1999; Rakic, 1990; Strobl-Mazzulla y col., 2010; Tong y col., 2009).

En lo que respecta a la identidad de las células, lamentablemente no se observó inmunomarca con los anticuerpos anti—marcadores gliales bajo las condiciones empleadas (Ver sección discusión). Sin embargo, las células-im para aromatasa de teleósteos no co-localizaron en ninguna circunstancia con el marcador de neuronas post-mitóticas (Figura 19).



Figura 18. Análisis inmunohistoquímico. Fotomicrografías de cortes transversales del cerebro de chanchita donde se observa en detalle la morfología de las células-im, posiblemente células gliales radiales. (A) Conjunto de células-im formando una capa de una célula de espesor, en el núcleo ventral del telencéfalo ventral (Vv), bordeando la pared del ventrículo medial (VM). (B) Una única célula-im aislada, localizada en la parte medial del telencéfalo dorsal (Dm), contigua al ventrículo telencefálico. (C) Un grupo numeroso de células-im densamente empaquetadas en la región periventricular del tercer ventrículo de la parte parvocelular del núcleo preóptico parvocelular (NPOpc). Se pueden observar los cuerpos celulares en las zonas próximas al ventrículo, y las proyecciones citoplasmáticas que se extienden hacia el interior del cerebro (flechas), de las cuales, algunas finalizan sobre la superficie pial del cerebro formando engrosamientos citoplasmáticos o píes terminales (asterisco). (D) Capa de una o dos células-im de espesor en la parte magnocelular del núcleo preóptico magnocelular (PMmc), rodeando el tercer ventrículo (3V). Las cabezas de flechas señalan dos células-im alejadas de la región periventricular. (E) y (F) Se observó un gran número de células-im junto con sus proyecciones citoplasmáticas en la parte anteroventral del núcleo preóptico (NPOav), en contacto con el tracto óptico (TcO).



**Figura 19.** Doble inmunofluorescencia de aromatasa (verde; A, D) y α-tubulina acetilada (rojo; B, E) en el tálamo ventromedial (TVM) y la parte medial del núcleo tuberal hipotalámico (NLTm). Las imágenes fusionadas muestran la ausencia de co-localización de aromatasa y el marcador neuronal (C, F). También se muestra la coloración nuclear con DAPI (azul). Aumento: 400X.



En este capítulo se analizó y se caracterizó mediante el uso de distintas técnicas, la secuencia, la estructura y el patrón de expresión de la enzima aromatasa cerebral de la chanchita, *C. dimerus*. El porcentaje de identidad del ADNc y de la secuencia aminoacídica deducida de aromatasa cerebral de chanchita variaron entre 97-71% y 97-68%, respectivamente, en relación a otra aromatasas cerebrales de teleósteos. Como era de esperar, el mayor porcentaje de identidad se obtuvo para otro cíclido Neotropical, *H. minckleyi* (AFT65529.1), en comparación con los cíclidos africanos (*N. brichardi, O. mossambicus, O. niloticus, A. nyererei* y *A. burtoni*), con los cuales divergieron hace 45-60 millones de años (Friedman y col., 2013).

Luego de realizar un alineamiento múltiple de la secuencia predicha de aromatasa cerebral de chanchita con otras secuencias de aromatasa de vertebrados, se detectó la presencia de las posibles regiones correspondientes a dominios funcionales característicos de proteínas citocromo P450. Es decir, (i) la región de la hélice I, con un elevado porcentaje de

aminoácidos hidrofóbicos (58% en chanchita), involucrada en la formación de un "bolsillo" hidrofóbico de unión al sustrato (Gosh y col., 2009), (ii) la región del péptido de Ozol, la cual otorgaría la especificad de la unión al sustrato (Zuber y col., 1986), y (iii) la región de unión al grupo hemo, la cual contiene un residuo cisteína absolutamente conservado dentro de la superfamilia citocromo P450 y que actúa como quinto ligando coordinando la unión al hierrohemínico (Simpson y col., 1994). Esta última región presentó el mayor grado de conservación (80%) entre los vertebrados evaluados (Figura 12), lo cual resalta la importancia de la interacción con el hierro-hemínico para la reacción de aromatización. También se detectó la presencia de la región específica de aromatasa de vertebrados y de una seguidilla de aminoácidos hidrofóbicos cercana al extremo amino terminal, con una probabilidad cercana a la certeza de tratarse de una región intermembrana. Este dominio funcional es característico de los miembros de la familia CYP19, y fijaría la enzima al retículo endoplasmático liso o a la membrana mitocondrial interna (Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000). Evidencia más reciente sugiere sin embargo, que la seguidilla de aminoácidos hidrofóbicos hacia el extremo amino terminal no sería esencial para el anclaje de la proteína a la membrana, sino que estaría involucrada en la determinación de la orientación de la enzima (Praporski y col., 2009).

La secuencia aminoacídica deducida de aromatasa cerebral de chanchita se encuentra dentro de lo descripto para otras aromatasas de vertebrados. En cuanto al tamaño del péptido, se estimó un peso molecular de 56,24 KDa, similar a aquellos reportados para Gobiocypris rarus (57,7 KDa; Wang y col., 2010), Monopterus albus (56,6 KDa; Zhang y col., 2008) y Trimma okinawae (57 KDa; Kobayashi y col., 2004). Por otro lado, el modelado de la estructura terciaria de aromatasa cerebral reveló una conformación donde las hélices lphadominaron (53,7%), mientras que las láminas  $\beta$  representaron un 8,5%. Este patrón es similar a lo descripto para otros modelos de proteínas CYP19 (Graham-Lorence y col., 1995). Si bien el modelo se construyó en base a la estructura terciaria de aromatasa de aromatasa de placenta humana en asociación con androstenediona (c3eqmA) y el porcentaje de identidad entre la secuencia primaria de la proteína molde y de la de chanchita fue relativamente bajo (56%), un estudio recopilatorio de la estructura de varios integrantes de la superfamilia citocromo P450, sugiere que a pesar del bajo porcentaje de identidad entre sus miembros (en ocasiones menor al 20%), todos parecen adoptar una estructura tridimensional similar (Graham y Peterson, 1999). De manera acorde, el modelo tridimensional de aromatasa cerebral de chanchita presentó el "ramillete" central característico de aromatasa de vertebrados.

Con respecto a la expresión de aromatasa cerebral en los distintos órganos evaluados en chanchita, se observó una fuerte expresión en el cerebro de macho mientras que los niveles de expresión fueron al menos 3 veces menores en hipófisis, músculo y branguia de macho, y cerebro, hipófisis, ovario y branquia de hembra. Esta centralización de la expresión de aromatasa cerebral en el cerebro coincide con lo descripto en otras especies de teleósteos (Strobl-Mazzulla y col., 2005 Wang y col., 2014; Zhang y col., 2008). Una excepción notable son los miembros de la tribu de cíclidos africanos haplochromini, dentro de los que se halla A. burtoni, donde la aromatasa cerebral se sobre-expresa en testículo, por encima de los niveles de expresión del cerebro (Böhne y col., 2013). Al igual que lo observado en chanchita, la expresión de aromatasa en el cerebro de la mayoría de los vertebrados - incluyendo aves, mamíferos y muchos teleósteos-, es mayor en machos con respecto a hembras (Goto-Kazeto y col., 2004; Peterson y col., 2005; Roselli y col., 2004; Strobl-Mazzulla y col., 2005). No obstante, existe un número creciente de trabajos en teleósteos donde se observó una mayor expresión de aromatasa cerebral en el cerebro de hembras comparado con machos de la misma especie. Es el caso, por ejemplo, de la medaka (Oryzias latipes; Okubo y col., 2011), el pez gato asiático (H. fossilis; Chaube y col., 2015) y el ayu (Plecoglossus altivelis; Wang y col., 2014), entre otros. Esta variación en el patrón de expresión de aromatasa cerebral entre sexos, probablemente refleje la gran variabilidad en el comportamiento social y reproductivo que caracteriza a los peces. Por un lado, todo los tipos de reproducción y sistemas sociales y de cuidado parental descriptos en vertebrados están presentes en teleósteos (Desjardins y Fernald, 2009). Por otro, la expresión de aromatasa está involucrada en la modulación de comportamientos sociales y reproductivos (Halgren y col., 2006; Huffman et al; 2013) y, en simultáneo, es regulada por los mismos (Iwata et a., 2012; Maruska y col., 2013). Por lo tanto, es de esperarse un patrón de expresión de aromatasa cerebral asociado al ambiente social y al modelo reproductivo de cada especie o grupo en particular.

El patrón de expresión de aromatasa cerebral fuera del cerebro coincide con aquel descripto para otras especies de teleósteos, como el pejerrey (*O. bonariensis*; Strobl-Mazzulla y col., 2005), la carpa común (*C. carpio*; Barney y col., 2008) y el robalo (*D. labrax*; Blázquez and Piferrer, 2004), en donde la expresión de aromatasa cerebral está restringida a unos pocos órganos, en general la gónada y el riñón. No obstante, otras especies de teleósteos presentan una distribución de la expresión de aromatasa cerebral mucho más amplia. Por ejemplo, en la tilapia del Nilo, *O. niloticus*, Chang y col., 2005 detectaron la presencia su ARN mensajero en cerebro, hipófisis, músculo, branquia, riñón, intestino, corazón, bazo, ovario y testículo. Se observaron perfiles similares en la anguila asiática del pantano (*M. albus*, Zhang y col., 2008),

el pez gato asiático (*H. fossilis*; Chaube y col., 2015), el ayu (*P. altivelis*; Wang y col., 2014) y en una especie de lábrido (*Halichoeres tenuispinis*; Choi y col., 2005). Esta gran variabilidad entre las distintas especies puede resultar de diferencias en el estadio gonadal y/o sexo de los organismos analizados, dado que estos factores podrían afectar la expresión de aromatasa cerebral en los distintos órganos (González y Piferrer, 2003; Geraudie y col., 2011; Strobl-Mazzulla y col., 2005), o simplemente tratarse de perfiles de expresión especie-específicos. La expresión de aromatasa cerebral no se haya restringida a la células radiales gliales (Diotel y col., 2010), por el contrario, existen registros de su localización en células germinales del ovario (Caulier y col., 2015) y testículo (Caulier y col., 2015; Hinfray y col., 2013), y gonadotropos de hormona luteinizante (LH) en la hipófisis (Zhang y col., 2014). Sin embargo, la localización celular y mecanismos de regulación de la expresión de aromatasa cerebral por fuera del cerebro, continúan siendo en gran parte un misterio.

Como se mencionó en la "Introducción", la expresión de aromatasa cerebral en el cerebro de los peces teleósteos se describió exclusivamente en células gliales radiales. En chanchita, las células inmunomarcadas con un anticuerpo anti aromatasa de teleósteos se localizaron únicamente en regiones periventriculares del cerebro anterior, y presentaron todas las características morfológicas típicas de las células gliales radiales (Gregory y col., 1988; Stevenson y Yoon, 1982). A diferencia de las células ependimarias, también de ubicación periventricular, cuyas ramificaciones citoplasmáticas se entremezclan dentro de la región ependimaria, las células gliales radiales presentan una única y larga proyección citoplasmática, que se extiende más allá de la región periventricular (Stevenson y Yoon, 1982). Esto último fue lo que se observó en la mayoría de las células inmunomarcadas, sobre todo en aquellas del NPOav donde resultó evidente la presencia de proyecciones citoplasmáticas, que se extendían por fuera de la región periventricular hacia la superficie pial del cerebro, donde terminaban en pequeños "pies" terminales o engrosamientos. Lamentablemente, no se observó inmunomarcación para ninguno de los anticuerpos heterólogos utilizados con el fin de evaluar la naturaleza glial de las células-im con anticuerpo anti aromatasa. Además del protocolo de inmunohistoquímica ya mencionado en "Materiales y Métodos", tanto para el anticuerpo anti vimentina como para el anti GFAP se realizó un protocolo de recuperación antigénica en buffer citrato (0,01 M; pH=7,1), a 63°C durante 90 minutos, sin éxito. También se probó un protocolo de amplificación de la señal basado en Tiramida (Kit CSA-peroxidasa, DAKO) con el que tampoco se obtuvo un resultado positivo. Sospechando que el protocolo utilizado pudiese resultar demasiado agresivo para el epítope antigénico - debido al pasaje por los alcoholes, la inclusión en parafina, etc.-, se decidió probar con un protocolo de criopreservación y cortes en

criostato. Para ello, 4 cerebros seleccionados al azar, dos de machos y dos de hembras, se fijaron en paraformaldehido 4% y se criopreservaron en una solución de sacarosa 15% en PBS a 4°C. Luego, las piezas se incluyeron en Tissue Tek (Sakura® Finetek) para el armado de los tacos y fueron seccionadas en el plano transversal a 15 µm en criostato, se montaron en portaobjetos limpios y estos se almacenaron a -20ºC. Para la inmunodetección de los marcadores gliales, los cortes se llevaron a temperatura ambiente y se realizó el protocolo de inmunohistoquímica clásico ya descripto, a partir del bloqueo de sitios de unión inespecíficos en una solución de leche en polvo descremada 5% en PBS, en adelante. Sin embargo, tampoco se observó inmunomarcación de ningún tipo. Por lo tanto, se concluyó que los anticuerpos utilizados probablemente reaccionen frente a un epítope distinto al presente en las moléculas de vimentina y GFAP de chanchita y por ende resultaron inadecuados para este fin. Por último, se evaluaron otros dos anticuerpos que reaccionan contra marcadores de células gliales de vertebrados, uno anti proteína glial S-100 (Sigma-Aldrich), y el otro anti proteína de unión lipídica cerebral (BLBP, del inglés brain lipid-binding protein) (Abcam), ambos policionales y sintetizados en conejo. Se evaluaron las diluciones 1:10, 1:50 y 1:100 para ambos anticuerpos con el protocolo de la técnica inmunohistoquímica clásica, con amplificación de la señal, recuperación antigénica y criopreservación, no obteniendo, nuevamente, un resultado positivo en ningún caso.

Si bien no se logró confirmar la identidad glial de las células que exprezan aromatasa en el cerebro de chanchita, no se observó doble-inmunomarcación con el marcador de neuronas post-mitóticas, α-tubulina acetilada. Esto último, junto con las características morfológicas y la localización de las células-ir en la chanchita, sugiere fuertemente que las células inmunomarcadas para aromatasa de teleósteos son células gliales radiales.

Al igual que lo descripto en otros peces teleósteos, las células-im para aromatasa se localizaron en el cerebro anterior de chanchita. El mayor número y densidad de células-im se detectó en el APO, bordeando la pared del tercer ventrículo. Este patrón de distribución, coincide, al menos parcialmente, con lo publicado para otras especies de peces teleósteos en donde no sólo se registró la presencia de células productoras de aromatasa en el cerebro anterior, sino también en regiones del cerebro medio y posterior. Por ejemplo, en el pez cebra (*D. rerio*; Pellegrini y col., 2007), la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*; Menuet y col., 2003), el labro de cabeza azul (*Thalassoma bifasciatum*; Marsh y col., 2006), el pejerrey (*O. bonariensis*; Strobl-Mazzulla y col., 2005) y el pez sapo de aleta pintada (*P. notatus*; Forlano y col., 2001) se encontraron células gliales radiales positivas para aromatasa prácticamente en

todas las superficies ventriculares del cerebro, incluyendo áreas de los tecta ópticos (excepto en P. notatus), cerebelo y en menor número en el tallo cerebral. Estas diferencias en la neurolocalización de aromatasa cerebral entre especies puede ser el reflejo de los distintos nichos ecológicos y/o ambientes que experimenta cada especie. Por ejemplo, Marsh y col., 2006 sugirieron que la presencia de aromatasa cerebral en el tectum óptico de T. bisfaciatum, O. mykiss y D. rerio, y su ausencia en el predador nocturno P. notatus, estaría asociado con la mayor dependencia de claves visuales en las primeras tres especies. Sin embargo, esta propuesta resultaría inadecuada para explicar la falta de observación de células-im para aromatasa en el tectum óptico de chanchita, dado que al igual que T. bisfaciatum, O. mykiss y D. rerio, la misma habita cuerpos de agua bien iluminados. Por otro lado, si bien este trabajo de tesis constituye el primer estudio inmunohistoquímico de aromatasa en el cerebro de una especie de cíclido, y por lo tanto imposibilita comparaciones directas con especies cercanas, Maruska y col., (2013) detectaron la expresión del ARN mensajero de aromatasa cerebral por qPCR en el cerebelo de A. burtoni, lo que confirmaría un patrón de expresión más amplio, incluso en especies filogenéticamente cercanas. Por lo tanto, existen al menos cuatros escenarios posibles que permitirían explicar la ausencia de inmunodetección de aromatasa por fuera del cerebro anterior de chanchita: (a) la pérdida de la expresión de aromatasa fuera del cerebro anterior en algún punto en el linaje de chanchita, tras la separación con los cíclidos africanos, (b) efectos ecológicos/ambientales/ momento de muestreo que modulan el patrón de expresión de manera diferencial en las distintas regiones del cerebro, (c) los niveles de la enzima en el cerebro medio y posterior se encontrarían por debajo del umbral de detección de la técnica inmunohistoquímica en las diversas condiciones evaluadas. Estos últimos dos puntos podrían explicar el por qué no se observó inmunomarcación para aromatasa en la hipófisis, incluso mediante la amplificación de la señal, pero sí se detectó su expresión por qPCR.

Las regiones donde se inmunodetectó aromatasa en el cerebro de chanchita se encuentran contenidas en su totalidad dentro de dos circuitos neuronales interconectados y conservados en vertebrados, conocidos como la red social y el sistema de recompensa mesolímbico (Newman, 1999; O'Connell y Hofmann, 2011). La red social está conformada por 6 núcleos o nodos neuronales (*septum* lateral, núcleo intersticial de la estría terminal, APO, hipotálamo anterior, hipotálamo ventromedial y sustancia gris periacueductal), interconectados bidireccionalmente e implicados en la regulación de la agresividad, estrés, cuidado parental y comportamientos sexuales (Goodson, 2005). Es importante destacar que por definición los núcleos de la red social presentan receptores para esteroides sexuales (Goodson, 2005), convirtiéndolos en potenciales blancos del producto de la enzima aromatasa

52

cerebral. Por otro lado, el sistema de recompensa mesolímbico, involucrado en la evaluación de la prominencia de estímulos - sociales y no sociales- principalmente a través de vías dopaminérgicas, está conformado por al menos ocho núcleos interconectados, dos de los cuales comparte con la red social, lo que permite integrar ambos circuitos (*septum* lateral, núcleo intersticial de la estría terminal, cuerpo estriado, núcleo *accumbens*, pálido ventral, complejo basolateral de la amígdala, hipocampo y área tegmental ventral) (O'Connell y Hofmann, 2011).

La presencia de aromatasa cerebral en varios de los núcleos de la red social y del sistema de recompensa mesolímbico de chanchita (Figura 20) sugiere fuertemente un posible papel de la síntesis de esteroides cerebrales en la regulación del comportamiento social de esta especie. No sólo a nivel de la coordinación de comportamientos con el ambiente fisiológico interno - vía la red social-, sino que también a nivel de su coordinación con estímulos sociales externos vía el sistema de recompensa, como podría ser la presencia en el entorno del animal de otra chanchita de mayor o menor tamaño, o una potencial pareja.



**Figura 20.** Diagrama de la vista lateral del cerebro de chanchita donde se muestran los núcleos de la red social y sistema de recompensa mesolímbico donde se inmunodetectó la presencia de aromatasa cerebral. APO: área preóptica; CE: cerebelo; Dm: división medial del telencéfalo dorsal (homólogo al núcleo intersticial de la estría terminal de mamífero); HIP: hipotálamo; ME: médula espinal; MO: médula oblonga; NLTv: parte ventral del núcleo tuberal lateral (homólogo al hipotálamo ventromedial de mamífero); TEL: telencéfalo; TO; *tectum* óptico; TPp: núcleo periventricular del *tuberculum* posterior (homólogo al área tegmental ventral de mamífero) ; Vv: núcleo ventral del telencéfalo ventral (homólogo al *septum* lateral de mamífero). Las flechas bidireccionales indican conexiones funcionales entre los núcleos. Referencia sobre las posibles homologías con mamífero: O'Connell y Hofmann, 2011). La ubicación de los núcleos es aproximada y su morfología no es la observada *in vivo* y se realizó sólo con fines ilustrativos.

# **Capítulo II**



"A veces creo que nada tiene sentido. En un planeta minúsculo, que corre hacia la nada desde millones de años, nacemos en medio de dolores, crecemos, luchamos, nos enfermamos, sufrimos, hacemos sufrir, gritamos, morimos, mueren, y otros están naciendo para volver a empezar la comedia inútil. ¿Sería eso, verdaderamente? ¿Toda nuestra vida sería una serie de gritos anónimos en un desierto de astros indiferentes?"

Fragmento de "El túnel" de Ernesto Sábato - Escritor

## **DUELO DE CHANCHITAS:** FISIOLOGÍA DEL COMPORTAMIENTO AGONÍSTICO EN MACHOS

En esta sección de la tesis se describen el comportamiento agonístico, el perfil hormonal, el potencial reproductivo y la expresión de aromatasa cerebral en el cerebro y en la glándula hipófisis de machos de distinto estatus social. La integración de cada uno de los diferentes enfoques permite un entendimiento más completo y dinámico del comportamiento del animal en su entorno social.

Introducción

El ambiente social que un animal experimenta puede moldear sustancialmente su comportamiento y su fisiología (Bernhardt y col., 1998; Galhardo y Oliveira, 2014; Lacava y col., 2011; Pinto y col., 2011; Sessa y col., 2013). Sin embargo, el comportamiento no depende exclusivamente de factores externos, dado que el ambiente interno de un individuo, es decir su estado fisiológico y motivacional, también contribuye en la construcción del mismo (Eisenegger y col., 2010; Quiring, 1944; Soma, 2006; Tudorache y col., 2013). Existe por lo tanto una relación bidireccional entre el ambiente interno y el externo que es integrada a nivel del sistema nervioso y con el comportamiento como elemento de respuesta. Estos efectos bidireccionales son de particular importancia en especies sociales con sistemas de dominancia jerárquica, como es el caso de la chanchita. En estas especies, el rango social puede repercutir intensamente sobre el comportamiento y la fisiología del individuo a través de las interacciones con otros miembros de la población (Sapolsky, 2005).

La base fisiológica de la dominancia parecería sustentarse fuertemente en la concentración plasmática de los esteroides sexuales y los glucocorticoides, tal es así que los individuos de distinto estatus social, por ejemplo dominante vs. subordinado, difieren por lo general en sus perfiles hormonales. Los animales dominantes suelen ser agresivos y presentar niveles elevados de andrógenos en sangre (Albert y col., 1986; Duckworth y col., 2004; Oliveira y col., 2002; Renn y col., 2012; Taves y col., 2009), mientras que los individuos subordinados realizan comportamientos sumisos, frecuentemente acompañados por niveles elevados de glucocorticoides (Alonso y col., 2011; Greenberg y col., 1984; Morandini y col., 2014; Sherman y col., 2012). Si bien históricamente los estrógenos han sido vinculados a la regulación del comportamiento típicamente femenino, varios trabajos los asocian cada vez más con la regulación del comportamiento agresivo en machos de vertebrados (Huffman y col., 2013; Soma y col., 2000b; Schlinger y Callard, 1990). El rango de un individuo dentro de un sistema jerárquico no sólo afecta y es afectado por su perfil endócrino sino que también interactúa con otros procesos fisiológicos, tales como la espermatogénesis (Maruska y Fernald, 2011), la maduración espermática (Koyama y Kamimura, 1998), la ooogénesis (Filby y col., 2010), la expresión génica (Kroes y col., 2006; Runcie y col., 2013) y la neurogénesis (Kozorovitskiy y Gould, 2004; Maruska y col., 2012).

La presencia de células que sintetizan aromatasa cerebral en regiones del cerebro de chanchita involucradas en la regulación del comportamiento social llevó a pensar en el papel potencial de los estrógenos como elemento modulador y/o modulado del comportamiento

asociado al estatus social. En otras especies, tales como el lebiste (*Poecilia reticula*), la inhibición de la actividad de aromatasa (cerebral y gonadal) en los machos resultó en una reducción del repertorio de comportamientos reproductivos (Hallgren y col., 2006). En el cíclido *A. burtoni*, el bloqueo de la enzima disminuyó la intensidad del comportamiento agresivo de machos dominantes, a pesar de presentar un aumento en los niveles de testosterona plasmática (Huffman y col., 2013). A la inversa, el entorno social también puede afectar la expresión y/o actividad de aromatasa cerebral. Por ejemplo, en machos dominantes de *A. burtoni* que mantuvieron su estatus por varias semanas consecutivas se registró una mayor expresión de aromatasa cerebral con respecto a los machos subordinados, en núcleos neuronales del telencéfalo e hipotálamo ventral (Maruska y col., 2013) y APO (Huffman y col., 2013). A su vez, en las hembras del gobio hermafrodita *Lythrypnus dalli*, el aumento en la agresividad que ocurre durante el pasaje a macho se cree que provocaría una disminución en la actividad de aromatasa cerebral (Black y col., 2012).

Los trabajos en A. burtoni y en el gobio catalina azul se suman a muchos otros donde se presentó evidencia acerca de la relación de aromatasa cerebral con el comportamiento social, y en particular con la agresividad (Filby y col., 2012; Gonçalves y col., 2007; Hallgren y col., 2006; Iwata y col., 2012). Sin embargo, en muchos de estos trabajos no se analizó la variabilidad interindividual en el comportamiento agresivo, que muchas veces es interpretada como ruido alrededor de un promedio, y simplemente se estudió la relación de aromatasa cerebral con el estatus social. Al disecar el "ruido" en sus componentes es posible predecir y contar con un mejor entendimiento del comportamiento y su interrelación con el sistema endócrino. En ocasiones, el estudio de la variabilidad interindividual expone una mayor complejidad del sistema a la previamente supuesta. Por ejemplo, aún en ciertas relaciones hormona-comportamiento bien establecidas muchos trabajos no detectaron una asociación entre los niveles hormonales en plasma y la frecuencia del comportamiento (ej.: testosteronaagresividad: Arlet y col., 2011; Vullioud y col., 2013; ej.: testosterona-comportamiento sexual masculino: Balthazart y col., 1977; Feder, 1984). Esto sugiere la presencia de múltiples factores involucrados en la regulación del comportamiento como serían la cantidad del receptor, la biodisponibilidad hormonal, entre muchas otras.

Dado que la aromatasa cerebral es un nexo potencial entre el ambiente fisiológico interno y el contexto social externo, los objetivos de este capítulo de tesis fueron, (i) caracterizar el perfil endocrino y el estadio gonadal de chanchitas de distinto estatus social y (ii) analizar los niveles de expresión de aromatasa cerebral en cerebro e hipófisis de

57

chanchitas de distinto estatus social (territorial vs. no-territorial), y su relación con la variabilidad interindividual en el comportamiento agonístico.

Metodología

#### Animales

Como se mencionó en el capítulo I, los ejemplares de chanchita utilizados fueron capturados en la región de Esteros del Riachuelo (Corrientes, Argentina), y mantenidos en acuarios grupales de entre ocho y diez individuos en las instalaciones del Bioterio Central de Ciudad Universitaria (UBA). Las condiciones de fotoperiodo, temperatura y alimentación fueron idénticas a las ya descriptas en el capítulo I. Para obtener individuos territoriales (T) y no-territoriales (NT) se seleccionaron seis chanchitas de los acuarios grupales y se trasladaron a un acuario experimental de 53 litros (temperatura:  $25\pm2$  °C y fotoperído de 14:10 horas luz:oscuridad). El acuario experimental contó con una fina capa de grava, plantas artificiales y una laja de localización central (Figura 21). Debido a la ausencia de un dimorfismo sexual marcado en la chanchita fuera de la etapa de próxima a la puesta, la composición de sexos del acuario experimental fue azarosa y varió entre las réplicas experimentales.



**Figura 21.** Fotografía de un acuario experimental. Nótese la presencia de una pareja territorial (T) en la región inferior del acuario mientras los individuos no-territoriales (NT) se ubican principalmente cercanos a la superficie, alejándose del territorio de la pareja dominante.
Dado que el tamaño corporal es un factor determinante en el establecimiento de la posición jerárquica en los machos de chanchita (Alonso y col., 2011), en donde aquellos de mayor tamaño suelen ocupar posiciones de alto rango, y que el tamaño relativo entre dos peces puede afectar la intensidad del comportamiento agresivo (Wazlavek y Figler, 1989) y la expresión génica en áreas cerebrales de la red social (Desjardins y col., 2015), los seis peces de cada grupo fueron pre-seleccionados en base a su tamaño. Para ello se pesaron y se registró el largo estándar y el largo total del conjunto de peces presentes en los acuarios grupales al momento de iniciar cada experimento. Luego se incorporaron las variables morfológicas registradas en un análisis de clústeres de K-medias con diez iteraciones y los seis miembros de cada clúster con la menor distancia euclidiana se seleccionaron como integrantes de un mismo grupo.

Cada experimentó se inició con la colocación en simultáneo de los seis peces de cada grupo en el acuario experimental y luego se les otorgó un período de 24 horas para que se aclimaten. Durante los días que siguieron se procedió con la identificación individual de cada animal utilizando el patrón de manchas de cada pez como referencia y se observaron las interacciones agonísticas entre los miembros de cada grupo, dos veces al día, durante 15 minutos. La observación cualitativa de las interacciones ganadas y perdidas de cada pez, permitió determinar el rango de cada individuo durante el proceso de formación de la jerarquía (Figura 22). Se consideró a un pez como ganador de una interacción agonística, cuando un comportamiento agresivo de su parte resultó en un comportamiento sumiso por parte del contrincante.

Con el fin de estandarizar las condiciones de muestreo, se estableció como punto de partida el momento en el que se observó la formación de una pareja territorial y se registraron los primeros indicadores de actividad reproductiva. El tiempo límite fijado experimentalmente para el establecimiento de una pareja territorial fue de 15 días. La pareja se identificó como aquellos dos individuos de mayor rango que no eran agresivos entre ellos, pero que custodiaban un territorio dentro del acuario, alejando agresivamente a los otros peces. La mañana en la cual se observaron por primera vez los despliegues reproductivos, como por ejemplo temblores corporales, la frotación del cuerpo y papila genital contra la superficie del sitio seleccionado para la puesta, la construcción de un nido en forma de pozo en el sustrato (Alonso y col., 2011), se procedió a la filmación del acuario para el análisis cuantitativo de las interacciones agonísticas. El tiempo promedio de filmación fue 23,4 minutos (mínimo: 19,2 min; máximo: 23,7 minutos) y siempre se realizó entre las 11:00 y las 13:00 horas para eliminar posibles efectos circadianos en el comportamiento.



**Figura 22.** Esquema representativo del diseño experimental. Abreviaturas: ELISA: ensayo inmunoenzimático; qPCR: PCR en tiempo real; T: territorial; NT: no-territorial.

Luego de la observación de la filmación para confirmar el estatus que había sido asignado a cada pez, se removieron la pareja territorial y el individuo de menor rango del acuario experimental y se extrajo sangre de cada uno de ellos para la medición de hormonas esteroideas, mediante punción de la vena caudal utilizando jeringas de 1 ml con agujas 27 gauges x ½ pulgada previamente tratadas con heparina como anticoagulante. La sangre se recolectó en tubos de polipropileno de 1,5 ml previamente heparinizados. Al igual que para la filmación, con el fin de evitar eventuales variaciones circadianas en los niveles hormonales, el muestreo se realizó entre las 14:00 y las 14:30 h. Las muestras de sangre se guardaron en heladera durante 24 h y luego se centrifugaron en frío, a 3000 revoluciones por minuto (rpm), durante 15 minutos, para separar el plasma de los elementos figurados sanguíneos. Por último, el plasma fue recolectado y almacenado a -20 °C hasta el momento de la medición de las hormonas.

Debido a la separación temporal entre el momento de la filmación (11:00-13:00 h) y la obtención de las muestras de sangre (14:00-14:30), existió la posibilidad de una eventual desconexión entre el comportamiento y los niveles hormonales registrados, ya sea por la propia variación de ambas variables durante el día como por la variabilidad producto de las distintas interacciones que puede haber experimentado un pez con diferentes miembros de su grupo a la mañana y a la tarde. Para evaluar el posible efecto de la separación temporal se realizó un experimento paralelo (n=4) utilizando un grupo distinto de peces. Al igual que en el experimento principal, cada grupo experimental estuvo conformado por seis chanchitas de tamaño similar, con una proporción de sexos desconocida y la mañana en que se observaron los despliegues reproductivos por parte la pareja territorial se procedió con la filmación del acuario por aproximadamente 23 minutos, entre las 11:00 y 13:00 h y una segunda filmación más tarde ese mismo día, entre las 14:00 y las 14:30 h. Luego los animales territoriales y el individuo NT de menor rango fueron sacrificados para identificar su sexo. En las videograbaciones de ambos experimentos se cuantificó la frecuencia de los comportamientos agresivos y sumisos por parte del macho T y del macho NT de menor rango, y con esta información se construyó un índice de comportamiento agonístico para cada individuo (en la sección "Análisis del video" se detallan los comportamientos registrados y cómo se generó el índice de comportamiento agonístico). Luego se evaluó la constancia del índice calculado para cada pez a la mañana y a la tarde, mediante el cálculo del índice de repetitividad acorde a Nakagawa y Schielzeth (2010) por el método basado en el análisis de la varianza (ANOVA, del inglés "analysis of variance"). El índice de repetividad, R, es una medida de la constancia comportamental (Lessells y Boag, 1987) y varía entre cero (inconstistente) y uno (altamente consistente). El índice de comportamiento agonístico presentó un nivel de constancia elevado entre los dos puntos temporales evaluados (R=0,99; 95% Intervalo de Confianza: 0,96-1,01; p<0.0001; Figura 23). Esto implica que si hubiésemos realizado la filmación de los acuarios experimentales antes de la extracción de sangre (entre 14:00 y 14:30 h) se hubiese obtenido el mismo índice de comportamiento agonístico que el que finalmente resultó de la medición más temprana. Por otro lado, el índice de comportamiento agonístico utilizado no distingue la identidad y rango de los individuos que interactúan, sino que simplemente es reflejo de la frecuencia de los comportamientos agresivos y sumisos del animal evaluado.



**Figura 23.** Variación temporal en el índice de comportamiento agonístico. Valores promedios de los índices de comportamiento agonístico de machos territoriales (T) y no-territoriales (NT) evaluados por la mañana y por la tarde (n=4).

En cada grupo experimental, inmediatamente luego de la extracción de sangre, se procedió con la anestesia y eutanasia de los peces colocándolos en una solución 0,1% de benzocaína, tal y como fue descripto en el capítulo I. De cada animal se registraron el peso, el largo total y el largo estándar. Luego se continuó con la disección de las gónadas para determinar el sexo de los individuos y se calculó el índice gonadosomático (IGS; [peso gónada/peso total del animal] X100). Una de las gónadas de cada pez (derecha o izquierda al azar) se fijó en solución de Bouin para la evaluación de su composición celular como indicador del estado reproductivo del animal (el procedimiento se detalla en la sección "*Cuantificación celular del testículo*"). A continuación se realizó la disección del cerebro anterior e hipófisis de cada pez y ambos órganos se colocaron en 200 µL de RNAzol® frío, para el análisis de la expresión de aromatasa cerebral por qPCR. Los procesos de extracción del ARN mensajero y la síntesis del ADNc fueron idénticos a los descriptos en el capítulo I. Las muestras de ADNc se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

En total se realizaron 21 experimentos para el estudio de la relación del comportamiento agonístico con la expresión de aromatasa cerebral, y la caracterización del perfil endocrino y estadio gonadal asociado al estatus social. Sin embargo, en tan sólo once de ellos se estableció una pareja territorial dentro de un período de 15 días. En nueve de los once experimentos, el individuo NT de menor rango resultó ser macho. El análisis del efecto del estatus social sobre la fisiología y expresión génica en el cerebro de chanchita, resulta más sencillo en comparaciones del tipo intra-sexuales al eliminar el factor sexo como variable, por lo tanto y dado que el número de experimentos con hembras resultó insuficiente para su

análisis estadístico, sólo se presentan los resultados de los experimentos correspondientes a machos T y NT de menor rango (n=9).

#### Análisis de la filmación

Se cuantificaron todas las interacciones agonísticas realizadas por el macho T y el NT de menor rango, ya sea entre ellos o con cualquiera de los otros peces del acuario experimental. Los comportamientos agresivos registrados incluyeron: (i) persecución (cuando el pez focal persigue a otro pez que huye de él a lo largo de una distancia relativamente larga), (ii) mordidas (realizadas por el pez focal en las aletas o laterales de otro pez) y (iii) embestidas (acercamiento rápido y de corta distancia, que no finaliza en contacto físico). Los comportamientos sumisos cuantificados fueron: (i) escape (cuando el pez focal nada alejándose de otro pez en respuesta a una persecución, mordida o embestida) y (ii) respuesta pasiva (cuando el pez focal no escapa en respuesta a una mordida o embestida, pero permanece inmóvil, casi en posición vertical, con la cabeza hacia arriba). Como el tiempo de filmación varió entre los distintos experimentos, la frecuencia del comportamiento agonístico se expresó como frecuencia de un determinado comportamiento por minuto.

Para el análisis de la relación entre el comportamiento agonístico, los perfiles hormonales y la expresión de aromatasa cerebral, se optó por llevar a cabo un análisis de componentes principales (ACP), en lugar de analizar cada uno de los comportamientos agresivos y sumisos registrados por separado. Por lo tanto, la frecuencia de todos los comportamientos cuantificados fue analizada mediante un ACP y el factor de cada individuo del primer componente principal (CP1) se empleó como índice del comportamiento agonístico. El diagrama de dispersión del primer y segundo componente principal muestra una clara separación de los machos T y NT sobre el CP1 (Figura 24). Un valor positivo del índice de comportamiento agonístico estuvo asociado a una mayor frecuencia de comportamientos agresivos. Por el contrario, valores más negativos del índice de comportamiento agonístico, se asociaron a una mayor frecuencia de comportamientos subordinados. La combinación de los distintos comportamientos en un único índice del comportamiento agonístico permite un análisis más integral de la actividad del individuo, a diferencia del análisis de cada uno de los comportamientos por separado.



Figura 24. Diagrama de dispersión de los factores resultantes de un análisis de componentes principales para machos territoriales (puntos rojos) y noterritoriales (círculos azules). El análisis incorporó la frecuencia de mordidas, persecuciones, embestidas, respuesta pasiva y escapes. El primer componente 71,13% explicó el principal de la variabilidad total. Abreviaturas: CP1: primer componente principal; CP2: segundo componente principal.

#### Medición de hormonas esteroideas

Se evaluaron los niveles plasmáticos de los esteroides sexuales 17β-estradiol, testosterona y 11-cetotestoterona, siendo esta última un derivado de la testosterona producto de su oxidación, que actúa como el principal andrógeno bioactivo regulando el desarrollo de caracteres sexuales secundarios, y comportamientos agresivos y reproductivos en la gran mayoría de los machos de teleósteos (Borg, 1994; Hishida y Kawamoto, 1970). También se midieron los niveles de cortisol. Debido a que la concentración sanguínea del cortisol puede aumentar rápidamente producto de la manipulación del animal durante el muestreo, únicamente se lo cuantificó en aquellas muestras cuyo tiempo de extracción fue menor a los cuatro minutos. Se estableció este tiempo límite, dado que es el momento a partir del cual se observó un aumento en los niveles de este glucocorticoide por sobre el nivel basal luego de la captura, en una especie evolutivamente cercana a la chanchita, el cíclido africano *A. burtoni* (Fox et a., 1997).

Las mediciones se realizaron mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA, del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*) en el laboratorio de Metabolismo y Reproducción de Organismos Acuáticos, del departamento de Fisiología, Instituto de Biociências de la Universidad de San Pablo (USP) (Brasil). En todos los casos las muestras se analizaron por duplicado y sólo se continuó con el análisis estadístico de aquellas muestras cuyo coeficiente de variación entre réplicas resultó menor al 20% (coeficiente de variación promedio para las cuatro hormonas= 8,1±2,2%). En cada placa se sembraron, además, un control negativo en donde el volumen de plasma fue reemplazado por su equivalente de la solución vehículo, y una serie de diluciones de la hormona específica analizada provista por el fabricante, para la construcción de una curva de calibración o curva patrón. Para algunos animales el volumen de plasma obtenido resultó insuficiente para llevar a cabo la medición de las cuatro hormonas, razón por la cual para alguna de ellas el tamaño de la muestra (n) es menor a nueve.

Las diluciones de trabajo para cada hormona, así como la puesta a punto de los kits de ELISA comerciales utilizados, se detallan en la tabla 5 y fueron establecidas por el Lic. Morandini del laboratorio de Neuroendocrinología y Comportamiento (DBBE, UBA) en conjunto con el Dr. Honji de la USP, en estudios previos sobre la fisiología del estrés en la chanchita (Morandini y col., 2014; Morandini y col., 2015).

#### Cuantificación celular del testículo

Para evaluar el estado y potencial reproductivo de cada uno de los machos se analizó la composición celular de sus testículos. Para ello, uno de los testículos –seleccionado al azarde cada pez se fijó en solución de Bouin por 18 h a temperatura ambiente. Luego de la fijación, las piezas se deshidrataron a través de un pasaje por alcoholes de graduación creciente, se aclararon en xilol, y finalmente fueron embebidas en Paraplast para el armado de los tacos. Las piezas se cortaron en el plano transversal a 5 µm con un micrótomo de desplazamiento (Leitz Wetzlar), los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados (2%) y se colorearon con la técnica de Tricrómico de Masson. Para evitar variaciones por la región del testículo analizada (anterior, medio o posterior) sobre la composición celular del mismo, en todos los caso sólo se utilizaron cortes de la región media del órgano. Finalmente, para realizar el análisis cuantitativo de la composición celular se seleccionaron tres cortes al azar para cada animal, separados por al menos cinco secciones entre sí para evitar un posible sobre-conteo de los tipos celulares de mayor tamaño, y se fotografiaron en un microscopio Microphot FX (Nikon) a 400X, acoplado a una cámara digital (Coolpix 4500, Nikon).

Para estimar el porcentaje de los distintos tipos celulares que conforman el testículo, se utilizó el programa CPCe (<u>http://cnso.nova.edu/cpce/</u>). Este programa fue inicialmente diseñado para el estudio de la diversidad de corales en arrecifes y básicamente permite superponer de manera azarosa sobre una fotografía un número de puntos determinado por el usuario. Luego, el usuario determinará la identidad del coral, o el elemento a estudiar, debajo de cada punto. Este tipo de análisis se ha utilizado previamente de manera exitosa para la estimación de la composición celular de testículos de peces cíclidos (Birba y col., 2015; Maruska y col., 2011). Como primer paso, fue necesario establecer el número mínimo de puntos a superponer sobre cada fotomicrografía, de manera tal de obtener una muestra representativa de la población celular. Para ello, se realizó un estudio piloto, donde sobre seis fotomicrografías seleccionadas al azar de seis peces distintos (tres T y tres NT), se

superpusieron aleatoriamente 45, 60, 75 o 90 puntos y se cuantificaron los tipos celulares debajo de cada punto (más adelante se detallan las células cuantificadas). El porcentaje promedio de cada tipo celular se analizó mediante un conjunto de pruebas de ANOVA de un factor (número de puntos), que permitieron determinar que a partir de 60 puntos en adelante resultaba indistinto el número de marcas superpuestas sobre las fotomicrografías para la estimación de la composición celular del testículo. Por lo tanto, el análisis se llevó a cabo superponiendo 60 puntos al azar sobre cada una de las tres fotomicrografías de cada macho (Figura 25). Se estimó el porcentaje de espermatogonias A, espermatogonias B, espermatocítos (primarios y secundarios), espermátidas, espermatozoides, y tejido intersticial (tejido conectivo, vasos sanguíneos, macrófagos y células de Leydig). Los porcentajes obtenidos entre las tres fotomicrografías de cada animal fueron promediados. Para la identificación de los distintos tipos celulares se utilizó un estudio sobre la caracterización histológica del testículo de chanchita realizado por Rey Vázquez y col. (2012).



180 puntos analizados por pez sobre tres cortes seleccionados al azar.



**Figura 25.** Análisis de la composición celular del testículo. Esquema representativo de la metodología empleada. La cuantificación de las células del testículo, utilizando el programa CPCe, se llevó a cabo sobre tres fotomicrografías al azar de cortes de la región central del testículo de cada pez. A la derecha se muestra una captura de pantalla donde puede observarse la modalidad de disposición de puntos de manera aleatoria sobre la fotomicrografía del testículo

**Tabla 5.** Listado y especificaciones de los kits de ELISA comerciales utilizados para la medición de hormonas esteroideas en machos de chanchita de distinto estatus social. El paralelismo a la curva de calibración o curva patrón se evaluó con una serie de 4 diluciones seriadas, mediante del coeficiente de correlación de Pearson ( $\rho$ ). \*

Hormona	Kit de ELISA	Variación	Variación	Р	Dilución
		intra-ensayo	inter-ensayo		
Testosterona	IBL International, Hamburgo, Alemania	10,56%	15,58%	0,990	1:2
11-cetotestosterona	Cayman Chemical Company, MI, E.E.U.U.	11,10%	5,40%	0,992	1:6 *
17β-estradiol	IBL International, Hamburgo, Alemania	18,58%	5,30%	0,983	1:2
Cortisol	IBL International, Hamburgo, Alemania	8,56%	10,28%	0,972	1

\* Algunas muestras tuvieron que ser diluidas hasta 1:50 dado que los valores obtenidos caían fuera de la curva de la calibración.

#### Medición de la expresión relativa de aromatasa cerebral en cerebro e hipófisis

Para analizar la expresión de aromatasa cerebral en el cerebro anterior e hipófisis de machos de distinto estatus social, y su relación con el comportamiento agonístico, se utilizaron como molde en una reacción de qPCR, diluciones 1:10 de las muestras de ADNc de cerebro e hipófisis de los machos T y NT de menor rango. Se empleó el par de *primers* qPCR-Chanchaba-4 (capítulo I, página 32) en una concentración final de 1 µM. Cada reacción se realizó por duplicado, y se utilizó el equipo StepOnePlus<sup>™</sup> Real-Time PCR Systems (Thermo-Fisher Scientific). Las condiciones de ciclado fueron las siguientes:

95ºC por 5 minutos: 1 Ciclo

95ºC por 30 segundos

60 °C por 15 segundos



72ºC por 20 segundos (lectura SYBR Green y Rox)

Curva de disociación (95-60 °C, con una resolución de 0,5 °C)

Se utilizó la expresión de ARP como gen referencia. Los datos crudos de fluorescencia fueron analizados con el programa LingReg-PCR para la estimación del número inicial de copias del ADNc ( $N_0$ ) de aromatasa cerebral y ARP. Finalmente, los valores de  $N_0$  de aromatasa cerebral de cada muestra se relativizaron a los de ARP correspondientes.

#### Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa Statistica 8 (StatSoft <sup>®</sup>). El estudio de la frecuencia de comportamientos agresivos y sumisos en los machos de distinto estatus social se analizó mediante la prueba no-paramétrica de signo-rango de Wilcoxon para muestras pareadas. La variación en los niveles de hormonas esteroideas, en el IGS y en la composición celular de los testículos se evaluó a través de un ANOVA con un diseño de bloques aleatorizados (ANOVA-DBA), considerando a cada acuario experimental como un bloque (factor aleatorio). La composición celular de los testículos se analizó a través de varios ANOVA-DBA, uno para cada tipo celular. Para evitar falsos positivos como resultado de las múltiples hipótesis evaluadas, dentro de cada uno de los análisis mencionados, se aplicó la corrección en dos pasos de tasa de falsos descubrimientos (FDR, del inglés *false discovery rate*) (Benjamini y col., 2006). Consecuentemente, los valores-p fueron corregidos utilizando la planilla provista por Pike (2011).

La variabilidad en los niveles de expresión de aromatasa cerebral en el cerebro e hipófisis de machos T y NT de menor rango se evaluó por medio de una prueba de *t* de Student, una para cada órgano. La asociación entre los niveles de expresión de aromatasa cerebral y las hormonas esteroideas con el índice del comportamiento agonístico (CP1) se realizó a través del coeficiente de Pearson. Nuevamente se aplicó la corrección FDR, producto de las múltiples hipótesis puestas a prueba.

Finalmente, en los casos donde correspondió, se verificó el cumplimiento de los supuestos de un ensayo paramétrico como lo son la normalidad y la homocedasticidad de las muestras. En algunas ocasiones fue necesario transformar las variables para conseguir el cumplimiento de los supuestos. Se evaluó la presencia de valores atípicos (residuos estudentizados >  $\pm$ 2), y los mismos fueron eliminados de los análisis correspondientes. Se estableció la significancia estadística cuando el valor de p fue menor a 0,05. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  error estándar.



Con respecto al proceso de establecimiento de la jerarquía social, se pudo observar el surgimiento de un pez T luego de 24-48 h de haber colocado al grupo de peces en el acuario experimental. La presencia del individuo T resultó evidente dado que defendía agresivamente un territorio, alejando al resto de los individuos del acuario. Durante este período de cierta inestabilidad social, y a diferencia de lo observado al momento del muestreo, el individuo T era desafiado por otras chanchitas, mayormente a través de despliegues agresivos como la apertura del opérculo o la extensión de las aletas, e incluso por intermedio de interacciones que involucraron contacto físico como tomarse de las bocas. En ocho de los nueve acuarios experimentales, el animal T detectado en las primeras 48 h fue aquel que finalmente formó pareja y por ende fue aquel que finalmente fue utilizado para la caracterización de las hormonas, las gónadas y la expresión de la aromatasa cerebral. La formación de una pareja territorial resultó evidente a los siete días después de haber iniciado el experimento, momento en cual la pareja comenzó con el despliegue de comportamientos reproductivos (7,11± 1,42 días; mínimo: 3 días, máximo: 14 días). En siete de los nueve experimentos, el pez que primero se estableció como T resultó ser macho.

#### Estatus social y comportamiento agonístico

Una vez que la pareja T comenzó con los despliegues reproductivos más del 50% del repertorio agonístico del macho T estuvo representado por mordidas en los laterales y las aletas de los peces NT (Figura 26a). Por otro lado, el conjunto de acciones agonísticas de los machos NT de menor rango consistió principalmente en escapar del ataque de los peces dominantes del acuario (Figura 26b).

Como era de esperarse, los machos T realizaron significativamente más persecuciones (z = -2,67; p=0,01; Figura 27a), mordidas (z=-2,67; p=0,01, Figura 27b) y embestidas (z=-2,67; p=0,01; Figura 27c) con respecto a los machos NT de menor rango. No obstante, un macho NT también agredió a los otros peces, en particular al que se encontraba inmediatamente por encima de él en rango dentro de la jerarquía, como respuesta a un ataque de éste último. Sorpresivamente, algunos machos T fueron sujeto del ataque de peces subordinados, sin embargo sólo se observó este comportamiento en cinco de las 1547 interacciones registradas para los machos T. En tales situaciones el macho T respondió escapando del agresor (80% de los casos) o de forma pasiva (20% de las veces), comportamientos típicamente realizados por

los machos NT de menor rango (respuesta pasiva: z=-2,38; p=0,015; Figura 27d; escapes: z=-2,67; p=0,01; Figura 27e).



**Figura 26.** Variación en el comportamiento asociado al estatus social. Gráficos de torta donde se presenta la frecuencia de cada comportamiento como porcentaje del total de interacciones agonísticas registradas



#### Perfiles hormonales asociados al estatus social

Para los machos de chanchita, el hecho de pertenecer a un determinado estatus social, territorial vs. no-territorial, estuvo acompañado por perfiles hormonales distintos. Los machos T presentaron en promedio 10 veces más 11-CT con respecto a los machos NT de menor rango (F<sub>1.6</sub>=24,03; p=0,005; Figura 28a). Los niveles de testosterona plasmática fueron más del doble en los machos T comparado con los observados en los NT de menor rango (F<sub>1.5</sub>=16,43; p=0,01; Figura 28b), mientras que el patrón opuesto se observó para el caso de la concentración plasmática de E<sub>2</sub>, en donde los niveles promedios en los machos NT de menor rango fueron más del doble comparados con los de machos T (F<sub>1.6</sub>=9,23; p=0,013; Figura 28c). Los niveles plasmáticos de cortisol no variaron entre machos de distinto estatus social (F<sub>1.6</sub>=0,12; p=0,742; Figura 28d). La relación  $E_2$ : ( $E_2$  + testosterona), utilizada como un indicador de la conversión sistémica de testosterona a E<sub>2</sub> por la actividad de la enzima aromatasa fue más de tres veces superior en machos NT de menor rango comparado con el estimado para los machos T (F<sub>1,4</sub>=12,03; p=0,013; Figura 28e). Por otro lado, el coeficiente 11-CT:(11-CT + testosterona), utilizado como índice de la síntesis de 11-CT a partir de testosterona presentó una tendencia a ser mayor en los machos T con respecto a los machos NT de menor rango (F<sub>1.5</sub>=5,84; p=0,072; Figura 28f).

El índice de comportamiento agonístico (CP1) correlacionó positivamente con los niveles plasmáticos de 11-CT (p=0,79; p=0,0028; Figura 29a), y negativamente con la concentración de  $E_2$  en plasma (p=-0,58; p = 0,039; Figura 29c). No se observó correlación alguna entre el índice de comportamiento agonístico (CP1) y los niveles plasmáticos de testosterona (p=0,13; Figura 29b) o cortisol (p=0,46; Figura 29d). El índice de la conversión de testosterona a 11-CT correlacionó positivamente con el índice de comportamiento agonístico (CP1) (p=0,72; p=0,014; Figura 29e). Por otro lado, no se detectó asociación alguna entre los índices de síntesis de E2 y de comportamiento agonístico (p=0,085; Figura 29f).



**Figura 28.** Perfiles hormonales plasmáticos asociados al estatus social. A los valores de 11cetotestosterona y cortisol se les aplicó la transformación de logaritmo. El asterisco indica diferencias significativas. Abreviaturas: 11-CT: 11-cetotestosterona; T: territorial; NT: noterritorial.



**Figura 29.** Relación entre la concentración plasmática de hormonas esteroideas y el índice de comportamiento agonístico (CP1). p: coeficiente de Pearson. Abreviaturas: 11-CT: 11-cetotestosterona.

#### Potencial reproductivo de machos de distinto estatus social

Los machos de distinto estatus social también se diferenciaron a nivel de sus testículos. Los machos T presentaron testículos relativamente más grandes que los machos NT de menor rango, como lo indicó el mayor valor de IGS obtenido para los machos T (F<sub>1.6</sub>=17,41; p=0,006; Figura 30a). El IGS correlacionó positivamente con los niveles plasmáticos de 11-CT (p=0,91; p<0,0001; Figura 31), mientras que no se observó ninguna correlación con las restantes hormonas evaluadas. Los testículos de los machos T se caracterizaron por presentar una preponderancia de espermatozoides (34,5%), mientras que los espermatocitos fueron el tipo celular dominante en los testículos de machos NT de menor rango (39,1%). Al contrastar la composición celular de los testículos de los machos de distinto estatus social, pudo observarse que el porcentaje de espermatocitos ( $F_{1,6}$ =9,32; p=0,031; Figura 30b) y espermátidas (F<sub>1.6</sub>=10,15; p=0,031; Figura 30b) fue mayor en los machos NT de menor rango, mientras que los machos T presentaron un porcentaje más elevado de espermatozoides (F<sub>1.7</sub>=60,53; p=0,0005; Figura 30b). En cuanto a la relación entre los distintos tipos celulares y las hormonas esteroideas, sólo se observó una asociación moderada con los niveles plasmáticos de E2. Por un lado, la concentración de E2 correlacionó positivamente con el porcentaje de espermatocitos (ρ=0,66; p=0,019; Figura 32a), y por el otro lado, la asociación fue negativa con el porcentaje de espermatozoides (p=-0,62; p=0,03; Figura 32b).



**Figura 30.** Morfología del testículo asociada al estatus social. (a) Variación en el índice gonadosomático (IGS) y (b) composición celular del testículo de machos territoriales (T) y no-territoriales (NT). Es asterisco indica diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 31.** Relación entre el índice gonadosomático (IGS) y la concentración plasmática de 11cetotestosterona (11-CT). La estrella indica un potencial punto influyente sobre la correlación. No obstante, aún tras su eliminación, continuó observándose una asociación entre el IGS y los niveles plasmáticos de 11-CT, aunque de menor intensidad ( $\rho$ =0,81; p=0,005).  $\rho$ : coeficiente de Pearson.



**Figura 32.** Relación entre la concentración de  $17\beta$ -estradiol plasmático y el porcentaje de (a) espermatocitos y (b) espermatozoides en testículos de machos de chanchita. p: coeficiente de Pearson.

### Expresión de aromatasa cerebral en machos de distinto estatus social y su relación con el comportamiento agonístico

No se observaron diferencias en los niveles de expresión relativos de aromatasa cerebral entre los machos T y los NT de menor rango, tanto a nivel del cerebro anterior como de la hipófisis (cerebro:  $F_{1,10}$ =0,03; p=0,87; hipófisis:  $F_{1,7}$ =0,19; p=0,67; Figura 33a y b, respectivamente). Sin embargo, al realizar un análisis DBA considerando a cada acuario

experimental como un bloque, y eliminar uno de los grupos por presentar valores atípicos, se observó una tendencia a una mayor expresión de aromatasa cerebral en el cerebro de los machos NT (F<sub>1,4</sub>=7,48; p=0,052, ANOVA-DBA).

Los niveles relativos de expresión de aromatasa cerebral en el cerebro anterior de los machos T y los NT, correlacionaron positivamente con la concentración plasmática de  $E_2$  ( $\rho$ =0,77; p=0,003; Figura 34a), mientras que no se detectó asociación alguna con los niveles de testosterona, 11-CT, y cortisol en el plasma y los índices de conversión de testosterona a  $E_2$  y 11-CT (p>0,05). Sólo se observó una correlación entre los niveles relativos de expresión de aromatasa cerebral en hipófisis y la concentración plasmática de testosterona ( $\rho$ =0,83; p=0,022; Figura 35). Los niveles relativos de expresión de aromatasa cerebral en ambos órganos –cerebro e hipófisis- no correlacionaron entre sí (p=0,47).

Con respecto a la posible asociación entre el índice de comportamiento agonístico (CP1) con la expresión de aromatasa cerebral, el análisis reveló una correlación positiva a nivel de la hipófisis (p=0,86; p=0,007; Figura 36b), no detectándose una asociación entre ambas variables a nivel del cerebro (Figura 36a).



**Figura 33.** Niveles relativos de expresión del gen de aromatasa cerebral (*cyp19a1b*) en (a) cerebro y (b) glándula hipófisis de machos territoriales (T) y no-territoriales (NT). Abreviaturas: n.s.: no significativo; u.a.: unidades arbitrarias.



**Figura 34.** Análisis de la asociación de los niveles relativos de expresión génica de aromatasa cerebral (*cyp19a1b*) en (a) el cerebro y (b) la hipófisis con la concentración plasmática de  $17\beta$ -estradiol. Abreviaturas: u.a.; unidades arbitrarias.  $\rho$ : coeficiente de Pearson



**Figura 35.** Análisis de la asociación entre los niveles relativos de expresión génica de aromatasa cerebral (*cyp19a1b*) en la glándula hipófisis y la concentración plasmática de testosterona. El punto señalado con una estrella es determinante para la correlación. Abreviaturas: u.a.; unidades arbitrarias. p: coeficiente de Pearson.



**Figura 36.** Análisis correlacional de los niveles relativos de expresión génica de aromatasa cerebral (*cyp19a1b*) en (a) el cerebro y (b) en la glándula hipófisis con el índice de comportamiento agonístico (primer componente principal: CP1). Abreviaturas: u.a.; unidades arbitrarias. p: coeficiente de Pearson.



Cuando los animales compiten por un recurso limitado, ya sea alimento, territorio o una pareja, las interacciones sociales que establezcan determinarán cuál/es individuo/s obtiene/n acceso al recurso (Svare, 1983). En el momento en que se introdujeron seis chanchitas de tamaño similar en un acuario experimental, el área alrededor de la laja central se tornó un recurso preciado, dado que suele ser el tipo de sustrato donde esta especie desova (Alonso y col., 2011). Además, el tamaño de acuario utilizado posiblemente se superpuso con el tamaño promedio del territorio de una chanchita adulta, dado que en todos los casos sólo se observó el establecimiento de una única pareja, lo que probablemente derivó en una intensificación de la competencia y por lo tanto de las interacciones sociales. El patrón de formación de la pareja territorial coincide con aquel descripto para otras especies de cíclidos territoriales con cuidado biparental (Baerends y Baerends-Van Roon, 1950), y se asemeja al de otras especies de cíclidos Neotropicales como el cíclido convicto (Amatitlania nigrofasciata; Mackereth y Keenleyside, 1993), la acara de bandas (Bujurquina vittata; Timms y Keenleyside, 1975), y el cíclido de Texas (Herichthys cyanoguttatus; Haley, 1987), en el sentido de que los individuos de mayor rango de cada sexo dentro de una población son los primeros en formar pareja.

Luego de 24 horas de la colocación de los peces en los acuarios experimentales, los animales interactuaron unos con otros a través de contiendas agresivas y despliegues comportamentales sin contacto físico. Estos últimos incluyeron la apertura de los opérculos, la erección de las aletas dorsal, pélvicas y anal, la ubicación de uno al lado del otro y el "golpe" de cola, desplazando un volumen de agua hacia su rival, todos ejemplos de despliegues típicamente observados en otras especies de cíclidos Neotropicales (Rogers, 1988; Teresa y Goncalves-de-Freitas, 2011; Timms y Keenleyside, 1975). Este tipo de interacciones que no involucran contacto físico, permiten evaluar al contrincante sin el riesgo de sufrir heridas que pudiesen resultar letales. Una vez establecida la jerarquía en los acuarios experimentales, únicamente se observaron interacciones con contacto físico, probablemente debido a que el proceso de evaluación de los miembros del grupo ya no era necesario. Por el contrario, un "recordatorio" o refuerzo del rango relativo de cada pez se ejecutó a través de mordidas, persecuciones, embestidas, escapes y respuestas pasivas. Resulta oportuno mencionar en esta parte de la discusión la existencia de evidencia que sugiere fuertemente la capacidad de los peces cíclidos, o al menos de uno de ellos (A. burtoni), de inferir la posición o rango relativo de otros peces de la población simplemente a través de la observación del conjunto de interacciones entre ellos, proceso que en psicología cognitiva se conoce como inferencia transitiva (Grosenick y col., 2007).

Como se observó en otras especies de cíclidos (Fernald y Hirata, 1977; Oliveira y Almada, 1996), y como también fue previamente descripto para la chanchita (Alonso y col., 2011), el individuo de menor rango rara vez se comportó agresivamente. Los comportamientos agresivos se tornaron unidireccionales y fueron realizados por los individuos dominantes hacia los subordinados, mientras estos últimos limitaron su repertorio agonístico a escapar y responder de forma pasiva a las agresiones de las otras chanchitas. Esta estructura social asimétrica podría resultar beneficiosa tanto para las chanchitas T como para las NT, dado que todos los peces experimentan una reducción del costo que resultaría de enfrentarse constantemente en contiendas (Gurney y Nisbet, 1979). Sin embargo, los individuos NT sufren una reducción en su *"fitness"* inmediato, dado que la posibilidad de reproducirse se halla socialmente bloqueada por los individuos territoriales de mayor rango (Sloman y Armstrong, 2002). No obstante, algunos trabajos en otras especies de cíclidos sugieren que la energía que no es utilizada en contiendas podría resultar beneficiosa para los individuos NT, si es trasladada al crecimiento. Por ejemplo, en el cíclido africano *A. burtoni* se observó una mayor tasa de crecimiento en machos NT con respecto a machos T (Hofmann y col., 1999). El traslado

de los recursos hacia el crecimiento corporal aumenta la probabilidad de que un individuo NT pueda en un futuro controlar y defender un territorio.

Al igual que para el comportamiento agonístico, también se observaron asimetrías en los perfiles de las hormonas esteroideas evaluadas entre los machos de chanchita de distinto estatus social. Se observó una mayor concentración de los andrógenos testosterona y 11-CT en el plasma de los machos T con respecto a la de los machos NT. Esto es coherente con la estrecha asociación descripta para los andrógenos y la dominancia en un gran número de vertebrados (Parikh y col., 2006; Taves y col., 2009). De hecho, existe una gran cantidad de trabajos en donde la reducción de los niveles de andrógenos en circulación resulta en una disminución del comportamiento agresivo, que es luego recuperado por el tratamiento con andrógenos exógenos (Francis y col., 1992; Lincoln y col., 1972; Weiss y Moore, 2004). En chanchita, la concentración plasmática de 11-CT, pero no así de la testosterona, correlacionó positivamente con el índice de comportamiento agonístico, es decir que una mayor frecuencia de comportamientos agresivos estuvo acompañada por mayores niveles de 11-CT. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que 11-CT es el principal andrógeno bioactivo involucrado en la regulación del comportamiento agresivo en la gran mayoría de los machos de teleósteos (Borg, 1994; Hishida y Kawamoto, 1970). El índice de conversión de testosterona a 11-CT presentó una tendencia a ser más alto en lo machos T y, además, correlacionó positivamente con el índice de comportamiento agonístico, lo que sugiere un posible efecto del ambiente social sobre la maquinaria enzimática involucrada en la síntesis de 11-CT. Sin embargo, en los machos del gobio, L. dalli, el bloqueo de la síntesis de 11-CT, específicamente en el cerebro, no presentó efecto alguno sobre la agresividad territorial, pero rápida y temporalmente eliminó el comportamiento parental (Pradhan y col., 2014). La hormona 11-CT es sintetizada en las células de Leydig del testículo (Dufau y col., 1997; Payne y col., 1995), si bien el hígado representa también una fuente importante de la misma (Cavaco y col., 1997). En este misma línea, la castración de los machos de A. burtoni resultó en una disminución del comportamiento agresivo, pero sin verse modificado el estatus social de los individuos (Francis y col., 1992), resaltando además la importancia del análisis de la variación interindividual en el comportamiento y no simplemente del estatus.

Históricamente, ha existido una creencia popular de que el comportamiento agresivo entre machos se encuentra principalmente regulado por andrógenos (Simon, 2002). Sin embargo, en las últimas décadas el E<sub>2</sub> surgió como un elemento clave en la regulación del comportamiento agresivo y reproductivo de los machos de vertebrados (Huffman y col., 2013; Ogawa y col., 2000; Soma y col., 2000b; Schlinger y Callard, 1990). En chanchita, los machos NT

81

de menor rango presentaron niveles de E<sub>2</sub> plasmático más elevado que al observado en los machos T. A su vez, la concentración de E<sub>2</sub> correlacionó negativamente con el índice de comportamiento agonístico. De manera acorde, otros trabajos informaron una relación negativa entre el comportamiento agresivo y los niveles de E<sub>2</sub>, al observar una disminución en la frecuencia del comportamiento agresivo luego del tratamiento con E2 o análogos de estrógenos (Bell, 2001; Filby y col., 2012; Gonçalves y col., 2007; Marsh-Hunkin y col., 2013). Sin embargo, la situación opuesta ocurre en A. burtoni, donde los machos T presentaron mayores niveles de  $E_2$  que los machos NT (Maruska y Fernald, 2010a; O'Connell y Hofmann, 2011), y el tratamiento con E<sub>2</sub> aumentó la frecuencia de comportamientos agresivos, independientemente del estatus social (O'Connell y Hofmann, 2011). Estas diferencias no pueden ser explicadas en base a la estabilidad de la jerarquía al momento del muestro, dado que en el estudio de O'Connell y Hofmann (2011), el rango jerárquico de los machos de A. *burtoni* utilizados fue constante durante una semana, similar al presente estudio en chanchita. A su vez en A. burtoni, se observó un rápido aumento en los niveles de E<sub>2</sub> plasmático durante el pasaje de macho NT a T, apenas 30 minutos luego del surgimiento de la oportunidad de ascenso social (Maruska y Fernald, 2010b). Una explicación posible puede desprenderse de los distintos sistemas reproductivos que caracterizan a estas especies de cíclidos. Por un lado, A. burtoni presenta un sistema del tipo lek, con cuidado maternal por incubación bucal. Por el otro, la chanchita es una especie monógama, con cuidado biparental de los huevos y las larvas. Algunos trabajos informaron un efecto negativo de E<sub>2</sub> sobre el cuidado paternal (Knapp y col., 1999; Specker y Kishida, 2000), por lo que existe la posibilidad que los niveles menores de E<sub>2</sub> en los machos T de chanchita, sean una respuesta anticipatoria al inicio del período de cuidado parental.

Al igual que sucede en *A. burtoni*, varios trabajos en otros grupos de vertebrados señalan al  $E_2$  como elemento promotor del comportamiento agresivo (Huffman y col., 2013; Soma y col., 2000b; Trainor y col., 2008; Zumpe y col., 1993). Sin embargo, la mitad de estos estudios se llevaron a cabo fuera del período reproductivo, o en un contexto de fotoperiodo corto, cuando los mecanismos involucrados en la regulación del comportamiento agresivo, parecen diferir de aquellos que ocurren durante el período reproductivo (Soma y col., 2000a). En la otra mitad de los trabajos, se analizó el efecto de la inhibición de la síntesis de  $E_2$  utilizando agentes bloqueantes que actuaron sobre ambas variantes de la enzima. La actividad y/o expresión de la enzima aromatasa varía entre regiones del cerebro y es regulada diferencialmente en los distintos núcleos neuronales involucrados en la regulación del comportamiento social, donde el  $E_2$  ejerce un efecto local (Dickens y col., 2014; Huffman y col.,

2013; Remage-Healey y col., 2008; Ubuka y col., 2014). Por lo tanto, el tratamiento con un inhibidor de aromatasa bloquea la síntesis de  $E_2$  en todas las regiones del cerebro y en todos los otros órganos donde se exprese aromatasa, incluyendo en las áreas del cerebro involucradas en la regulación del comportamiento agresivo. No obstante, en el presente trabajo de tesis se midieron los niveles de  $E_2$  en la circulación general a partir de muestras de sangre obtenidas mediante punción de la vena caudal, y por lo tanto, no reflejan necesariamente los posibles cambios locales en la síntesis de estrógenos en el cerebro. En el cíclido Daffodil (*N. pulcher*), un experimento de estimulación por intrusión territorial resultó en un aumento en la frecuencia de comportamiento agresivo, mientras que los niveles de  $E_2$  en machos y hembras no resultaron afectados por la presencia del intruso, lo que refuerza la hipótesis que la concentración de  $E_2$  en circulación general no es un buen indicador del comportamiento agresivo (Desjardins y col., 2006).

En chanchita el índice de la conversión de testosterona a E<sub>2</sub> a nivel sistémico resultó más elevado en los machos NT, sin embargo no correlacionó con el índice de comportamiento agonístico. Esto sugiere que: (i) los niveles de E<sub>2</sub> en la circulación general serían la suma de varias fuentes reguladas diferencialmentey no necesariamente involucradas en la regulación del comportamiento agonístico (ii) el estatus social de machos, pero no así el comportamiento agonístico, estaría asociado a la actividad global de la enzima aromatasa, evaluada indirectamente a través del índice de conversión, (iii) en los machos NT existe una mayor disponibilidad de testosterona para su aromatización en  $E_2$ , dado que la metabolización a 11-CT se encuentra extremadamente reducida, proceso que aparentaría estar regulado a nivel comportamental, (iv) la agresividad y la sumisión no son dos extremos de un mismo comportamiento (combinados en el índice de comportamiento agonístico), y por lo tanto deberían ser analizados por separado. Los resultados de este capítulo de tesis permiten evaluar ésta última posibilidad. Para ello, se construyeron dos índices comportamentales: un índice del comportamiento subordinado, producto de la combinación lineal de la frecuencia de comportamientos sumisos a través de un ACP, y un índice de comportamiento agresivo, realizando un ACP con la frecuencia de comportamientos agresivos. El índice de comportamiento subordinado correlacionó fuerte y positivamente con los niveles de E<sub>2</sub> plasmáticos de los machos T y NT (p=0,77; r<sup>2</sup>=0,59; p=0,002), mientras que el índice de comportamiento agresivo presentó una tendencia hacia una asociación moderada y negativa  $(p=-0,52; r^2=0,27; p=0,057)$ . Aún por separado, ninguno de los índices comportamentales correlacionó con el índice de aromatización de testosterona a nivel sistémico, lo que indica que de ocurrir cambios en la metabolización de testosterona a E<sub>2</sub> asociados al comportamiento,

estos no se ven reflejados a nivel de la circulación general. De manera acorde, un estudio realizado por Remage-Haeley y col. (2008) en el ave diamante cebra (*Taeniopygia guttata*), comparó los niveles de  $E_2$  y testosterona en el cerebro y en la circulación general utilizando un protocolo de microdiálisis *in vivo*. La presentación de un estímulo social rápidamente generó cambios en las concentraciones de los esteroides en el cerebro de los machos y las hembras, mientras que los niveles plasmáticos permanecieron inalterados (Remage-Haeley y col., 2008). Los índices de comportamiento agresivo y subordinado tampoco correlacionaron con los niveles de testosterona o cortisol plasmáticos, pero sí lo hicieron con los niveles plasmáticos de 11-CT (índice comportamiento agresivo:  $\rho=0,80$ ;  $r^2=0,64$ ; p=0,0006; índice comportamiento subordinado:  $\rho=-0,58$ ;  $r^2=0,34$ ; p=0,035) y el índice de comportamiento agresivo correlacioná a 11-CT ( $\rho=0,59$ ;  $r^2=0,34$ ; p=0,035). En conjunto, la evidencia sugiere que los mecanismos endócrinos que regulan el comportamiento agresivo y sumiso presentan elementos en común, pero con efectos opuestos. Esto permitiría una respuesta armónica del animal, coordinada con su estatus social.

Los niveles plasmáticos de cortisol no variaron entre machos de distinto estatus social. Esto está en desacuerdo con el concepto de que la subordinación se encuentra directamente vinculada a mayores niveles de estrés, reflejados por concentraciones elevadas de glucocorticoides plasmáticos. La secreción de cortisol ha sido reportada de hecho, como un indicador primario de estrés crónico en peces teleósteos (Pankhurst, 2011), así como en muchos otros vertebrados (Baker y col., 2013), incluyendo la chanchita (Alonso y col., 2011; Morandini y col., 2014). Sin embargo, el estrés puede ser igualmente experimentado por individuos tanto de bajo como de alto rango dentro de un sistema social jerárquico, y qué sujeto y cómo lo experimenta es dependiente del tipo de organización y composición social, y de la propia variabilidad interindividual (Creel, 2001; Sapolsky, 2005). Por ejemplo, el babuino amarillo (*Papio cynocephalus*) de África central vive en grupos de tamaño variable regidos por un sistema jerárquico con dominancia lineal, en donde los machos de alto rango presentan los niveles de glucocorticoides plasmáticos más bajos entre los machos del grupo, a excepción del macho de mayor rango, o macho alfa. En este último, la concentración de hormonas vinculadas al estrés es tan alta como aquella reportada para los machos en los últimos escalafones jerárquicos, probablemente como resultado del costo de la defensa permanente de su posición social (Gesquiere y col., 2011). Resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo de tesis fueron informados para A. burtoni, en donde los machos T y NT de tamaño similar no se diferenciaron en los niveles de cortisol plasmático (Fox y col., 1997; Maruska y Fernald, 2010a). En la chanchita, los niveles de cortisol observados en los machos

NT pueden resultar de la monopolización de un territorio reproductivo por parte de la pareja T (por lo tanto del propio acceso a la reproducción), mediante agresiones físicas y despliegues. Por el otro lado, los niveles similares de cortisol observados en machos T pueden estar asociados con la constante defensa del territorio de otras chanchitas de tamaño parecido y probablemente también por la proximidad al momento de la puesta. Otros trabajos han mostrado un aumento en los niveles de cortisol plasmático en machos próximos a la espermiación (Castranova et al., 2005; Scott et al., 1984). De manera acorde, en el cíclido con cría cooperativa N. pulcher, los individuos dominantes reproductores presentaron niveles más elevados de cortisol plasmático con respecto a los subordinados, probablemente como resultado de la dificultad de obtener y mantener el estatus reproductivo, pero los autores del trabajo también lo atribuyeron a la proximidad al momento de la puesta y a la producción de gametas (Mileva y col., 2009). No obstante, la falta de la medición de los niveles séricos de cortisol previo al establecimiento de la jerarquía, nos imposibilitan determinar si los mismos son causa o consecuencia de la posición jerárquica. Con respecto a trabajos previos en chanchita, donde a diferencia de lo observado en el presente trabajo de tesis, los niveles de cortisol plasmático resultaron mayores en machos NT que en los T, como se describe en Alonso y col. (2011), estas diferencias pueden resultar de la aplicación de esquemas metodológicos distintos. En Alonso y col. (2011), los peces utilizados se mantuvieron en acuarios grupales por un período que duplicó el tiempo promedio del experimento aquí descripto. Por lo tanto, la concentración plasmática de cortisol en machos en esta tesis puede ser un reflejo de la reciente formación y estabilización de la jerarquía. En este sentido, cuando Fox y col. (1997) estudiaron la dinámica de la síntesis de cortisol en los machos T y NT de A. burtoni en acuarios grupales, observaron que a medida que aumentaba la estabilidad social, es decir la probabilidad que un pez conserve su estatus, las diferencias en los niveles cortisol entre los machos de distinto estatus social resultaban más evidentes.

Los machos T del presente trabajo de tesis presentaron una gran variabilidad en los niveles plasmáticos de cortisol y 11-CT, probablemente como consecuencia del efecto de la propia variabilidad interindividual entre los peces (Kempenaers y col., 2008; Williams, 2008), o debido a diferencias en la proximidad al momento de la puesta (Kindler y col., 1989; Liley y col., 1986; Scott y col., 1984), pero también producto del ambiente heterogéneo que experimentó cada uno de los peces (DeVries y col., 2003; Oliveira, 2004). Debido a la ausencia de un claro dimorfismo sexual en la chanchita, al momento de la elección de los peces los acuarios experimentales muy probablemente difirieron en su composición de sexos. La composición del ambiente social en cuanto a la proporción de sexos (Lacava y col., 2011;

85

Oliveira y col., 1996), al igual que el estatus social inmediatamente previo (Oliveira y col., 2009), y la edad (Alcazar y col., 2014) de cada pez, afectan la fisiología del animal y la probabilidad de ocupar una posición territorial. Por lo tanto, en futuros estudios será importante incorporar al análisis, y en lo posible controlar, las múltiples fuentes de variabilidad.

El entorno social no sólo moldeó y fue moldeado por el perfil endócrino, sino que también repercutió sobre la morfología del testículo. Los machos T presentaron testículos de mayor tamaño relativo que los machos NT. La misma variación en el IGS asociada al estatus social se encontró en otras especies de cíclidos como la tilapia del Nilo (O. niloticus; Golan y Levavi-Sivan, 2013), la tilapia de Mozambique (O. mossambicus; Oliveira y Almada, 1998) y el cíclido convicto (A. nigrofasciata; Chee y col., 2013), en donde los machos T presentaron un mayor IGS comparado con los machos NT. Alonso y col. (2012) analizaron la variación en el IGS dentro de un grupo de machos NT de chanchitas y observaron una correlación positiva entre el IGS y el rango social (evaluado a través de un índice de dominancia). Este menor potencial reproductivo en machos NT, probablemente refleje una respuesta evolutiva común frente a la subordinación social, producto de la relocalización energética ya mencionada en los primeros párrafos de la sección "Discusión". Por otro lado, el tamaño de los testículos correlacionó positivamente con los niveles plasmáticos de 11-CT, en concordancia con el papel del andrógeno como agente estimulante de las células de Sertoli, las que a su vez estimulan la proliferación de las espermatogonias, la meiosis y la espermiogénesis (Miura y col., 1991). La constante ofensiva por parte de los individuos de mayor rango sobre los machos NT habría ejercido una especie de "anticonceptivo social" que enlenteció la espermatogénesis, sobre todo a nivel de la espermiogénesis, dado que los espermatocitos y las espermátidas se acumularon dentro de los testículos de machos NT. Este proceso podría estar mediado por el E<sub>2</sub>, debido a que los niveles plasmáticos del estrógeno correlacionaron positivamente con el porcentaje de los espermatocitos y negativamente con el de los espermatozoides. Al realizar el análisis correlacional distinguiendo por estatus social, únicamente se mantuvo la asociación entre los niveles de  $E_2$  y el porcentaje de espermatocitos (p=0,81; r<sup>2</sup>=0,66; p=0,049) en machos NT, lo que sugiere que el potencial efecto "anticonceptivo" mediado por E<sub>2</sub> sería dependiente del estatus. Es importante mencionar que en los testículos de los machos NT se observaron cistos con todos los estadios celulares de la espermatogénesis, lo que implica que aún bajo la inhibición social el proceso de formación de espermatozoides continúa. El potencial reproductivo latente de los machos NT de chanchita sería de particular importancia en condiciones de inestabilidad social, cuando surge la oportunidad de ocupar un territorio y

rápidamente poder reproducirse. Los resultados estarían en concordancia con lo propuesto por Maruska y Fernald (2011), quienes sugirieron que un macho en proceso de transición de NT a T es sujeto de una reactivación de un eje reproductivo aún funcional, en referencia al eje hipotálamo-hipófisis-gónada, de manera similar a lo que ocurriría en la pubertad de los mamíferos. En lo que respecta al tejido intersticial del testículo, no detectamos diferencias en el porcentaje del mismo entre los machos de distinto estatus social. Sin embargo, otros trabajos realizados en otras especies de cíclidos observaron que los machos T y NT difirieron tanto en el porcentaje del testículo ocupado por el compartimento intersticial, como en la composición del mismo. En A. burtoni por ejemplo, el tejido intersticial ocupó un porcentaje menor de los testículos de los machos dominantes que en el de los no dominantes (Maruska y Fernald, 2011). Por otro lado en O. niloticus, los testículos de los machos dominantes estuvieron conformados en un 44% por tejido intersticial, mientras que en el de los machos no dominantes tan sólo representó el 4% (Pfennig y col., 2012). En ambos estudios los peces utilizados mantuvieron su estatus social por un período de entre uno y cuatro meses, a diferencia del presente trabajo de tesis en el cual los animales adquirieron recientemente el estatus de macho T o NT. Por lo tanto es probable que el establecimiento de la jerarquía haya sido muy reciente para detectar cambios a nivel del porcentaje del compartimento germinal. En este sentido, en los machos no dominantes de A. burtoni en proceso de ascenso social, al quinto día de la aparición de la oportunidad de ascenso, no se registraron cambios en el porcentaje del testículo ocupado por el tejido intersticial (Maruska y Fernald, 2011).

El análisis de la expresión génica de aromatasa cerebral no reveló diferencias en el cerebro anterior ni en la hipófisis de machos de chanchita de distinto estatus social. En contraste, los individuos dominantes de ejemplares sexualmente inmaduros del pez payaso (*Amphiprion ocellaris*), presentaron una mayor expresión de la enzima comparado con los subordinados, en muestras de cerebro completo (Iwata y col., 2012). Estudios en el cíclido *A. burtoni* indican un mayor grado de complejidad en el patrón de expresión de la enzimas cerebral en función del estatus social. Huffman y col., (2013) analizaron la expresión de la enzima en el cerebro de machos de *A. burtoni* de distinto estatus social por la técnica de hibridación *in situ,* detectando una mayor cantidad de mensajeros en dos subpoblaciones del APO (magnocelular y gigantocelular) del cerebro de los machos NT con respecto a los T. Por otro lado, Maruska y col. (2013) estudiaron la variación en la expresión de aromatasa cerebral en el cerebro de los machos de *A. burtoni* por qPCR, y observaron una mayor expresión del transcripto en el núcleo ventral del telencéfalo ventral (Vv), núcleo tuberal vental del hipotálamo y en el cerebelo de los machos T, aunque no observaron diferencias a nivel del

APO. Independientemente de los resultados obtenidos por ambos estudios y de los enfoques metodológicos diferentes, resulta evidente la existencia de un efecto del entorno social sobre la expresión de aromatasa cerebral, y que este efecto es además específico en áreas determinadas del cerebro. Al estudiar el cerebro anterior completo de los machos de chanchita, se analizó el conjunto de regiones que expresan aromatasa cerebral. Por lo tanto, es posible que los potenciales cambios en la expresión de la enzima asociados al estatus social se contrabalanceen entre los distintos núcleos cerebrales. El hecho de que no se haya detectado una correlación entre el índice de comportamiento agonístico y los niveles de expresión de aromatasa cerebral probablemente es consecuencia del muestro de la totalidad del cerebro anterior, debido a que de haber ocurrido cambios en la expresión génica asociados al comportamiento, posiblemente hubiesen resultado enmascarados.

Sin embargo, en los machos de la chanchita la expresión relativa de aromatasa cerebral en el cerebro anterior correlacionó con la concentración de E<sub>2</sub> en el plasma. Esto es coherente con la presencia de al menos un elemento de respuesta a estrógenos (ERE) en la región promotora del gen de aromatasa cerebral, como ha sido reportado en otras especies de peces teleósteos (Diotel y col., 2010), incluidos varios cíclidos (Böhne y col., 2013). De hecho, los altísimos niveles de expresión de aromatasa presentes en el cerebro de teleósteos se cree que son consecuencia de un mecanismo de retroalimentación positivo mediado por el producto de la enzima actuando sobre el ERE en la región promotora del gen (Callard y col., 2001; Diotel y col., 2010). Sin embargo, en la hipófisis de chanchita la expresión de aromatasa cerebral no correlacionó con el E<sub>2</sub> en la circulación general. De manera similar, en los machos de la carpa común (*C. auratus*), el tratamiento crónico con E<sub>2</sub> generó un aumento en la síntesis de estrógenos en el hipotálamo anterior y APO, mientras que la actividad de aromatasa en la hipófisis no resultó afectada (Pasmanik y col., 1988). En conjunto, la evidencia apunta a un alto grado de regionalización de los mecanismos y elementos que regulan la expresión y/o actividad de la enzima. Es oportuno mencionar que el efecto estimulatorio de  $E_2$  sobre la expresión de aromatasa cerebral es dependiente del contexto celular. En un estudio donde se evaluó la expresión heteróloga de aromatasa cerebral del pez cebra en conjunto con el receptor de estrógenos, en varios tipos de líneas celulares, sólo se observó un aumento en la expresión de aromatasa cerebral en presencia de  $E_2$  en células de origen glial (Menuet y col., 2005). Por otro lado, el hecho de que en chanchita la expresión de aromatasa cerebral en cerebro anterior e hipófisis no correlacionara con el índice de conversión sistémico de testosterona a E<sub>2</sub> sugiere que (i) el cerebro e hipófisis no son las fuentes principales de E<sub>2</sub> en machos de chanchita, (ii) como es de esperarse, la concentración de E<sub>2</sub> en la circulación general es la sumatoria de diversas fuentes.

A nivel de la hipófisis, la expresión relativa de aromatasa cerebral correlacionó con el índice de comportamiento agonístico, lo que posicionaría a la hipófisis como un nuevo elemento involucrado en la regulación de los comportamientos agresivos y sumisos a través de la síntesis de estrógenos. La asociación positiva entre ambas variables, indica que niveles mayores de expresión de aromatasa cerebral correlacionan con una mayor frecuencia de comportamientos agresivos, y una menor frecuencia de comportamientos sumisos. Por otro lado, la expresión de aromatasa en la hipófisis correlacionó con los niveles de testosterona plasmática, si bien esta asociación resultó de un número bajo de muestras (n=7) y fue dependiente de un valor altamente influyente (Distancia de Cook=3,5, tras realizar un análisis de regresión), y por lo tanto debe ser considerada con extrema cautela. No obstante, en la anguila asiática (M. albus), se reportó un efecto positivo directo de la testosterona sobre la expresión de aromatasa cerebral en la hipófisis, a través de un elemento de respuesta a estrógenos (ARE, del inglés androgen response element) en una región promotora específica de la hipófisis del gen de aromatasa cerebral (Zhang y col., 2012). La presencia del elemento ARE ha sido descripta también en la región promotora del gen de aromatasa cerebral de varios cíclidos Africanos (Böhne y col., 2013), junto con la presencia de receptores de estrógenos en la hipófisis (Harbott y col., 2007). En este contexto especulamos que los niveles elevados de testosterona presentes en los machos T de chanchita, estimularían la expresión de aromatasa cerebral en la hipófisis a través del elemento ARE en la región promotora. A su vez, el potencial aumento local en la síntesis de E2 podría estimular la síntesis y liberación de la hormona luteinizante (LH) (Huggard-Nelson et al., 2002; Mateos et al., 2002; Yen et al., 2002), de la cual se ha reportado un efecto positivo sobre el comportamiento agresivo (Kramer y col., 1969) y sobre la síntesis de 11-CT a nivel del testículo (Levavi-Sivan y col., 2010). Sin embargo, en la chanchita los niveles de expresión de aromatasa cerebral no difirieron entre machos T y NT. No obstante, el bajo número de peces analizados, así como una posible sectorización de la regulación social de aromatasa cerebral en la hipófisis, podrían haber ocultado potenciales diferencias. El modelo propuesto (Figura 37) es altamente especulativo, y aún resta examinar la presencia del elemento ARE en la región promotora del gen específico de chanchita, la colocalización de aromatasa cerebral con receptores de andrógenos en la hipófisis, y confirmar una relación causal entre los niveles de plasmáticos de testosterona y la expresión de aromatasa cerebral en hipófisis.

En lo que respecta a la localización de la enzima aromatasa cerebral en la hipófisis de teleósteos, la misma parecería depender del estadio reproductivo, del sexo del animal, y de la especie. Por ejemplo, en la trucha arcoíris (*O. mykiss*), el pejerrey (*O. bonaerensis*), y en la anguila asiática (*M. albus*) se observó la presencia de la enzima en células dispersas todo a lo largo de la hipófisis (Menuet y col., 2003; Strobl-Mazzula y col., 2005; Zhang y col., 2014, respectivamente), mientras que en el pez cebra (*D. rerio*) su expresión se limitó a la *pars distalis* proximal y *pars* intermedia (Goto-Kazeto y col., 2004). Si bien el estudio realizado por Zhang y col., (2014) reveló la co-localización de algunas células positivas para aromatasa cerebral con la LH en gonadotropos de la hipófisis las hembras de la anguila asiática (*M. albus*), y únicamente durante el período de vitelogénesis, la identidad de las células donde se expresa aromatasa cerebral continúa siendo un misterio en la gran mayoría de los peces teleósteos.



**Figura 37**. Modelo del potencial vínculo entre la glándula hipófisis y los testículos, mediado por la expresión de aromatasa cerebral en la hipófisis, en relación al comportamiento agonístico. Los niveles elevados de testosterona plasmática característicos de los machos territoriales, estimularían en la glándula hipófisis la expresión del gen de aromatasa cerebral (*cyp19a1b*), lo que podría derivar en una mayor síntesis de estrógenos a nivel local. Como consecuencia, se estimularían la síntesis y liberación de la hormona luteinizante (LH), la cual eventualmente promovería un aumento en la secreción del principal andrógeno involucrado en la regulación de la agresividad en machos de peces teleósteos, la 11-cetotestosterona (11-CT), por parte de las células de Leydig del testículo.

# Capítulo III

"Somos máquinas de supervivencia, autómatas programados a ciegas con el fin de perpetuar la existencia de los genes egoístas que albergamos en nuestras células."

Fragmento de "El gen egoísta" por Richard Dawkins – Biólogo



## ¿UN JUEGO ENTRE DOS AROMATASAS? ANÁLISIS DE LA FISIOLOGÍA DEL PERÍODO DE CUIDADO

### MATERNAL]

En este capítulo se analizó el ambiente fisiológico asociado al período de cuidado parental en hembras, y se buscó entender el posible diálogo entre el cerebro y las gónadas, con la expresión de aromatasa cerebral en cerebro, y aromatasa gonadal en ovario, como interlocutores.

### Introducción

Los peces cíclidos representan una de las familias más diversas de vertebrados, con más de 1600 especies descriptas hasta la fecha (Froese y Pauly, 2016). Existen en una gran variedad de formas, tamaños y colores, más aún, todas las modalidades reproductivas y sistemas de apareamiento descriptas en vertebrados, están presentes en los cíclidos (Barlow, 2002). A pesar del abanico comportamental que presentan, todos ellos cuidan de la cría (Barlow, 2002; Kuwamura, 1986). El comportamiento parental, se define como cualquier comportamiento ejecutado por los progenitores que incremente la supervivencia y crecimiento de las crías (Trivers, 1974). La gran diversidad que caracteriza a los cíclidos se extiende también al cuidado parental, encontrándose desde especies que incuban la progenie sobre el sustrato hasta aquellas que la protegen incubándolas en su boca, pasando por la monogamia, la poligamia y la cría cooperativa (McKaye, 1984).

La chanchita es una especie monógama serial, con cuidado biparental de los huevos y las larvas y al igual que en la gran mayoría de los cíclidos americanos, incuban sus huevos sobre el sustrato. Uno de los primeros despliegues comportamentales del período de cuidado parental ocurre incluso antes de la puesta, y consiste en la limpieza del sitio en dónde la pareja colocará los huevos. Tanto el macho como la hembra cuidan de la cría, e irán modificando su comportamiento a medida que el embrión se desarrolla desde el estadio de huevo hasta el de larva de natación libre (Alonso y col., 2011). Por ejemplo, durante el cuidado de los huevos el macho y la hembra de chanchita abanican la puesta con sus aletas pélvicas, oxigenando los embriones, a la vez que retiran aquellos con infecciones fúngicas. Inmediatamente luego de la eclosión de los huevos, las larvas se encuentran adheridas al sustrato y los parentales los trasladan con la boca a un nido previamente cavado. Por último, una vez que las larvas comienzan a nadar libremente, la pareja extiende su territorio, traslada a las larvas con su boca y emite llamados de alerta con sacudidas cortas de las aletas pélvicas. El período de cuidado parental se extiende aproximadamente por 20 días, luego de que las larvas comienzan a nadar (Tubert y col., 2012).

La gran mayoría de los estudios sobre el cuidado parental en peces cíclidos se centraron en los aspectos ecológicos y evolutivos del comportamiento (Goodwin y col., 1998; Oldfield y col., 2015; Santangelo, 2015; Wong y Balshine, 2011), mientras que se conoce relativamente poco sobre sus bases endocrinas (Birba y col., 2015; O'Connell y col., 2012; Tacon y col., 1996). Los neuropéptidos arginina vasotocina (Ripley y Foran, 2010) e isotocina

(O'Connell y col., 2012), los neuroesteroides (Pradhan y col., 2014) y la prolactina (Páll y col., 2004) se encuentran entre algunos de los factores involucrados en la regulación del cuidado parental en peces, incluidos los cíclidos (O'Connell y col., 2012; Specker y Kishida 2000; Tacon y col., 2000). Estas hormonas y neuromoduladores actúan sobre y/o son sintetizados en dos regiones del cerebro implicadas en el procesamiento del cuidado parental en vertebrados: el Vv (posible homólogo al septum lateral de mamíferos,) y el APO (homólogo a los núcleos hipotalámicos paraventricular y supraóptico y área preóptica de mamíferos) (Buntin y col., 2006, Curley y col., 2012; Furigo y col., 2014; O'Connell y col., 2012). El análisis de la distribución de aromatasa cerebral en el cerebro de chanchita desarrollado en el capítulo I, reveló la presencia de esta enzima en estas dos regiones, en particular en el APO, donde se observó la mayor densidad de células inmunoreactivas para aromatasa. Por otro lado, un estudio realizado en machos del gobio de la arena (Pomatoschistus minutus) describió un efecto negativo de xenoestrógenos sobre la construcción del nido (Saaristo y col., 2010), por lo que se postula que los estrógenos podrían estar implicados en la regulación del comportamiento parental en peces teleósteos. No obstante, hasta el momento ningún trabajo analizó el potencial papel de la enzima aromatasa cerebral en el cuidado parental.

En especies con el potencial de realizar múltiples puestas durante el período reproductivo y donde la tasa de éxito reproductivo es baja como consecuencia de la depredación, o la dificultad de mantener una posición territorial, como ha sido descripto para varios cíclidos Neotropicales similares a la chanchita (McKaye, 1977), la plasticidad comportamental y fisiológica, permiten responder rápidamente frente a un ambiente en continuo cambio. La coordinación del estatus social y reproductivo con los diversos procesos fisiológicos del animal, es de particular importancia a nivel de la producción de las gametas. La variante gonadal de la enzima aromatasa constituye un elemento de regulación de la gametogénesis a través de la síntesis de estrógenos a nivel local, tanto en machos (Schulz y Miura, 2002), como en hembras (Cardinali y col., 2004; Nagahama y col., 1995). Por otro lado, a través de la secreción endócrina de estrógenos gonadales, las gónadas presentan la capacidad potencial de regular la expresión de aromatasa cerebral en el cerebro actuando a través del elemento de respuesta a estrógenos (ERE) en la región promotora del gen.

Debido a esto, es que en el presente capítulo de tesis se buscó, en primera instancia (i) contextualizar el ambiente fisiológico de la chanchita a lo largo del período de cuidado parental, a través de la medición de esteroides sexuales y la evaluación de la composición celular de las gónadas, y en segundo lugar (ii) evaluar los perfiles de expresión de aromatasa cerebral en cerebro e hipófisis, y de aromatasa gonadal en gónada.
En el presente trabajo de tesis se analizó únicamente a las hembras, mientras que los machos formaron parte de un estudio paralelo ya publicado por el laboratorio (Birba y col., 2015). Vale la pena mencionar que al realizar una búsqueda en Google académico del término "teleost parental care" (cuidado parental en teleósteos) se obtuvieron aproximadamente 11.100 resultados. Al refinar la búsqueda a trabajos que contenían además el término "paternal care" (cuidado paternal) se obtuvieron 1.080 trabajos, mientras que sólo se encontraron 494 con "maternal care" (cuidado maternal), lo que expone la falta de trabajos donde el modelo de estudio sean las hembras.\*<sup>5</sup>



#### Animales

Los ejemplares de chanchita utilizados fueron capturados en la región de Esteros del Riachuelo (Corrientes, Argentina), y mantenidos en acuarios grupales de entre 8 y 10 individuos en las instalaciones del Bioterio Central de Ciudad Universitaria (UBA). Las condiciones de fotoperíodo, temperatura y alimentación fueron idénticas a las ya descriptas en el capítulo I. Para el análisis del perfil fisiológico de la chanchita durante el período de cuidado parental, se emplearon un total de 31 parejas territoriales.

Como se describió en Tubert y col. (2012) y Birba y col. (2015), durante el período de cuidado parental las chanchitas pueden clasificarse dentro de cuatro categorías acorde al grado de desarrollo de la progenie. (1) Hembras en pre-puesta (PP), que defienden agresivamente un territorio junto con el macho territorial y que llevan a cabo la limpieza del sitio donde ocurrirá la puesta; (2) hembras al cuidado de los huevos (H), que abanican y protegen los huevos y eliminan aquellos infectados; (3) hembras al cuidado de las larvas adheridas al sustrato (LS), tres días post-fecundación (dpf) los huevos eclosionan y la pareja reproductiva atiende a las larvas que permanecen adheridas al sustrato a través de glándulas en sus cabezas (Meijide y col., 2000); y (4) hembras al cuidado de larvas de natación libre (LN), estadio del cuidado parental que se inicia 8 dpf cuando las larva es capaz de nada por su cuenta y la pareja extiende su territorio y agrupa a las larvas protegiéndolas de potenciales depredadores. Las hembras PP se obtuvieron directamente de los acuarios grupales, mientras que las hembras H, LS y LN se identificaron en primer lugar como hembras PP en un acuario grupal, y luego fueron trasladas, junto con el macho de la pareja, a un acuario de aislamiento, donde eventualmente ocurrió la puesta y posterior cuidado de los huevos y larvas. Los

<sup>\*&</sup>lt;sup>5</sup> Esta disparidad en el número de trabajos sobre cuidado paternal y maternal en 95 teleósteos, probablemente refleje el hecho que en la mayoría de las especies con cuidado parental, éste está a cargo de los machos.

acuarios de aislamiento (75 L, temperatura 25  $\pm$  2°C y fotoperíodo de 14:10 h luz:oscuridad, con iluminación de espectro completo) contenían en su interior una piedra laja que la chanchita utiliza para desovar. Este diseño experimental, en donde el comportamiento reproductivo y parental se desarrolló en aislamiento social, permitió analizar el efecto de la progenie sobre la fisiología parental sin la interferencia de la agresividad territorial que hubiese ocurrido en un contexto grupal. Sin embargo, los comportamientos de pre-puesta son más evidentes en un ambiente grupal debido a que la pareja territorial se torna altamente agresiva con los individuos no-territoriales a medida que el momento de la puesta se acerca. Además, algunos comportamientos reproductivos, tales como las sacudidas corporales, son más evidentes en el contexto grupal. Es debido a esto que las hembras PP se obtuvieron directamente de los acuarios grupales.

En el momento en el que se observaron los comportamientos reproductivos por parte de la pareja territorial en el acuario grupal, o dentro de las 24 h luego de la detección de la presencia de huevos, larvas adheridas al sustrato o larvas de natación libre en los acuarios de aislamiento de parejas, la hembra fue removida e inmediatamente se procedió con la extracción de sangre para la medición de las hormonas esteroideas: testosterona, 11-CT, E<sub>2</sub> y cortisol, tal y como fue descripto en el "Capítulo II". Las muestras de plasma fue se almacenaron a -20 °C hasta el momento de la medición de las hormonas.

Inmediatamente luego de la extracción de sangre se procedió con la anestesia y eutanasia de los peces colocándolos en una solución 0,1% de benzocaína y decapitándolos posteriormente, tal y como fue descripto en el capítulo I (protocolo aprobado por la CICUAL y dentro de las pautas establecidas por el Comité Nacional de Ética en la Ciencia y la Tecnología, MINCyT). De cada hembra se registró el peso, largo total y largo estándar. Rápidamente se realizó la disección del cerebro anterior e hipófisis de cada pez, y se colocaron en 200 µL de RNAzol® fríos, para el análisis de la expresión de aromatasa cerebral por qPCR. Luego se continuó con la disección de los ovarios y el registro de su peso para cálculo del IGS. Además, uno de los ovarios de cada pez (derecho o izquierdo al azar) se fijó en solución de Bouin, para la evaluación de su composición celular como indicador del estado reproductivo del animal, mientras que una porción del otro se colocó en 200 µL de RNAzol® fríos, para el análisis de la colocó en 200 µL de RNAzol® fríos, para el análisis de la colocó en 200 µL de RNAzol® fríos, para el análisis de la colocó en 200 µL de RNAzol® fríos, para el análisis de la colocó en 200 µL de RNAzol® fríos, para el análisis de la expresión de aromatasa cerebral por qPCR. Los procesos de extracción del ARN mensajero y la síntesis del ADNc fueron idénticos a los descriptos en el capítulo I. Las muestras de ADNc se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

Para distinguir entre el efecto específico de la presencia de las crías sobre la fisiología reproductiva de la madre respecto del efecto del propio paso del tiempo a lo largo de los ocho días de cuidado parental evaluados, se llevó a cabo un experimento en paralelo de eliminación de la cría. Para ello se empleó un nuevo grupo de parejas de chanchita ya en sus respectivos acuarios de aislamiento, donde poco después de la puesta se removieron los huevos (experimento "huevos removidos"). Luego, se procedió con el muestreo de las hembras tal y como fue descripto para el grupo control, al tiempo en el que los huevos hubiesen eclosionado (3 dpf; n=5) y las larvas hubieran comenzado a nadar (8 dpf; n=5). Para eliminar los huevos se extrajo la laja con la puesta adherida en su superficie y se retiraron los huevos por fuera de la piedra, la cual fue devuelta a su posición original.

### Medición de hormonas esteroideas

Se evaluaron los niveles plasmáticos de 11-CT, testosterona y E<sub>2</sub> de las muestras de las hembras PP, H, LS y LN del experimento control y de huevos removidos. Las mediciones se realizaron mediante de la técnica de ELISA, utilizando los kits comerciales y las diluciones ya mencionadas en el capítulo II, en el laboratorio de Metabolismo y Reproducción de Organismos Acuáticos, del departamento de Fisiología, USP, Brasil. Las muestras se analizaron por duplicado, y sólo se continuó con el análisis estadístico de aquellas muestras cuyo coeficiente de variación entre réplicas resultó menor al 20% (coeficiente de variación promedio= 7,6±2,0%). En el caso de la medición de los niveles de testosterona en plasma, algunas muestras tuvieron que ser diluidas hasta 1:33 dado que los valores obtenidos estaban fuera de la curva de calibración. Si bien se buscó conocer el perfil de los niveles plasmáticos de cortisol en el período de cuidado parental, el kit utilizado para tal fin se exportó desde Alemania y lamentablemente en esa oportunidad fue rechazado por la aduana de Brasil y devuelto al origen. Por lo tanto resultó imposible proceder con la medición del cortisol en los tiempos previstos para esta tesis.

### Análisis histológico del ovario

Se analizó la composición folicular de los ovarios de hembras de chanchita de los diferentes estadios del período de cuidado parental. Para ello, uno de los ovarios de cada hembra se fijó en solución de Bouin por 18 h a temperatura ambiente. Luego de un pasaje por una serie de alcoholes de graduación creciente y del aclaramiento en Xilol, las muestras se incluyeron en Paraplast (Fisherbrand), y tras el armado de los tacos se cortaron en el plano transversal a 5 µm de espesor. Las secciones se montaron en portaobjetos recubiertos con gelatina 2% y se colorearon con Hematoxilina y Eosina. Los cortes se observaron en un

microscopio Leica DM 1000 a 250X y se fotografiaron con la cámara digital Leica DFC295 acoplada al microscopio. De cada ovario se seleccionaron tres fotomicrografías al azar, una por cada sección del ovario (anterior, medio y posterior), separadas entre sí por al menos 10 secciones con el fin de evitar el conteo por duplicado de una misma célula. Sobre cada fotomicrografía se contaron el número de folículos con oocitos con el núcleo claramente visible. Para la clasificación de los folículos se empleó el conjunto de criterios enunciados por Coward y Bromage (1998) (Tabla 6). Se cuantificó el número de folículos primarios (fase I o cromatina nucleolar), folículos secundarios (fase II y III o perinucleolar), folículos terciarios (fase IV o alvéolo cortical), folículos vitelogénicos tempranos (fase V o vitelogénesis; cuando menos del 50% del citoplasma estaba ocupado por gránulos de vitelo), folículos vitelogénicos tardíos (fase V y VI o maduración; cuando más del 50% del citoplasma estaba ocupado por gránulos de vitelo), folículo maduro (fase VII o migración de la vesícula germinal), folículos atrésicos y folículos post-ovulatorios. Como los ovarios presentaron gran variación en su tamaño, el conteo de cada tipo folicular evaluado se relativizó al número total de folículos contados por sección, promediándose luego los porcentajes de cada fase folicular entre las 3 secciones de cada ovario.

### Medición de la expresión relativa de ambas variantes de la enzima aromatasa de teleósteos

Para analizar la expresión de aromatasa cerebral en el cerebro anterior e hipófisis de hembras de las diferentes fases del período de cuidado parental se utilizaron diluciones 1:10 de las muestras de ADNc de cerebro como molde en una reacción de qPCR. Se empleó el par de *primers* qPCR-Chanchaba-4 (capítulo I, página 32) en una concentración final de 1  $\mu$ M. Cada reacción se realizó por duplicado y las condiciones de reacción y ciclado fueron idénticas a las descriptas en los capítulos anteriores. Para el caso de las hipófisis, la extracción de ARN no resultó exitosa en algunas muestras, no preservándose su integridad. Como consecuencia de esto, y debido a que el tamaño de la muestra para el análisis fue de por sí reducido, el número final de hipófisis con el que se contó para el análisis resultó insuficiente y por lo tanto debió ser descartado.

**Tabla 5.** Clasificación utilizada para la identificación de los folículos. Traducido y modificado deCoward y Bromage (1998).

Folículo	Apariencia al microscopio óptico (coloración con Hematoxilina y Eosina)
Oogonia	Aproximadamente esféricas con poco citoplasma. Por lo general ocurren en nidos. Ausencia de capa folicular.
Fase I	Comúnmente se ubican próximas a las oogonias. Similares en aspecto a
Cromatina nucleolar	las oogonias pero de mayor tamaño. Núcleo conspicuo con hebras de cromatina
Fase II	Citoplasma muy basófilo. Presencia de áreas localizadas del citoplasma
Perinucleolar temprana	con basofília intensa alrededor del núcleo o la periferia de la célula.
Fase III	Menor basofília citoplasmática que en la fase II. Núcleo central con varios
Perinucleolar tardía	nucleólos y hebras de cromatina. Desarrollo de la capa folicular.
Fase IV	Citoplasma muy acidófilo Presencia de vesículas cercanas a la periferia
Alvéolo cortical	del oocito. Núcleo central con varios nucleólos y hebras de cromatina.
Fase V	Aparición de gránulos pequeños de vitelo (acidófilos) en la periferia del oocito. Presencia de un gran número de vesículas dispersas por todo el
Vitelogénesis	citoplasma del oocito. Gran desarrollo de la capa folicular. Núcleo central.
Fase VI	Los gránulos de vitelo se fusionan dando glóbulos de vitelo de mayor tamaño distribuidos por todo el citoplasma. Presencia de vacuolas
Maduración	(aparentemente vacías) sobretodo en la periferia del oocito. Núcleo de ubicación central. Capa folicular prominente.
Fase VII	Como la fase VI, nero la vesícula germinal se localiza en la neriferia del
Migración de la vesícula germinal	oocito (polo animal).
Atrésico	Ruptura de la membrana nuclear. Licuefacción del vitelo. El vitelo se
	capa folicular. Fagocitosis desde las células de la granulosa.
Post ovulatoria	Estructura irregular formada por células de la teca y de la granulosa. Las
Post-ovulatorio	teca colapsaron hacia el lumen del folículo.

En el caso del análisis de la expresión relativa de aromatasa gonadal en el ovario, en primera instancia fue necesario obtener una secuencia parcial de su ARN mensajero (secuencia que hasta aquel momento era desconocida), sobre la cual luego diseñar primers específicos para su utilización en una reacción de qPCR. Para ello se alinearon las secuencias del ARN mensajero de la aromatasa gonadal de otros peces cíclidos presentes en GenBank: (XM\_006793932), Neolamprologus brichardi Neolamprologus pulcher (KC684565.1), Oreochromis aureus (DQ279891.1), y Oreochromis niloticus (NM 001279586.1). A partir del alineamiento se diseñó un par de primers sobre regiones con un alto grado de conservación entre las secuencias analizadas (ChanchagonF-1 y ChanchagonR-1; Tabla 6) utilizando la herramienta en línea Primer Quest (IDT) (https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index). Se controló la posible presencia de hetero- y homodimeros y horquillas (hairpins) con el programa DNA-Star Lasergene. Se utilizó la muestra de ADNc de ovario de chanchita de una hembra PP al azar como molde en una reacción de PCR, junto con los primers diseñados (concentración final 0,5  $\mu$ M). Para detectar la temperatura óptima de alineamiento para el set de primers, se realizó una reacción de PCR con gradiente de temperatura: 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56 ,58 y 60ºC. Para controlar la eventual formación de dímeros de *primers,* o la contaminación de alguno de los reactivos empleados, se realizó en paralelo un control negativo, en donde el volumen de ADNc fue reemplazado por su equivalente en agua. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes:

> 94ºC por 5 minutos: 1 Ciclo 94ºC por 15 segundos 48, 50, 52, 54 o 56 ºC por 15 segundos 72ºC por 40 segundos 72ºC por 10 minutos: 1 Ciclo

40 Ciclos

Los productos de PCR se resolvieron mediante una electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 2%, pre-tratado con SYBR Safe (Invitrogen), y se revelaron en un transiluminador UV. Se seleccionó 52 °C como la temperatura óptima de la reacción (Figura 38). Por otro lado, no se observó la formación de dímeros de *primers* y no se observaron bandas en la calle correspondiente al control negativo. Una vez determinadas las condiciones óptimas, se procedió con la secuenciación del fragmento obtenido tal y como fue descripto en el capítulo I, verificándose luego su identidad a través de una búsqueda en BLASTn.



**Figura 38.** Análisis de temperatura de alineamiento. Productos de reacciones de PCR realizadas a diferentes temperaturas y resueltos en un gel de agarosa 2%. A la izquierda se indican los tamaños de las bandas de mayor intensidad del marcador de peso molecular (M). Control negativo: - .

Con el fin de incrementar la región conocida del ARN mensajero de aromatasa gonadal de chanchita, y sobre la cual se diseñaron más adelante los *primers* específicos para qPCR, se continuó con la amplificación y posterior secuenciación de la región aledaña en sentido 5'. Para ello se diseñó un nuevo par de *primers*, formado por un primer reverso específico de chanchita "anclado" en la región ya conocida de la secuencia y un primer por fuera de la misma, basado en regiones conservadas del ARN mensajero de aromatasa gonadal de peces cíclidos (ChanchagonF-2, y ChanchagonR-2; Tabla 6). Por último, los fragmentos parciales fueron alineados y conectados entre sí por las regiones superpuestas, para de esa manera obtener la secuencia parcial del ADNc de aromatasa gonadal de chanchita de 892 pb (Figura 39; número de acceso: KX260955). El porcentaje de identidad entre las secuencias de aromatasa cerebral y gonadal de chanchita fue del 69%.

El par de *primers* a utilizar para el estudio de la expresión de aromatasa gonadal se diseñó sobre regiones de la secuencia parcial de aromatasa gonadal de chanchita que presentaran una muy baja superposición con la de aromatasa cerebral (KX260157). Para la puesta a punto del set de *primers*, se empleó como molde una mezcla de ADNc de ovario de varias chanchitas de los diferentes estadios del cuidado parental diluido 1:5, 1:10 y 1:15, de manera de determinar la dilución óptima. Se evaluaron a su vez tres concentraciones del par de *primers* (0,3, 0,6 y 1 µM). Cada reacción se realizó por duplicado, empleando el reactivo FastStart Universal SYBR Green Master (ROCHE), y se utilizó el equipo StepOnePlus<sup>™</sup> Real-Time PCR Systems (Thermo-Fisher Scientific). Las condiciones de ciclado fueron las siguientes:

> 95°C por 5 minutos: 1 Ciclo 95°C por 30 segundos 60 °C por 15 segundos 72°C por 20 segundos (lectura SYBR Green)

40 Ciclos

Curva de disociación (95-60 °C, con una resolución de 0,5 °C)

Los mejores resultados se obtuvieron para la dilución 1:15 del ADNc y la concentración 1 μM del par de *primers* qPCR-Chanchagon (Figura 40).

> gtttgcgtctcctccacacaggctcacctagacgagctggacagcctgggacacgtcgat V C V S S T Q A H L D E L D S L G H V D gtgctcagtttgctgcgctgcactgtggtcgacatctctaacagactcttcctgggagtg V L S L L R C T V V D I S N R L F L G V cctgtcaatgagaaggagctgctgctgaagattcaaaagtatttccatacgtggcagaat P V N E K E L L L K I Q K Y F H T W Q N gtgcttatcaaacctgacatctacttcaagtttggctggattcaccagaggcacaagaca V L I K P D I Y F K F G W I H O R H K T gcagcccaggagttacgagatgccattaaacgccttgtagatcagaagaggagaaatatg A A Q E L R D A I K R L V D Q K R R N M gagcaggccgataagctggacaacatcaacttcactgcagagctcatatttgcacaaaac E Q A D K L D N I N F T A E L I F A Q N H G E L S A E N V T Q C V L E M V I A A ccqqacactctqtccatcaqtctcttcttcatqcttctqctcctcaaqcaaaatccacac P D T L S I S L F F M L L L K O N P H gtggagctgcagctgctgcgggagatagacactgttgtcggtgagcggcagcttcagaac V E L O L L R E I D T V V G E R O L O N Q D L H K L Q V L E S F I N E C L R F H ccagtggtggacttcaccatgcgccgagccctgtccgacgacatcatagaaggctacaga P V V D F T M R R A L S D D I I E G Y R V P K G T N I I L N T G R M H R T E F F  ${\tt ctaaaagccagtgaatttaatctggaaaattttggacaaaatgttcctcgccgttacttt}$ L K A S E F N L E N F G Q N V P R R Y F cagccattcggttcgggccctcgcgcgtgcattggcaaacacatagccatggtgatgatgQ P F G S G P R A C I G K H I A M V M M aaatccattttggtgacgctgctctctcagtactccgtctgtccccataagg K S I L V T L L S Q Y S V C P H K

**Figura 39.** Secuencias nucleotídica y aminoacídica predicha parciales de aromatasa gonadal de chanchita.



**Figura 40.** Curva de disociación para el par de *primers* qPCR-Chanchagon en diferentes concentraciones. URF= Unidades relativas de fluorescencia, T= temperatura.

Con el fin de determinar la eficiencia de la reacción para el par de *primers* qPCR-Chanchagon en una concentración de 1  $\mu$ M, se llevó a cabo una nueva reacción de qPCR utilizando como molde 8 diluciones seriadas (factor de dilución: 2X) de la mezcla de ADNc de ovarios. Las condiciones de la reacción y ciclado fueron idénticas a las utilizadas previamente durante la puesta a punto de los *primers* y las reacciones se realizaron por duplicado. La eficiencia estimada resultó del 104% (Figura 41).



**Figura 41.** Estimación de la eficiencia de amplificación para el par de *primers* qPCR-Chanchagon. Curva estándar del coeficiente umbral (Ct) de cada muestra en función del logaritmo del factor de dilución. Arriba a la derecha se presenta la ecuación que describe la recta y el coeficiente de determinación, R<sup>2</sup> ( $F_{1,5}$ =1854,8; p<0,001).

Finalmente, para analizar la expresión de aromatasa gonadal en ovario de hembras de chanchita en los distintos estadios del período de cuidado parental se utilizaron diluciones 1:15 de cada una de las muestras de ADNc de ovario como molde en una reacción de qPCR, junto con el par de *primers* qPCR-Chanchagon en una concentración final de 1 μM. Cada reacción se realizó por duplicado bajo las condiciones ya descriptas.

Se utilizó la expresión de ARP como gen referencia. Los datos crudos de fluorescencia fueron analizados con el programa LingReg-PCR para la estimación del número inicial de copias del ADNc ( $N_0$ ) de aromatasa cerebral y ARP. Finalmente, los valores de  $N_0$  de aromatasa cerebral de cada muestra se relativizaron a los de ARP correspondientes.

**Tabla 6.** Listado de *primers* utilizados para la amplificación de la secuencia parcial del ADNc de aromatasa cerebral y el análisis de su expresión por PCR en tiempo real. El asterisco indica que el primer es específico de la secuencia de chanchita. En los *primers* degenerados, la letra R indica A o G, acorde a la nomenclatura IUPAC.

Nombre	Secuencia (5′ → 3′)	Tamaño del	Temperatura de
		amplicón (pb)	alineamiento
ChanchagonF-1	TCACCACAGGCACAAGACAG	719	52 °C
ChanchagonR-1	GCTGCTGGGAAAGGTTRTTGG		
ChanchagonF-2	GCTAAAGCTCTGACAGGC	462	53,5 °C
ChanchagonR-2	AGCTGCGATCACCATCTCC*		
qPCR-Chanchagon	GAGTGCCTGTCAATGAGAAG*	122	60 °C
qPCR-Chanchagon	CTTGTGCCTCTGGTGAATC*		

## Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa Statistica 8 (StatSoft <sup>®</sup>). La variación en la concentración de las hormonas esteroideas, en el porcentaje de los folículos ováricos y en la expresión de ambas aromatasas se analizaron mediante un ANOVA de un factor con cuatro niveles (PP, H, LS, y LN), con contrastes de Tukey a posteriori. El conjunto de datos de las hembras del grupo "huevos removidos" se analizaron por separado a través de un ANOVA de un factor, con cuatro niveles (LS-control, LN-control, LS-huevos removidos y LNhuevos removidos), seguido de una prueba de Tukey. El grado de asociación entre las diferentes variables se evaluó a través del coeficiente de correlación de Pearson (p). Para evitar falsos positivos como resultado de las múltiples hipótesis evaluadas, dentro de cada uno de los análisis mencionados, se aplicó la corrección en dos pasos de tasa de falsos descubrimientos (FDR, del inglés *false discovery rate*) (Benjamini y col., 2006). Consecuentemente, los valores-p fueron corregidos utilizando la planilla provista por Pike (2011). Finalmente, se verificó el cumplimiento de los supuestos de normalidad v homocedasticidad de las muestras, siendo en algunas ocasiones necesario transformar la variable. En todo los casos se evaluó la presencia de valores atípicos (residuos estudentizados > ±2), y los mismos fueron eliminados de los análisis correspondientes. Se estableció la significancia estadística cuando el valor de p fue menor a 0,05, y los datos se presentan como el promedio ± error estándar.



# Efecto del grado de desarrollo de la progenie sobre los niveles plasmáticos de esteroides sexuales

El evento del desove estuvo acompañado por cambios en la concentración plasmática de las hormonas evaluadas. Los niveles de andrógenos fueron considerablemente menores en las hembras de post-puesta con respecto a los niveles observados en las hembras PP (testosterona:  $F_{3,13}=17,31$ ; p=0,0003; 11-CT:  $F_{3,15}=7,26$ ; p=0,006; Figura 42a y b, respectivamente). Los niveles de  $E_2$  por el otro lado, fueron más de cuatro veces menores en hembras LS con respecto a hembras PP ( $F_{3,16}=4,86$ ; p=0,018; Figura 42c). En el estadio LN, se observó una tendencia a un aumento de los niveles de 11-CT y  $E_2$ . La eliminación de los huevos repercutió fuertemente sobre la fisiología de las hembras de chanchita. La testosterona por ejemplo, aumentó en más de 17 veces ( $F_{3,11}=28,02$ ; p<0,0001; Figura 42a). Los cambios en la concentración plasmática de  $E_2$  fueron aún más intensos, con un incremento en más de 37 veces comparado con los niveles promediados para hembras LS-control y LN-control ( $F_{3,13}=327,49$ ; p<0,0001; Figura 42c). Tanto los niveles plasmáticos de testosterona como de  $E_2$  en hembras cuyo huevos fueron eliminados superaron los niveles presentes en las hembras PP (p<0,03; para ambas hormonas). Los niveles de 11-CT por el contrario no se vieron afectados por la remoción de los huevos ( $F_{3,12}=0,16$ ; p=0,92; Figura 42b).

El índice de conversión de testosterona a  $E_2$  fue mínimo en el estadio LS ( $F_{3,11}$ =8,27; p=0,004; Figura 43a), con la presencia de los valores mayores en los estadios luego de la eliminación de los huevos ( $F_{3,11}$ =11,42; p=0,001; Figura 43a). Por el otro lado, el índice de metabolización de testosterona en 11-CT fue máximo en el estadio LS ( $F_{3,13}$ =10,7; p=0,0017) y sustancialmente menor en el grupo "huevos removidos" ( $F_{3,8}$ =33,25; p<0,0001; Figura 43b).

La expresión génica relativa de aromatasa cerebral correlacionó positivamente con los niveles en plasma de  $E_2$  (p=0,79; p=0,003; Figura 44a) y testosterona (p=0,96; p=0,002; Figura 44b), mientras que no se observó asociación con la concentración plasmática de 11-CT (p=0,52). Los niveles relativos de expresión de aromatasa gonadal en ovario no correlacionaron con la variación en ninguna de las hormonas esteroideas estudiadas, o con el índice de conversión de testosterona a 11-CT (p>0,05; Figura 44c y d, para  $E_2$  y testosterona, respectivamente). Sin embargo, la expresión de aromatasa gonadal correlacionó positivamente con el índice de metabolización sistémica de T a  $E_2$  (p=0,91; p=0,01; Figura 44f).





Figura 42. Niveles plasmáticos de esteroides sexuales asociados a los distintos estadios del período de cuidado parental. Concentración en plasma de (a) testosterona, (b) 11cetotestosterona (11-CT) y 17β-estradiol, en hembras de pre-puesta (PP), con huevos (H), al cuidado de larvas adheridas al sustrato (LS) y al cuidado de larvas de natación libre (LN). distintas indican Letras diferencias significativas entre los estadios del grupo control. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre los estadios de hembras cuyos huevos fueron removidos y con los controles. Entre paréntesis se indica el tamaño de la muestra.



**Figura 43.** Índices de conversión de testosterona a (a) 17β-estradiol y (b) 11-cetotestoterona (11-CT) en hembras de pre-puesta (PP), con huevos (H), al cuidado de larvas adheridas al sustrato (LS) y al cuidado de larvas de natación libre (LN). Letras distintas indican diferencias significativas entre los estadios del grupo control. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre los estadios de hembras cuyos huevos fueron removidos y con los controles. Entre paréntesis se indica el tamaño de la muestra.



**Figura 44.** Relación entre los niveles relativos de expresión del gen de aromatasa cerebral (*cyp19a1b*) en cerebro anterior de hembras con la concentración en plasma de (a) 17β-estradiol, (b) testosterona y (f) el índice de aromatización de testosterona a 17β-estradiol. Asociación entre los niveles relativos de expresión del gen de aromatasa gonadal (cyp19a1a) en ovario con la concentración en plasma de (c) 17β-estradiol, (d) testosterona y (e) el índice de aromatización de testosterona a 17β-estradiol, en ovario con la concentración en plasma de (c) 17β-estradiol, (d) testosterona y (e) el índice de aromatización de testosterona a 17β-estradiol. Entre paréntesis se indican el tamaño de la muestra (n), el coeficiente de Pearson ( $\rho$ ) y valor de p.

#### Efecto del cuidado parental sobre la composición folicular del ovario

El grado de maduración y el tamaño del ovario variaron a largo del período de cuidado parental en hembras de chanchita. Las hembras PP presentaron los mayores valores de IGS ( $F_{3,16}$ =88,44; p<0,0001; Figura 45a), más de tres veces que cualquiera de los otros estadios examinados. Por otro lado, el IGS correlacionó negativamente con el porcentaje de folículos primarios en el ovario (p=-0,83; p=0,0002; Figura 46a), y positivamente con el porcentaje de folículos maduros (p=0,97; p=0,0003; para el análisis únicamente se consideraron los ovarios conteniendo folículos maduros, n=7; Figura 46b).

A nivel de la composición del ovario, el porcentaje de folículos primarios ( $F_{3,14}$ =18,2; p=0,0002; Figura 45b) y secundarios ( $F_{3,14}$ =4,97; p=0,016; Figura 45c) fue mínimo en el estadio de pre-puesta, y prácticamente no varió entre los otros estadios (H, LN y LS). La proporción de folículos vitelogénicos tempranos fue máxima en hembras H y LS ( $F_{3,12}$ =5,01; p=0,012; Figura 45e). Se observaron folículos maduros sólo en el estadio PP ( $F_{3,14}$ =13,81; p<0,0001; Figura 45g), mientras que los folículos post-ovulatorios abundaron en hembras H ( $F_{3,13}$ =10,84; p=0,002; Figura 45i). No se detectó ningún cambio en el porcentaje de los folículos terciarios, vitelogénico tardío y atrésicos entre los cuatro estadios del período de cuidado parental analizados (p>0,05).

Los ovarios de las hembras LN cuyas puestas fueron removidas experimentaron un aumento en el tamaño, evidenciado por un IGS promedio de más del doble con respecto al observado en los estadios control LS y LN ( $F_{3,15}$ =8,86; p=0,001; Fig 45a). Los estadios más tempranos de la foliculogénesis, como el folículo primario ( $F_{3,13}$ =4,31; p=0,016; Figura 45b) y el terciario ( $F_{3,13}$ =7,53; p=0,009; Figura 45d), tuvieron menos representación en el ovario de hembras LS cuyos huevos fueron removidos, comparado con hembras LS-control. De manera similar, las hembras LN cuya puesta fue eliminada presentaron un porcentaje menor de folículos secundarios con respecto a hembras LN-control ( $F_{3,12}$ =7,54; p=0,008; Figura 45c). Por el otro lado, el porcentaje de estadios más tardíos de la foliculogénesis, como el folículo vitelogénico tardío ( $F_{3,13}$ =28,21; p<0,0001; Figura 45f) y el folículo maduro ( $F_{3,13}$ =27,03; p<0,0001; Figura 45g) fue mayor en hembras LS y LN, respectivamente, del grupo en cual se removió la puesta, con respecto al control.



**Figura 45.** Variaciones en el índice gonadosomático (IGS) y en la composición de folículos del ovario en hembras de los distintos estadios del período de cuidado parental. Hembras de pre-puesta (PP), con huevos (H), al cuidado de larvas adheridas al sustrato (LS) y al cuidado de larvas de natación libre (LN). Letras distintas indican diferencias significativas entre los estadios del grupo control. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre los estadios de hembras cuyos huevos fueron removidos y con los controles. Entre paréntesis se indica el tamaño de la muestra.



**Figura 46.** Relación entre el porcentaje de (a) folículos primarios o (b) folículos maduros con el índice gonadosomático (IGS). Entre paréntesis se indican el tamaño de la muestra (n), el coeficiente de Pearson (ρ) y el valor de p.

# Patrón de expresión de ambas variantes de la enzima aromatasa a lo largo del período de cuidado parental

La expresión relativa de aromatasa cerebral fue máxima en el cerebro anterior de hembras PP, y gradualmente decreció hasta alcanzar un mínimo en los estadios de larvas adheridas al sustrato y larvas nadando ( $F_{3,8}$ =14,77; p=0,001; Figura 47a). Por otro lado, los niveles relativos máximos de la expresión de aromatasa gonadal en ovario se detectaron en hembras H, mientras que las hembras LS presentaron los niveles más bajos de expresión ( $F_{3,10}$ =10,28; p=0,002; Figura 47b). La eliminación de la puesta no repercutió sobe los niveles de expresión relativos de aromatasa cerebral en cerebro anterior o gonadal en ovario (p>0,05; Figura 47a y b). Finalmente, los niveles de expresión de ambas variantes de aromatasa no correlacionaron entre sí, o con el porcentaje de ninguno de los folículos ováricos evaluados (p>0,05).



**Figura 47.** Perfiles de expresión de ambas variantes de aromatasa a lo largo del período de cuidado parental. Niveles relativos de expresión (a) del gen de aromatasa cerebral (*cyp19a1b*) en cerebro anterior y (b) del gen de aromatasa gonadal (*cyp19a1a*) en ovario en hembras de pre-puesta (PP), con huevos (H), al cuidado de larvas adheridas al sustrato (LS) y al cuidado de larvas de natación libre (LN). Letras distintas indican diferencias significativas entre los estadios del grupo control. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre los estadios de hembras cuyos huevos fueron removidos y con los controles. Entre paréntesis se indica el tamaño de la muestra.



Al analizar el perfil endócrino asociado a los diferentes estadios del período de cuidado parental, se observó que los niveles plasmáticos de E<sub>2</sub>, testosterona y 11-CT fueron menores y se mantuvieron bajos o con niveles intermedios en las hembras al cuidado de los huevos y larvas, cuando se los compara con el estadio de pre-puesta. La caída en los esteroides sexuales

fue consecuencia directa del cuidado de la progenie, debido a que su remoción generó una fuerte respuesta endócrina. Las concentraciones plasmáticas de E<sub>2</sub> y testosterona aumentaron en al menos un orden de magnitud en las hembras cuyos huevos fueron removidos comparados con los niveles en el grupo control, superando incluso los niveles presentes en las hembras PP. A su vez, el índice de la conversión de testosterona a E<sub>2</sub> fue de aproximadamente 0,5 en hembras LS y LN tras las eliminación de los huevos, lo que indica una relación 1:1 entre ambos esteroides. Por otro lado, la remoción de los huevos no repercutió sobre los niveles de 11-CT en plasma, lo que sugiere que la 11-CT en la circulación general no estaría involucrada en la regulación del cuidado parental y el desarrollo del ovario. Curiosamente el índice de metabolización de testosterona a 11-CT fue máximo en el estadio de larvas adheridas al sustrato, sin embargo, esto no se tradujo en un aumento en la concentración de 11-CT en plasma. Esto podría resultar de una disminución en la síntesis de testosterona o su metabolización hacia otras vías esteroideogénicas sin que se produzcan cambios en la tasa de la conversión de 11-CT. En la misma línea, la síntesis de 11-CT se redujo drásticamente tras la eliminación de los huevos en comparación con el grupo control, probablemente como consecuencia del aumento en la síntesis de E2 disminuyendo la proporción de testosterona disponible para su metabolización a 11-CT. El traslado de los recursos hacia una mayor síntesis de E<sub>2</sub> posiblemente esté involucrado en la aceleración observada en la tasa de vitelogénesis tras la eliminación de los huevos, a través del efecto positivo ampliamente estudiado del E<sub>2</sub> sobre la síntesis de vitelogenina, una proteína precursora del vitelo sintetizada en el hígado (Tata, 1976).

En conjunto, los resultados muestran un efecto negativo de la presencia de la cría sobre la síntesis de los esteroides sexuales. Podría argumentarse que la caída observada en los niveles de las hormonas es el resultado del aislamiento social de las parejas, a diferencia de las hembras de pre-puesta que fueron muestreadas a partir de acuarios grupales, y que presentaron mayores niveles de los esteroides. Sin bien por un lado y, sin lugar a duda, el ambiente social afecta los niveles hormonales en la chanchita (Alonso y col., 2011) y su aislamiento puede derivar en una disminución de la concentración plasmática de E<sub>2</sub> y 11-CT (Morandini y col., 2015), es altamente probable que la presencia de los huevos y las larvas resulte en una caída en los niveles de los esteroides sexuales, debido a que: (i) incluso en condiciones de aislamiento y por lo tanto en ausencia de interacciones agonísticas, la eliminación de los huevos generó un aumento en los niveles de E<sub>2</sub> y testosterona en la circulación general; (ii) el mismo patrón de disminución de los niveles de esteroides sexuales luego del inicio del comportamiento parental ha sido informado para otras especies como la

tilapia de barbilla negra (Sarotherodon melanotheron; Specker y Kishida, 2000), la damisela espinosa (Acanthochromis polyacanthus; Pankhurst y col., 1999), el pez sapo de aleta lucia (P. notatus; Knapp y col., 1999); (iii) como parte del trabajo de su tesis de grado, Varela realizó un estudio detallado de la gametogénesis y de los perfiles hormonales durante el período de cuidado parental en hembras de chanchita muestreadas a partir de acuarios grupales (Varela, 2014). Aún en un ambiente grupal, Varela observó una caída en los esteroides sexuales luego de la puesta. Por otro lado, también se podría objetar, y se estaría en lo cierto, que el grupo control no fue en realidad un control estricto del procedimiento de la eliminación de los huevos, dado que se tendría que haber simulado la remoción de la laja y los huevos también en este grupo. Aun así, si bien no es posible descartar un efecto producto de la propia manipulación, es muy probable que el aumento en las hormonas sexuales sea consecuencia directa de la eliminación de la progenie como se observó en otras especies de teleósteos en experimentos similares (Smith y Haley, 1988; Tacon y col., 2000). El efecto inhibitorio de la cría sobre las hormonas sexuales maternas posiblemente enlenteció la tasa de maduración folicular en el ovario, permitiendo una translocación de los recursos energéticos hacia otras áreas, como la ejecución de comportamientos característicos del período de cuidado parental, por ejemplo la construcción de un nido, el transporte y recolección de las larvas con la boca, etc., que ocurren en simultáneo con la agresividad territorial.

En lo que respecta a los ovarios, las hembras PP presentaron las gónadas de mayor tamaño relativo al peso corporal como lo indicó el mayor IGS. Lógicamente el IGS correlacionó negativamente con el porcentaje de folículos primarios, y positivamente con el porcentaje de folículos maduros. Si bien estas asociaciones se basaron fuertemente en unos pocos valores extremos, y por lo tanto deben ser interpretadas con cierta reserva, sugieren que el IGS sería un buen indicador del grado de maduración ovárica en hembras de chanchita. Por otro lado, a excepción de los folículos post-ovulatorios y los folículos maduros, se detectaron simultáneamente todos los otros estadios de la foliculogénesis en las cuatro fases del cuidado parental evaluadas, resaltando la característica asincrónica del ovario de la chanchita, acorde a lo descripto para otras especies de cíclidos como la tilapia del Nilo (*O. niloticus*; Tacon y col., 1996), la tilapia pecho rojo (*Tilapia zilli*; Coward y Bromage, 1998), y un estudio previo en chanchita (Tubert y col., 2012).

Los porcentajes de los diferentes folículos analizados no correlacionaron con los niveles plasmáticos de testosterona, 11-CT o  $E_2$ . Particularmente, en muchas especies de teleósteos la concentración de  $E_2$  en plasma correlaciona con el proceso de vitelogénesis, es decir la incorporación de vitelo en el oocito en desarrollo (Corriero y col., 2004; Kobayashi y

114

col., 1988; Matsuyama y col., 1994). En las hembras de chanchita al cuidado de los huevos y larvas sólo se observó un pequeño aumento en el porcentaje de folículos vitelogénicos tempranos durante el estadio de huevos y larvas adheridas al sustrato (4,8%±1,2). Por lo tanto, es posible que en el momento en el que se realizó el muestro, el proceso de vitelogénesis se hubiera iniciado recientemente.

De acuerdo con el aumento en los esteroides sexuales luego de la eliminación de los huevos, se observó una aceleración en la tasa de maduración ovárica, denotada por un incremento en el porcentaje de folículos vitelogénicos tardíos y folículos maduros prematuramente, a los 3 y 8 dpf, respectivamente. El aumento en la velocidad del proceso de foliculogénesis sería el resultado de la pérdida del costo energético que representa el cuidado parental y por lo tanto permitiría acortar el intervalo de tiempo entre los eventos de puesta. De manera similar, en varias especies de teleósteos la presencia de la progenie representa un costo sobre la frecuencia reproductiva de los parentales, donde la remoción de los huevos redujo el tiempo hasta la puesta (Kuwamura, 1986; Smith, 1993; Smith y Haley, 1987).

La expresión de aromatasa gonadal en los ovarios varió durante el período de cuidado parental, con los valores máximos observados en hembras H y LN. Los niveles relativos de expresión de la variante gonadal de aromatasa no correlacionaron con los niveles de E<sub>2</sub> en la circulación general. Esto sugiere que en caso de que la actividad y la expresión génica de aromatasa gonadal correlacionaran positivamente, los ovarios no serían la única fuente de E<sub>2</sub> a nivel sistémico, al menos durante el período de pre-puesta inmediato y los ocho días siguientes a la puesta, cuando el proceso de vitelogénesis estaría aún en una fase temprana. Sin embargo, es oportuno mencionar que en otra especie de cíclido, O. niloticus, la actividad de aromatasa gonadal y el grado de expresión génica correlacionan únicamente durante el período de vitelogénesis (Chang y col., 1997). Además, en el goldfish (C. auratus, Pasmanik y Callard, 1985), en el pez sapo (Opsanus tau; Pasmanik y Callard, 1985) y en el mero de pintas rojas (E. akaara; Li y col., 2007), la actividad específica de aromatasa en el cerebro fue mayor que aquella registrada en el ovario y, por lo tanto, es probable que represente la principal fuente de estrógenos, siempre y cuando los niveles del sustrato de la enzima, la testosterona, sean equivalentes en ambas regiones. No obstante, y en aparente contradicción, en hembras de chanchita la expresión de aromatasa gonadal en ovario correlacionó positivamente con el índice de conversión de testosterona a E<sub>2</sub>, lo que sugiere que el ovario sería el principal sitio de aromatización de la testosterona sistémica.

La remoción de los huevos no afectó la expresión relativa de aromatasa gonadal, dado que los niveles de expresión no difirieron con respecto a los observados en el grupo control. Este hecho contrasta con el gran aumento registrado en la concentración de E<sub>2</sub> en plasma tras remover los embriones, lo que sugiere que (i) los ovarios no serían la principal fuente de E<sub>2</sub> durante este periodo, y/o (ii) que existiría un proceso de regulación de la actividad de aromatasa gonadal o de su síntesis, sin que ello implicara cambios a nivel de la expresión génica.

La expresión de aromatasa cerebral en el cerebro anterior fue máxima en hembras PP, intermedia en hembras H, y mínima en presencia de las larvas (hembras LS y LN). La eliminación de los huevos no repercutió sobre la expresión de la variante cerebral de aromatasa, lo que sugiere que su expresión no sería un nodo en la regulación del comportamiento parental durante el período de pre-puesta y los ocho días siguientes. Sin embargo, no se pueden descartar potenciales cambios en la expresión de la enzima a nivel local, en particular en el Vv y el APO, que debido al muestreo de la totalidad del cerebro anterior, podrían permanecer ocultos. Por otro lado, podrían ocurrir cambios putativos a nivel de la síntesis y/o activad de la enzima. Por ejemplo, en machos de ratones, el cuidado parental se vio asociado con un aumento específico en la actividad de aromatasa en el APO medial (Trainor y col., 2003).

Los mayores niveles relativos de expresión de aromatasa cerebral observados en las hembras PP, y su posterior caída con el inicio del comportamiento maternal, reflejaron el patrón general observado para los esteroides sexuales. Por un lado, los individuos de prepuesta se obtuvieron de acuarios grupales, y por lo tanto no es posible descartar un efecto del ambiente social sobre la expresión de aromatasa cerebral, que se ha sido vinculada al comportamiento agresivo en machos territoriales del cíclido A. burtoni (Huffman y col., 2013). Por el otro lado, la expresión relativa de aromatasa cerebral correlacionó positivamente con los niveles de E<sub>2</sub> y testosterona en plasma (esta última es dependiente de un único valor extremo, y por lo tanto no representa una asociación confiable), lo cual sugiere que (i) el cerebro sería la principal fuente de  $E_2$  y testosterona en hembras de chanchita, y/o (i) los niveles de expresión de la enzima resultarían del mecanismo de retroalimentación positivo directo del E2, o indirecto vía la aromatización de la testosterona (Mouriec y col., 2009), actuando sobre el potencial elemento ERE en la región promotora del gen (Diotel y col., 2010). Por lo tanto, la disminución en los niveles de E2 y testosterona al iniciarse el período de cuidado parental, probablemente arrastró a la expresión de aromatasa cerebral. Sin embargo, el hecho de que los niveles relativos de expresión de aromatasa cerebral no resultasen

afectados por la eliminación de las crías, a pesar del aumento en la concentración plasmática de E<sub>2</sub> y testosterona, denota un posible cambio en la sensibilidad del cerebro a los estrógenos. Esto último sugiere la existencia de un mecanismo de regulación independiente de la concentración de esteroides sistémica. A su vez, los niveles de expresión relativos de ambas aromatasas no correlacionaron entre sí, lo que apunta hacia sistemas regulados de manera independiente.



Figura 48. Resumen del efecto del cuidado parental sobre distintos niveles de la fisiología materna. Las líneas punteadas representan mediciones en hembras cuyos huevos fueron removidos.

# Conclusión

"Una frase del genetista Haldane, de principio de siglo, lo explica maravillosamente: -La vida no es simplemente más extraña de lo que imaginamos, es más extraña de lo que podemos imaginar.- El conocimiento nunca apagará nuestra llama. El propósito de la ciencia no es curarnos de la sensación de misterio e incertidumbre, sino reinventarla y realimentarla constantemente."

Fragmento de "The Trouble with Testosterone and Other Essays on the Biology of the Human Predicament" de Robert M. Sapolsky – Biólogo.



# [COMENTARIOS FINALES]

En esta sección se discuten brevemente los resultados generales obtenidos en el presente trabajo de tesis.

El objetivo general del presente trabajo de tesis se centró en la caracterización de la variante cerebral de la enzima aromatasa y su asociación con el comportamiento agresivo y sumiso en canchitas de distinto estatus social y a lo largo del período de cuidado parental. En este sentido, se obtuvo la secuencia nucleotídica completa del ADNc de la enzima aromatasa cerebral (*cyp19a1b*), se caracterizó la estructura primaria, secundaria y terciaría de la secuencia proteínica deducida, la cual presentó un alto grado de conservación evolutivo, y se llevó a cabo el primer estudio de la distribución neuroanatómica de la aromatasa en el cerebro completo de un pez cíclido. La obtención de la secuencia del ADNc de la enzima, nos permitió llevar a cabo un análisis de la expresión génica en cerebro e hipófisis de machos de distinto estatus social y de hembras a lo largo del período de cuidado maternal.

En el estudio de machos de la chanchita se caracterizaron los perfiles comportamentales, endócrinos, de expresión génica y reproductivos de machos territoriales y no-territoriales en un acuario comunitario, y se analizó cómo estos podrían llegar a interactuar entre sí. Se observó que los niveles de los andrógenos 11-CT y testosterona y del E<sub>2</sub> variaron de manera dependiente del estatus social y correlacionaron positiva y negativamente, respectivamente, con la frecuencia del comportamiento agresivo. No se encontraron diferencias en los niveles relativos de expresión de aromatasa cerebral en el cerebro anterior y la hipófisis de machos de distinto estatus social. Sin embargo, los niveles relativos de expresión génica de aromatasa cerebral en hipófisis correlacionaron positivamente con el índice del comportamiento agonístico y con la concentración de testosterona plasmática, por lo que se especuló que la síntesis de E<sub>2</sub> a nivel de la hipófisis podría actuar como un punto de retroalimentación positivo del comportamiento agresivo mediado por andrógenos. Es oportuno mencionar que, por un lado, se analizó la expresión génica de la enzima en muestras del cerebro anterior completo, por lo cual es probable que de haber ocurrido cambios en la expresión en zonas específicas del cerebro, estos no se reflejaran en el patrón de expresión general. Por otro lado, la expresión génica no necesariamente correlaciona con la cantidad y/o la actividad de la enzima. Más aún, lo descripto en otras especies de vertebrados sugiere fuertemente que cambios rápidos en la actividad de la aromatasa sin modificación de los niveles proteínicos, se asocian a cambios a nivel comportamental y del entorno social. Por lo cual, los resultados del presente trabajo sólo se limitan a uno de los tantos puntos de regulación de la aromatasa cerebral y su asociación con el estatus social y el comportamiento agonístico. Resultaría sumamente interesante evaluar la regulación a nivel de la actividad de la enzima, así como la distribución y la regulación de los receptores de estrógenos en el cerebro de la chanchita. Otro punto de regulación no contemplado en este trabajo de tesis es la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis del sustrato de la aromatasa, particularmente de la enzima colesterol desmolasa que cataliza el paso limitante hormonalmente regulado de la síntesis de las hormonas esteroideas. Sería sumamente interesante evaluar la actividad de las varias enzimas involucradas en la síntesis del sustrato de la aromatasa y su asociación con el estatus social. Por último, como parte del proceso de estandarización de las condiciones, los machos territoriales utilizados se encontraban próximos a la puesta, por lo cual no se puede descartar el efecto de la cercanía al evento reproductivo sobre las variables analizadas y sus correlaciones. En este sentido y, para el caso particular de los andrógenos, la denominada hipótesis del desafío desarrollada por Wingfield y col. (1990) sugiere que la variación en los niveles de los andrógenos está más fuertemente asociada con la agresividad en un contexto reproductivo, que con la fisiología reproductiva en sí.

En el caso de las hembras, se analizaron los perfiles de expresión génica de aromatasa cerebral en el cerebro y de aromatasa gonadal en el ovario en hembras de distintos estadios del período de cuidado parental. En simultáneo se evaluó la variación en la concentración plasmática de los esteroides sexuales y el grado de desarrollo ovárico. El efecto de la presencia de las larvas sobre la fisiología materna fue evaluado a través de un experimento de remoción de las crías. Se encontró que la presencia de la progenie estimuló de manera específica una caída en los niveles plasmáticos de los esteroides sexuales y de la tasa de foliculogénesis, mientras que los niveles de expresión de ambas variantes de aromatasa no resultaron afectados, si bien la expresión génica de aromatasa cerebral también cayó luego de la puesta. Al igual que sucedió en el estudio de los machos de la chanchita, al analizar el cerebro anterior en su totalidad, se diluyen los cambios potenciales en la expresión génica en los nichos neuronales probablemente regulados de manera diferencial. Por lo tanto, para estudios futuros se recomienda fuertemente analizar la expresión de aromatasa cerebral individualmente en cada uno de los núcleos cerebrales relevantes para el comportamiento en estudio, ya sea a través de un protocolo de hibridación in situ, microdisección o micropunching, que han sido exitosos en cíclidos africanos (Huffman y col., 2013; Simões y col., 2015). Por otro lado, y al igual que para machos, el análisis de la actividad de ambas variantes de la aromatasa y de las vías enzimáticas responsables de la síntesis de los sustratos de aromatasa, así como el poder conocer la localización de los receptores de estrógenos en el cerebro resultaría sumamente interesante, en particular en el momento donde se produce el cese del cuidado parental, aproximadamente 20 días luego de la eclosión. A su vez, el tamaño

121

de la muestra para algunos estadios del período de cuidado parental fue particularmente bajo. Como consecuencia la potencia de las pruebas estadísticas realizadas fue también baja y por lo tanto existió el riesgo de no detectar diferencias entre tratamientos, aunque existiesen biológicamente. Por otro lado, el hecho que aún a pesar de la baja potencia estadística se hayan detectado diferencias entre los estadios del período de cuidado parental para las distintas variables evaluadas, sugiere que se tratan de efectos contundentes y con baja dispersión interindividual. Podría argumentarse correctamente, que al tratarse de una muestra acotada, resulta poco representativa de la población y como tal debería ser interpretada con cautela. En este sentido sin embargo, los perfiles hormonales y los porcentajes de los folículos ováricos, así como el efecto específico de la progenie sobre estas variables, coinciden con lo reportado para otras especies, incluso para la propia chanchita, lo que sugiere que a pesar del tamaño pequeño de la muestra los efectos son lo suficientemente fuertes para ser detectados. Hasta donde sabemos este trabajo constituyó el primer análisis de la variación de la enzima aromatasa cerebral de teleósteos dentro del período de cuidado parental.

En conjunto la evidencia sugiere que una clara relación entre el estatus social (macho territorial *vs.* macho no-territorial y hembra de pre-puesta *vs.* hembra al cuidado de los huevos y larvas), el comportamiento agonístico y la concentración de esteroides sexuales en la circulación general. Por el contrario la expresión de la enzima aromatasa cerebral en el cerebro anterior y la hipófisis de machos, y en el cerebro anterior de hembras no aparenta estar regulada socialmente.

# **Capítulo Anexo**

"Escribo estas líneas, realmente mal anotadas, no para decir esto, ni para decir cualquier cosa, sino para ocupar en algo mi desatención."

Fernando Pessoa - Poeta y escritor



# [OTRAS APROXIMACIONES EXPERIMENTALES]

En esta sección se incluyen algunos experimentos realizados durante el desarrollo de la tesis, que se desvían del objetivo principal, pero que buscaron ampliar el conocimiento sobre el comportamiento y las bases neuronales del procesamiento cognitivo en peces cíclidos. Por un lado, se analizó la dinámica comportamental de la pareja territorial de la chanchita: ¿Existe división de tareas? ¿Hembras y machos son igualmente agresivos? ¿Actúan de manera coordinada? Por otro lado, se investigó la contribución de la proliferación celular en el procesamiento emocional del cíclido africano *Oreochromis mossambicus*.

*U*ida en pareja



Durante la caracterización del comportamiento agonístico en los machos de la chanchita (capítulo II) se cuantificaron todas las interacciones agresivas y sumisas que involucraron al macho territorial y al no-territorial de menor rango. La identificación *a posteriori* del sexo de los individuos focales, permitió distinguir entre el macho y la hembra de la pareja territorial, y por lo tanto analizar también el comportamiento agonístico de la hembra. Si bien la defensa conjunta de un territorio por parte de la pareja dominante representa la estrategia reproductiva de mayor representación entre los cíclidos Neotropicales (Keenleyside, 1991), sólo unos pocos estudios llevaron a cabo un análisis cuantitativo de la dinámica comportamental de la pareja territorial (Mackereth y Keenleyside, 1993; Rogers, 1988; Teresa y Goncalves-de-Freitas, 2011). Debido a esto, es que se buscó ampliar el conocimiento del comportamiento social de la chanchita con énfasis en la dinámica de la pareja territorial, a través de la cuantificación del número de interacciones agonísticas que involucraron tanta al macho, como a la hembra.



Al igual que para el estudio de los machos, se cuantificaron todas las interacciones agonísticas que involucraron a la hembra territorial (T), es decir: persecuciones, mordidas, embestidas, escapes y respuesta pasiva. Como el tiempo de filmación varió entre los distintos experimentos, la frecuencia del comportamiento agonístico se relativizó al tiempo total de filmación y se expresó como frecuencia de un determinado comportamiento por minuto.

Para el análisis de la dinámica de pareja, se buscó conocer si el macho y la hembra T actuaban en simultáneo o de manera alternada en la defensa del territorio. Para ello se realizó un muestreo del tipo uno-cero cada 30 segundos, sobre las filmaciones de video, donde se registró la ocurrencia de un comportamiento agresivo (1: persecución, mordida, embestida; 0: ausencia de comportamiento agresivo) y la identidad del agresor (macho T, hembra T, o ambos). La proporción de eventos agresivos correlacionó positivamente con la frecuencia del comportamiento agresivo analizado en un registro continuo (p=0,78; r<sup>2</sup>=0,62; p=0,0003). Por lo tanto, el intervalo de registro de 30 segundos resultó apropiado como indicador del comportamiento agresivo.

### Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa Statistica 8 (StatSoft <sup>®</sup>). El estudio de la frecuencia de comportamientos agresivos y sumisos de los miembros de la pareja T, se efectuó mediante la prueba no-paramétrica de signo-rango de Wilcoxon para muestras pareadas. Para evaluar si la frecuencia de ataques en simultáneo se diferenciaba de la que resultaría por simple azar, se realizó una prueba de t de Student pareada. Para ello se comparó el producto entre la frecuencia del comportamiento agresivo por parte del macho T y la frecuencia del comportamiento agresivo por parte del macho T y la frecuencia del comportamiento agresivo por parte de la hembra T – lo que equivale a la probabilidad de una agresión conjunta -, con la frecuencia observada de acción simultánea entre ambos miembros de la pareja T.

Para la prueba de t de Student se verificó el cumplimiento de los supuestos de un ensayo paramétrico, es decir la normalidad y la homocedasticidad de las muestras. Se estableció la significancia estadística cuando el p-valor fue menor a 0,05, y los datos se presentan como el promedio ± error estándar.



La frecuencia promedio de comportamiento agresivo no difirió entre machos y hembras T (2,7  $\pm$  0,3 *vs.* 3,6  $\pm$  0,6; hembras *vs.* machos; F<sub>1,7</sub>=5,09; p = 0,06). Sin embargo, las hembras T realizaron alrededor de un 50% menos persecuciones (z=-2,1; p=0,027; Figura 49a) y embestidas (z=-2,38; p=0,015; Figura 49c) que los machos T.

La defensa del territorio por parte de la pareja T ocurrió de forma intercalada, con una muy baja frecuencia de acción conjunta ( $F_{1,14}$ =24,45; p<0,01; Figura 50a), que coincidió con aquella esperada por azar ( $T_7$ =0,04; p=0,97; Figura 50b). En general, cuando un miembro de la pareja agredía a un pez de menor rango, el otro permanecía dentro del territorio en busca de alimento entre las piedras del sustrato, en aparente reposo, preparando el nido, limpiando la laja, o frotando los laterales de su cuerpo contra el potencial sitio de desove. En algunas oportunidades cuando un pez subordinado agredió a alguno de los integrantes de la pareja territorial, el otro pez intervino en el encuentro atacando al subordinado.

Al analizar el patrón de defensa del territorio por parte de la pareja, se observó que el conjunto de acciones agresivas ocurrían en breves seguidillas de alta frecuencia, intercaladas con períodos de reposo (Figura 50c). Las seguidillas de comportamientos agresivos generalmente fueron desencadenadas por el ingreso de un individuo subordinado al territorio de la pareja, o cuando un pez subordinado que hasta el momento permanecía inmóvil comenzaba a moverse. En el muestreo uno-

cero tan sólo en el 38% de los eventos se registró alguna forma de comportamiento agresivo, mientras que la búsqueda de alimento o el reposo caracterizaron los puntos remanentes.





Figura 50. Dinámica de la pareja territorial (a) Ejemplo de un muestreo uno-cero donde registró ocurrencia se la de comportamientos agresivos por parte del macho T (cuadrados rojos), la hembra T (rombos amarillos) o ambos (estrella azul). (b) Proporción del número de eventos agresivos sobre el total de eventos registrados (uno cada 30 segundos) para el macho y la hembra territorial, o para ambos en simultáneo. La línea punteada a 0,045 representa la probabilidad esperada de acción conjunta de la pareja territorial. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. (c) Ejemplo de un muestreo uno-cero donde se registró la presencia de comportamientos agresivos por parte de la pareja territorial (rombos azules). (d) En alrededor del 38% de los registros se observó la presencia de comportamientos agresivos por parte de la hembra T, macho T o ambos en conjunto.



Al analizar la dinámica comportamental de la pareja territorial, se detectó que los machos realizaron más persecuciones y embestidas que las hembras, y que rara vez actuaban en simultáneo en la defensa del territorio. Este tipo de patrón comportamental coincide con el descripto para otras especies de cíclidos Neotropicales con defensa cooperativa de un territorio y división de las tareas (Itzkowitz y col., 2002; McKaye y Murry, 2008; Snekser y Itzkowitz, 2009). La coordinación entre el macho y la hembra, de manera alternada en la defensa del territorio, permite a los animales intercalar períodos de vigilancia con períodos de alimentación y reposo, sin que esto implique un aumento considerable en la probabilidad de pérdida del territorio, al mismo tiempo que mantienen un mejor estado de salud (Perrone y Zaret, 1979). El hecho de que las hembras T realizaran en promedio un menor número de persecuciones y embestidas con respecto a los machos T, sugiere la posible existencia de un mecanismo de división de tareas, en donde los machos estarían más involucrados en la defensa del territorio, mientras que las hembras realizarían una mayor inversión en la preparación del

sitio seleccionado para la puesta. En este sentido, no se detectaron diferencias entre machos y hembras en la frecuencia de mordida de piedras, un comportamiento involucrado en la limpieza del sitio de puesta y en la construcción del nido (0,027±0,016 vs. 0,044±0,038, machos vs. hembras, respectivamente; p=0,67). No obstante, tan sólo en dos parejas se registró la frecuencia de comportamientos reproductivos durante la filmación, por lo que la muestra no fue representativa del comportamiento reproductivo de la esta especie.

# Epapel de la neurogénesis en el procesamiento cognitivo



Al igual que lo reportado para la actividad de aromatasa en el cerebro de teleósteos, donde la producción de estrógenos cerebrales es entre 100 y 1000 veces mayor comparada con la de otros vertebrados (Callard y col., 1981), el cerebro de los peces teleósteos se distingue por otra peculiaridad: el grado de neurogénesis adulta es superior al informado para cualquier otro vertebrado (Ganz y Brand, 2016)(Figura 51). Más aún, las células progenitoras en gran parte del cerebro anterior son las propias células gliales radiales que expresan aromatasa cerebral (Marz y col., 2010; Pellegrini y col., 2007). Estas coincidencias llamaron nuestra atención, por lo cual se optó por explorar el fenómeno de neurogénesis adulta en cíclidos.



**Figura 51.** Caricatura donde se ilustra la tasa superior de neurogénesis adulta informada para peces teleósteos en comparación con aquella observada en mamíferos. Las tasas se calcularon en base a lo publicado en Zupanc, 2006. Ilustración por Martín R. Ramallo.

...en el cerebro de un pez adulto el número asciende a 2000 nuevas células por minuto.

En el año 2012, Simões y col. publicaron un atlas tridimensional del cerebro del cíclido africano *O. mossambicus*, generado a partir de imágenes obtenidas por resonancia magnética (Simões y col., 2012). Si bien no se trató de un verdadero mapa estereotáxico, abrió la posibilidad de poder manipular la neurogénesis *in vivo* en áreas particulares del cerebro. Son muchas las regiones del cerebro de teleósteos donde se sitúan los centros neurogénicos, pero una de las más accesibles por su localización en la superficie dorsal del cerebro es la división medial del telencéfalo dorsal (Dm) (Adolf y col., 2006; Grandel y col., 2006; Ganz y col., 2010). El Dm se postula como la región homóloga al núcleo intersticial de la estría terminal de mamíferos (O'Connell y Hofmann, 2011), implicado en la regulación de procesos comportamentales asociados al miedo y la ansiedad (Walker y col., 2003). Por lo tanto, se planteó como hipótesis que la formación de nuevas neuronas en el Dm de cíclidos está involucrada en el procesamiento emocional vinculado al miedo. Con el objetivo de ponerla a prueba se contactó al Dr. Rui Oliveira, director del laboratorio de Unidade de Investigação em Eco-Etologia del Instituto Superior de Psicología Aplicada (ISPA), Lisboa, Portugal, donde se desarrolló el mapa tridimensional del cerebro de *O. mossambicus*, y tras un breve intercambio de correos electrónicos, quien escribe partió hacia Lisboa.



Se utilizaron aproximadamente 130 machos adultos del cíclido africano *O. mossambicus* de distinto estatus social. *O. mossambicus*, al igual que la chanchita, presenta un sistema social jerárquico, con individuos dominantes y no dominantes. Los machos dominantes se hacen acreedores de un territorio a través de despliegues y acciones agresivas sobre otros machos, y es allí donde fecundarán los huevos de varias hembras. El trabajo se realizó en las instalaciones del bioterio general de ISPA, y utilizando métodos químicos se buscó bloquear la neurogénesis, específicamente en el Dm, para luego evaluar su efecto en ensayos de condicionamiento del miedo.

En primera instancia fue necesario poner a punto un procedimiento de canulación específico para el Dm. Para ello se utilizaron cánulas de 5 mm diseñadas originalmente para su utilización en ratón. Brevemente, los peces fueron anestesiados mediante su inmersión en una solución de metanosulfonato de tricaina (MS-222). Una vez que los peces dejaron de moverse, se los sujetó entre 2 planchas de esponja recubiertas con papel humedecido y luego se procedió con la intervención quirúrgica (Figura 52). Durante todo el procedimiento los animales permanecieron anestesiados a través de una corriente constante de agua con MS-222 que ingresaba por la boca y salía por las branquias. Mediante la observación con lupa binocular, se realizó un pequeño corte en la región de la

cabeza, previo tratamiento con un analgésico local, y luego se removió todo el musculo hasta exponer el cráneo. Utilizando un pequeño torno se agujereó el hueso hasta revelar la cavidad craneana, por donde se introdujo en primer lugar una guía para la cánula, la cual se sujetó al cráneo y a la musculatura del pez utilizando pegamento para tejidos. Una vez secó completamente el pegamento, el orificio de la guía se selló utilizando una cánula *dummy* ajustable a rosca para impedir el ingreso de agua al interior del cráneo. Los peces se recuperaron del procedimiento en una pecera con bien oxigenada (Figura 53). Utilizando como referencia el atlas tridimensional de *O. mossambicus* se evaluaron distintas posiciones y ángulos de colocación de la cánula, de manera de determinar la ubicación e inclinación relativas más apropiadas para canular el Dm. Se verificó qué región del cerebro estaba siendo canulada mediante la inyección de tinta de color azul y la posterior observación en cortes transversales de la cabeza completa del área del cerebro que resultó marcada (Figura 54).



**Figura 52.** Fotografía del dispositivo utilizado durante los procedimientos quirúrgicos.

Una vez que se logró canular el Dm con una probabilidad de éxito de aproximadamente el 60%, se inició el análisis del papel potencial de la neurogénesis en el Dm en el procesamiento emocional. Para bloquear la neurogénesis, se utilizó el inhibidor de la mitosis arabinosilcitosina (Ara-C) disuelto en solución salina al 2%. En total se utilizaron 70 peces machos adultos divididos en 4 tratamientos: Macho dominante + Ara-C; Macho dominante + vehículo; Macho no dominante + Ara-C; Macho no dominante + vehículo. El protocolo experimental se inició con la canulación de los animales (en grupos de seis peces por vez), seguida de 2 días de recuperación. En el caso de los individuos dominantes, estos fueron devueltos a peceras distintas de las cuales habían sido extraídos y que contenían sólo hembras de manera tal de favorecer la continuación de su estatus. Por el contrario, los individuos no dominantes fueron colocados en peceras comunitarias con una proporción de sexos al azar y con individuos dominantes fuertemente ya establecidos y de mayor tamaño. En todos los casos los peces lograron
recuperarse exitosamente, incluso la totalidad de los individuos dominantes construyeron nidos en el sustrato y cortejaron a las hembras luego de la colocación de la cánula.



**Figura 53.** Vista (a) frontal, (b) dorsal y (c) lateral de un macho de *O. mossambicus* inmediatamente luego de finalizado el procedimiento de colocación de la cánula.

En la mañana del tercer día los peces fueron tratados con las distintas soluciones, inyectadas a través de la cánula, e inmediatamente después se trasladaron a los acuarios experimentales, colocándose un pez por acuario. Los acuarios constaron de peceras de 45 litros, cuyos laterales se hallaban revestidos en papel con 2 patrones distintos (columnas de rayas blancas y negras alternadas o círculos negros sobre un fondo blanco de manera tal que el acuario quedaba dividido en 2 zonas: una mitad con las paredes revestidas por círculos negros y otra por rayas negras y blancas verticales. En ambas zonas la proporción de blanco y negro fue idéntica. Luego de probar diferentes protocolos de condicionamiento del miedo, se optó por la aplicación de un pequeño *shock* eléctrico como estímulo incondicionado. Por lo tanto, se colocaron 2 rejillas metálicas (confidencia: léase canasto para freír papas fritas abierto) enfrentadas en el interior de las peceras, una en cada uno de sus extremo más distantes. Por encima del acuario se colocaron una cámara de filmación y un foco de luz blanca (50 W, 230 V, 35<sup>o</sup>), que actuó como estímulo condicionado (Figura 55). Luego de media hora de habituación al nuevo espacio experimental, se comenzó con el protocolo de condicionamiento del miedo. Se

encendió la luz por 40 segundos, de los cuales en los últimos 20 segundos, se otorgó el pequeño *shock* eléctrico (0,6 V/cm, 20Hz, 1 pulso/segundo). En caso de que el pez cruzara a la otra mitad del acuario con un patrón de pared distinto antes de los 20 segundos, la luz se apagaba y el pez no recibía ningún shock eléctrico; de cruzar entre los 20 y los 40 segundos, tanto la luz como el estímulo aversivo eran finalizados una vez que cruzará totalmente al otro lado, mientras que si permanecía en el lugar, la luz y el *shock* eran finalizados al segundo 40. En todos los casos se registró el tiempo que el pez tardaba en cruzar hacia la otra mitad del acuario. Cada sesión consistió de 20 ensayos, y en total se realizaron 3 sesiones, renovándose la dosis de Ara-C o vehículo al inicio de cada sesión cruzaba antes de los 20 segundos en la totalidad de los casos. Una vez finalizado el entrenamiento, los peces fueron sacrificados para verificar el efecto de Ara-C sobre la neurogénesis del telencéfalo dorsomedial, a través de ensayos inmunohistoquímicos de marcadores de la división celular.



**Figura 54**. Fotografía de un corte transversal de la cabeza de *O. mossambicus* donde puede observarse en azul el punto de ingreso de la cánula en el la división medial del telencéfalo dorsal. Abreviaturas: APO: Área preóptica; Dm: división medial del telencéfalo dorsal; NO: nervio óptico.



Lamentablemente el número de peces que logró completar el entrenamiento de manera exitosa y que además habían sido canulados correctamente en el Dm fue muy reducido para los 4 grupos, lo cual no permitió realizar ningún tipo de análisis estadístico. Por un lado, la dificultad de canular de manera precisa el Dm resultó, en principio, de la falta de un mapa estereotáxico apropiado, situación que se vio agravada por el hecho que la distancia entre el cerebro y el cráneo fue extremadamente variable entre los distintos peces utilizados. Por otro lado, en ensayos piloto de condicionamiento donde los peces no fueron canulados, el porcentaje de animales que superó la prueba con éxito fue cercano al 100%, lo cual indica la existencia de un claro efecto negativo del procedimiento de implantación de la cánula sobre la capacidad de aprendizaje.

Más allá de la falta de resultados, la experiencia permitió establecer nuevos vínculos laborales, conocer estrategias diferentes para abordar un mismo problema, y aprender técnicas de manipulación, cirugía y de aprendizaje por condicionamiento en peces. La pasantía en sí constituyó una gran "puesta a punto", lo que requirió de su construcción por constantes ensayos de prueba y error, discusiones y sesiones creativas donde junto con el Dr. José Miguel Simões, el Dr. Pedro Vieira y el Dr. Rui Oliveira, se determinaron los pasos a seguir.



**Figura 55.** Fotografía de los acuarios utilizados. Durante los ensayos una tela opaca de color negro separaba los acuarios contiguos, de manera de evitar el pasaje de luz.

## Referencias

## [BIBLIOGRAFÍA CITADA]

Adolf, B., Chapouton, P., Lam, C.S., Topp, S., Tannhauser, B., Strahle, U., Gotz, M., Bally-Cuif, L., 2006. Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon. Dev. Biol. 295, 278–293.

Aggarwal, N., Goswami, S. V., Khandelwal, P., Sehgal, N., 2014. Aromatase activity in brain and ovary: seasonal variations correlated with circannual gonadal cycle in the catfish, *Heteropneustes fossilis*.

Albert, D.J., Walsh, M.L., Gorzalka, B.B., Siemens, Y., Louie, H., 1986. Testosterone removal in rats results in a decrease in social aggression and a loss of social dominance. Physiol. Behav. 36, 401–407.

Alcazar, R., Hilliard, A.T., Becker, L., Berenaba, M., Fernald, R.D., 2014. Brains over Brawn: experience overcomes a size disadvantage in fish social hierarchies. J. Exp. Biol. 217, 1462–1468.

Almeida, O., Canário, A. V., & Oliveira, R. F., 2014. Castration affects reproductive but not aggressive behavior in a cichlid fish. Gen. Comp. Endocrinol. 207, 34-40.

Almirón, A., Casciotta, J., Ciotek, L., Giorgis, P., 2008. Guía de los Peces del Parque Nacional Pre-Delta, primera ed. APN, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

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, 559-570.

Alonso, F., Honji, R.M., Moreira, R.G., Pandolfi, M., 2012. Dominance hierarchies and social status ascent opportunity: anticipatory behavioral and physiological adjustments in a Neotropical cichlid fish. Physiol. Behav. 106, 612–618.

Amores, A., Catchen, J., Ferrara, A., Fontenot, Q., Postlethwait, J.H., 2011. Genome evolution and meiotic maps by massively parallel DNA sequencing: spotted gar, an outgroup for the teleost genome duplication. Genetics. 188, 799–808.

Amores, A., Force, A., Yan, Y.L., Joly, L., Amemiya, C., Fritz, A., Ho, R.K., Langeland, J., Prince, V., Wang, Y.L., Westerfield, M., Ekker, M., Postlethwait, J.H., 1998. Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. Science. 282, 1711–1714.

Andersson, E., Borg, B., Lambert, J. G. D., 1988. Aromatase activity in brain and pituitary of immature and mature Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) parr. Gen. Comp. Endocrinol. 72, 394-401.

Arlet, M.E., Kaasik, A., Molleman, F., Isbell, L., Carey, J.R., Mänd, R., 2011. Social factors increase fecal testosterone levels in wild male gray-cheeked mangabeys (*Lophocebus albigena*). Horm. Behav. 59, 605–611.

Baerends, G.P., Baerends-van Roon, J.M., 1950. An introduction to the study of the ethology of cichlid fishes. Behav. Suppl. 1, 1–235.

Baker, M.R., Gobush, K.S., Vynne, C.H., 2013. Review of factors influencing stress hormones in fish and wildlife. J. Nat. Conserv. 21, 309–318.

Balthazart, J., Baillien, M., Ball, G.F., 2001. Rapid and reversible inhibition of brain aromatase activity. J. Neuroendocrinol. 13, 63–73.

Balthazart, J., Baillien, M., Ball, G.F., 2006. Rapid control of brain aromatase activity by glutamatergic inputs. Endocrinology 147, 359–366.

Balthazart, J., Ball, G. F., 2006. Is brain estradiol a hormone or a neurotransmitter? Trends Neurosci. 29, 241-249.

Balthazart, J., Ball, G., 2012. Brain aromatase, estrogens, and behavior. Oxford University Press.

Balthazart, J., Deviche, P., Hendrick, J., 1977. Effects of exogenous hormones on the reproductive behaviour of adult male domestic ducks: II. Correlation with morphology and hormone plasma levels. Behav. Process. 2, 147–161.

Barlow, G. W., 2002. The cichlid fishes: nature's grand experiment in evolution. Basic Books.

Barney, M.L., Patil, J.G., Gunasekera, R.M., Carter, C.G, 2008. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in the common carp (*Cyprinus carpio*): sexual dimorphism and onset of ontogenic expression. Gen. Comp. Endocrinol. 156, 499-508.

Bell, A.M., 2001. Effects of an endocrine disrupter on courtship and aggressive behavior of male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. Anim. Behav. 62, 775–780.

Benjamini, Y., Krieger, A., Yekutieli, D., 2006. Adaptive linear step-up procedures that control the false discovery rate. Biometrika 93, 491–507.

Bentivoglio, M., Mazzarello, P., 1999. The history of radial glia. Brain. Res. Bull. 49, 305–315.

Berk, L. S., Tan, S. A., Fry, W. F., Napier, B. J., Lee, J. W., Hubbard, R. W., Lewis, J.E., Eby, W. C., 1989. Neuroendocrine and stress hormone changes during mirthful laughter. Am. J. Med. Sci. 298, 390-396.

Bernhardt, P. C., Dabbs Jr, J. M., Fielden, J. A., Lutter, C. D., 1998. Testosterone changes during vicarious experiences of winning and losing among fans at sporting events. Physiol. Behav. 65, 59-62.

Birba, A., Ramallo, M. R., Nostro, F. L., Moreira, R. G., & Pandolfi, M., 2015. Reproductive and parental care physiology of *Cichlasoma dimerus* males. Gen. Comp. Endocrinol. 221, 193-200.

Black, M.P., Balthazart, J., Baillien, M., Grober, M.S., 2011. Rapid increase in aggressive behavior precedes the decrease in brain aromatase activity during socially mediated sex change in *Lythrypnus dalli*. Gen. Comp. Endocrinol. 170, 119-24.

Blázquez M, Piferrer F., 2004. Cloning, sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Mol. Cell. Endocrinol. 219, 83-94.

Böhne, A., Heule, C., Boileau, N., Salzburger, W., 2013. Expression and sequence evolution of aromatase *cyp19a1* and other sexual development genes in East African cichlid fishes. Mol. Biol. Evol. 30, 2268-85.

Borg, B., 1994. Androgens in teleost fishes. Comp. Biochem. Physiol. 109C, 219–245.

Borg, B., Timmers, R. J., Lambert, J. G., 1986. Aromatase activity in the brain of the threespined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. I. Distribution and effects of season and photoperiod. Experimental biology, 47, 63-68. Brusatte, S.L., O'Connor, J.K., Jarvis, E.D., 2015. The Origin and Diversification of Birds. Curr Biol. 25, R888-R898.

Buntin, L., Berghman, L. R., Buntin, J. D., 2006. Patterns of Fos-like immunoreactivity in the brains of parent ring doves (*Streptopelia risoria*) given tactile and nontactile exposure to their young. Behav. Neurosci. 120, 651.

Callard, G. V., 1983. Androgen and estrogen actions in the vertebrate brain. Am. Zool. 23, 607-620.

Callard, G. V., Petro, Z., Ryan, K. J., Claiborne, J. B., 1981. Estrogen synthesis in vitro and in vivo in the brain of a marine teleost (*Myoxocephalus*).Gen. Comp. Endocrinol. 43, 243-255.

Callard, G., Schlinger, B., Pasmanik, M., 1990. Nonmammalian vertebrate models in studies of brain-steroid interactions. J. Exp. Zool. 256, 6-16.

Callard, G.V., Petro, Z., Ryan, K.J., 1978. Phylogenetic distribution of aromatase and other androgen-converting enzymes in the central nervous system. Endocrinology. 103, 2283–2290.

Callard, G.V., Tchoudakova, A.V., Kishida, M., Wood, E., 2001.Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of *cyp19* genes in teleost fish. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 79, 305–314.

Cánepa, M. M., Zhu, Y., Fossati, M., Stiller, J. W., Vissio, P. G., 2012. Cloning, phylogenetic analysis and expression of somatolactin and its receptor in *Cichlasoma dimerus*: Their role in long-term background color acclimation. Gen. Comp. Endocrinol. 176, 52-61.

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*. Biol. Reprod. 70, 737-743.

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

Castranova, D.A., King, V.W., Woods III, L.C., 2005. The effects of stress on androgen production, spermiation response and sperm quality in high and low cortisol responsive domesticated male striped bass. Aquaculture. 246, 413–422.

Caulier, M., Brion, F., Chadili, E., Turies, C., Piccini, B., Porcher, J.M., Guiguen, Y., Hinfray, N., 2015. Localization of steroidogenic enzymes and Foxl2a in the gonads of mature zebrafish (*Danio rerio*). Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 188, 96-106.

Cavaco, J. E. B., Vischer, H. F., Lambert, J. G. D., Goos, H. T., & Schulz, R. W., 1997. Mismatch between patterns of circulating and testicular androgens in African catfish, *Clarias gariepinus*. Fish Physiol. Biochem. 17, 155-162.

Cavigelli, S. A., Pereira, M. E., 2000. Mating season aggression and fecal testosterone levels in male ring-tailed lemurs (*Lemur catta*). Horm. Behav. 37, 246-255.

Cerdá-Reverter, J. M., Muriach, B., Zanuy, S., Muñoz-Cueto, J. A., 2008. A cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*):the midbrain and hindbrain. Acta Histochem. 110, 433-50.

Cerdá-Reverter, J. M., Zanuy, S., Muñoz-Cueto, J. A., 2001a. Cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). I. The telencephalon. J Morphol. 247, 217-28.

Cerdá-Reverter, J. M., Zanuy, S., Muñoz-Cueto, J. A., 2001b. Cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). II. The diencephalon. J Morphol. 247, 229-51.

Chang, X. T., Kobayashi, T., Kajiura, E. H., Nakamura, M., Nagahama, Y., 1997. Isolation and characterization of the cDNA encoding the tilapia (*Oreochromis niloticus*) cytochrome P450 aromatase (P450arom): changes in P450arom mRNA, protein and enzyme activity in ovarian follicles during oogenesis. J. Mol. Endocrinol. 18, 57-66.

Chang, X., Kobayashi, T., Senthilkumaran, B., Kobayashi-Kajura, H., Sudhakumari, C.C., Nagahama, Y., 2005. Two types of aromatase with different encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Gen. Comp. Endocrinol. 141, 101-15.

Charlier, T. D., Cornil, C. A., Ball, G. F., Balthazart, J., 2010. Diversity of mechanisms involved in aromatase regulation and estrogen action in the brain. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 1800, 1094-1105.

Chaube, R., Rawat, A., Joy, K.P., 2015. Molecular cloning and characterization of brain and ovarian cytochrome P450 aromatase genes in the catfish *Heteropneustes fossilis*: Sex, tissue and seasonal variation in, and effects of gonadotropin on gene expression. Gen. Comp. Endocrinol. 221, 120-133.

Chen, Z., Ye, R., Goldman, S. A., 2013. Testosterone modulation of angiogenesis and neurogenesis in the adult songbird brain. Neuroscience. 239, 139-148.

Choi, I., Troyer, D.L., Cornwell, D.L., Kirby-Dobbels, K.R., Collante, W.R., Simmen, F.A., 1997. Closely related genes encode developmental and tissue isoforms of porcine cytochrome P450 aromatase. DNA Cell Biol. 16, 769–777.

Choi, J.Y., Park, J.G., Jeong, H.B., Lee, Y.D., Takemura, A., Kim, S.J., 2005. Molecular cloning of cytochrome P450 aromatases in the protogynous wrasse, *Halichoeres tenuispinis*. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 141, 49-59.

Cong, X., Ludington-Hoe, S. M., Hussain, N., Cusson, R. M., Walsh, S., Vazquez, V., Briere, C-E., Vittner, D., 2015. Parental oxytocin responses during skin-to-skin contact in pre-term infants. Early Hum. Dev. 91, 401-406.

Corbin, C. J., Hughes, A. L., Heffelfinger, J. R., Berger, T., Waltzek, T. B., Roser, J. F., Santos, T.C., Miglino, M.A., Oliveira, M.F., Braga, F.C., Meirelles, F. V., 2007. Evolution of suiform aromatases: ancestral duplication with conservation of tissue-specific expression in the collared peccary (*Pecari tayassu*). J. Mol. Evol. 65, 403-412.

Cornil, C. A., Ball, G. F., & Balthazart, J., 2015. The dual action of estrogen hypothesis. Trends in neurosciences, 38, 408-416.

Cornil, C. A., Leung, C. H., Pletcher, E. R., Naranjo, K. C., Blauman, S. J., & Saldanha, C. J., 2012. Acute and specific modulation of presynaptic aromatization in the vertebrate brain. Endocrinology. 153, 2562-2567.

Corriero, A., Acone, F., Desantis, S., Zubani, D., Deflorio, M., Ventriglia, G., Bridges, C.R., Labate, M., Palmieri, G., McAllister, B.G., Kime, D.E., De Metrio, G., 2004. Histological and immunohistochemical investigation on ovarian development and plasma estradiol levels in the swordfish *Xiphias gladius*. L. Eur. J. Histochem. 48, 413–422.

Coumailleau, P., Kah, O., 2015. Expression of the *cyp19a1* gene in the adult brain of Xenopus is neuronal and not sexually dimorphic. Gen. Comp. Endocrinol. 221, 203-212.

Coward, K., Bromage, N. R., 1998. Histological classification of oocyte growth and the dynamics of ovarian recrudescence in *Tilapia zillii*. J. Fish. Biol. 53, 285-302.

Creel, S., 2001. Social dominance and stress hormones. Trends Ecol. Evol. 16, 491–497.

Curley, J. P., Jensen, C. L., Franks, B., Champagne, F. A., 2012. Variation in maternal and anxiety-like behavior associated with discrete patterns of oxytocin and vasopressin 1a receptor density in the lateral septum. Horm. Behav. 61, 454-461.

Dalla Valle, L., Ramina, A., Vianello, S., Belvedere, P., Colombo, L., 2002. Cloning of two mRNA variants of brain aromatase cytochrome P450 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*). J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 82, 19-32.

De Bournonville, C., Dickens, M. J., Ball, G. F., Balthazart, J., Cornil, C. A., 2013. Dynamic changes in brain aromatase activity following sexual interactions in males: where, when and why?. Psychoneuroendocrinology. 38, 789-799.

Delgadin, T. H., Perez Sirkin, D. I., Karp, P. J., Fossati, M., Vissio, P. G., 2014. Inter-individual variability in reproductive success and somatic growth in *Cichlasoma dimerus* (Heckle, 1840). Belg. J. Zool. 144(2).

Demas, G.E., Cooper, M.A., Albers, H.E., Soma, K.K., 2007. Novel mechanisms underlying neuroendocrine regulation of aggression: a synthesis of rodent, avian, and primate studies, in: A. Lajtha, J.D. Blaustein (Eds.), Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology, Springer, US, 2007, pp. 337–372.

Desjardins, J. K., Becker, L., Fernald, R. D., 2015. The effect of observers on behavior and the brain during aggressive encounters. Behav. Brain Res. 292, 174-183.

Desjardins, J. K., Fernald, R. D., 2009. Fish sex: why so diverse? Curr. Opin. Neurobiol. 19, 648.

Desjardins, J.K., Hazelden, M.R., Van der Kraak, G.J., Balshine, S., 2006. Male and female cooperatively breeding fish provide support for the "Challenge Hypothesis". Behav. Ecol. 17, 149–154.

DeVries, A.C., Glasper, E.R., Detillion, C.E., 2003. Social modulation of stress responses. Physiol. Behav. 79, 399–407.

Di Yorio, M. P., Pérez Sirkin, D. I., Delgadin, T. H., Shimizu, A., Tsutsui, K., Somoza, G. M., Vissio, P. G. 2016. Gonadotrophin-Inhibitory Hormone in the Cichlid Fish *Cichlasoma dimerus*: Structure, Brain Distribution and Differential Effects on the Secretion of Gonadotrophins and Growth Hormone. J. Neuroendocrinol. 28(5).

Dickens, M.J., de Bournonville, C., Balthazart, J., Cornil, C.A., 2014. Relationships between rapid changes in local aromatase activity and estradiol concentrations inmale and female quail brain. Horm. Behav. 65, 154–164.

Diotel, N., Do Rego, J. L., Anglade, I., Vaillant, C., Pellegrini, E., Gueguen, M. M., Mironov, S., Vaudry, H., Kah, O., 2011. Activity and expression of steroidogenic enzymes in the brain of adult zebrafish. Eur. J. Neuros. 34, 45-56.

Diotel, N., Le Page, Y., Mouriec, K., Tong, S. K., Pellegrini, E., Vaillant, C., Anglade, I., Brion, F., Pakdel, F., Chung, B., Kah, O., 2010. Aromatase in the brain of teleost fish: expression, regulation and putative functions. Front. Neuroendocrinol. 31, 172-192.

do Rego, J. L., Vaudry, H., 2016. Comparative aspects of neurosteroidogenesis: From fish to mammals. Gen. Comp. Endocrinol. 227, 120-129.

Duckworth, R.A., Mendonça, M.T., Hill, G.E., 2004. Condition-dependent sexual traits and social dominance in the house finch. Behav. Ecol. 15, 779–784.

Dufau, M.L., Miyagawa, Y., Takada, S., Khanum, A., Miyagawa, H., Buczko, E., 1997. Regulation of androgen synthesis: the late steroidogenic pathway. Steroids. 62,128–132.

Eisenegger, C., Naef, M., Snozzi, R., Heinrichs, M., Fehr, E., 2010. Prejudice and truth about the effect of testosterone on human bargaining behaviour. Nature 463, 356–359.

Feder, H.H., 1984. Hormones and sexual behavior. Annu. Rev. Psychol. 35, 165–200.

Fernald, R.D., Hirata, N.R., 1977. Field study of Haplochromis burtoni: quantitative behavioural observations. Anim. Behav. 25, 964–975.

Filby, A. L., Paull, G. C., Searle, F., Ortiz-Zarragoitia, M., Tyler, C. R., 2012. Environmental estrogen-induced alterations of male aggression and dominance hierarchies in fish: a mechanistic analysis. Environ. Sci. Technol. 46, 3472-3479.

Filby, A.L., Paull, G.C., Bartlett, E.J., Van Look, K.J., Tyler, C.R., 2010. Physiological and health consequences of social status in zebrafish (*Danio rerio*). Physiol. Behav. 101, 576–587.

Flores, F., Naftolin, F., Ryan, K. J., 1973. Aromatization of androstenedione and testosterone by rhesus monkey hypothalamus and limbic system. Neuroendocrinol. 11, 177-182.

Force, A., Lynch, M., Pickett, F.B., Amores, A., Yan, Y.L,, Postlethwait, J., 1999. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. Genetics. 151, 1531–1545.

Forlano, P. M., Schlinger, B. A., Bass, A. H., 2006. Brain aromatase: new lessons from nonmammalian model systems. Front. Neuroendocrinol. 27, 247-274.

Forlano, P.M., Deitcher, D.L., Myers, D.A., Bass, A.H., 2001. Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. J Neurosci 21,8943–8955.

Fox, H.E., White, S.A., Kao, M.H.F., Fernald, R.D., 1997. Stress and dominance in a social fish. J. Neurosci. 17, 6463–6469.

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

François Fénelon. Abrégé des vies des anciens philosophes, Paris 1726, p. 314 (French). Translation: Lives of the ancient philosophers, London 1825, p. 202

Friedman, M., Keck, B.P., Dornburg, A., Eytan, R.I., Martin, C.H., Hulsey, C.D., Wainwright, P.C., Near, T.J., 2013. Molecular and fossil evidence place the origin of cichlid fishes long after Gondwanan rifting. Proc. Biol. Sci. 280, 1733.

Froese, R., Pauly, D., 2016. FishBase. World Wide Web electronic publication. <u>www.fishbase.org</u>, versión (01/2016).

Furigo, I. C., Kim, K. W., Nagaishi, V. S., Ramos-Lobo, A. M., de Alencar, A., Pedroso, J. A., Metzger, M., Donato, J., 2014. Prolactin-sensitive neurons express estrogen receptor- $\alpha$  and depend on sex hormones for normal responsiveness to prolactin. Brain research. 1566, 47-59.

Galhardo, L., Oliveira, R.F., 2014. The effects of social isolation on steroid hormone levels are modulated by previous social status and context in a cichlid fish. Horm. Behav. 65, 1–5.

Ganz, J., Brand, M., 2016. Adult Neurogenesis in Fish. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. a019018.

Ganz, J., Kaslin, J., Hochmann, S., Freudenreich, D., Brand, M., 2010. Heterogeneity and Fgf dependence of adult neural progenitors in the zebrafish telencephalon. Glia. 58, 1345–1363.

Garcia-Segura, LM., Wozniak, A., Azcoitia, I., Rodriguez, J.R., Hutchison, R.E., Hutchison, J.B., 1999. Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. Neuroscience. 89, 567–578.

Geraudie, P., Hinfray, N., Gerbron, M., Porcher, J. M., Brion, F., Minier, C., 2011. Brain cytochrome P450 aromatase activity in roach (*Rutilus rutilus*): seasonal variations and impact of environmental contaminants. Aquat. Toxicol. 105, 378-384.

Gesquiere, L.R., Learn, N.H., Simao, M.C., Onyango, P.O., Alberts, S.C., Altmann, J., 2011. Life at the top: rank and stress in wild male baboons. Science. 333, 357–360.

Ghosh, D., Griswold, J., Erman, M., Pangborn, W., 2009. Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. Nature. 457, 219-223.

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

González, A., Piferrer, F., 2003. Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax L*.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. Gen. Comp. Endocrinol. 132, 223-230.

Goodson, J.L., 2005. The vertebrate social behavior network: evolutionary themes and variations. Horm. Behav. 48,11-22.

Goodwin, N. B., Balshine-Earn, S., Reynolds, J. D., 1998. Evolutionary transitions in parental care in cichlid fish. Proc. R. Soc. Lond. [Biol]. 265, 2265-2272.

Goto-Kazeto, R., Kight, K.E., Zohar, Y., Place, A.R., Trant, J.M., 2004. Localization and expression of aromatase mRNA in adult zebrafish. Gen. Comp. Endocrinol. 139, 72–84

Graham, S. E., & Peterson, J. A., 1999. How similar are P450s and what can their differences teach us?. Arch. Biochem. Biophys. 369, 24-29.

Graham-Lorence, S., Amarneh, B., White, R.E., Peterson, J.A., Simpson, E.R., 1995. A threedimensional model of aromatase cytochrome P450. Protein Sci. 4, 1065-1080. Grandel, H., Kaslin, J., Ganz, J., Wenzel, I., Brand, M., 2006.Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: Origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. Dev. Biol. 295, 263–277.

Greenberg, N., Chen, T., Crews, D., 1984. Social status, gonadal state, and the adrenal stress response in the lizard, Anolis carolinensis. Horm. Behav. 18, 1–11.

Gregory, W.A., Edmondson, J.C., Hatten, M.E., Mason, C.A., 1988. Cytology and neuronglial apposition of migrating cerebellar granule cells in vitro. J. Neurosci. 8, 1728–1738.

Grosenick, L., Clement, T. S., & Fernald, R. D., 2007. Fish can infer social rank by observation alone. Nature. 445, 429-432.

Guo, B., Gan, X., He, S., 2010. Hox genes of the Japanese eel *Anguilla japonica* and Hox cluster evolution in teleosts. J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol. 314, 135–147.

Gurney, W.S.C., Nisbet, R.M., 1979. Ecological stability and social hierarchy. Theor. Popul. Biol. 16, 48–80.

Haley, M., 1987. Pair formation in the Texas cichlid, *Cichlusoma cyunoguttatum* (Baird and Girard). Biol. Behav. 12, 177–185.

Hallgren, S. L., Linderoth, M., Olsén, K. H., 2006. Inhibition of cytochrome p450 brain aromatase reduces two male specific sexual behaviours in the male Endler guppy (*Poecilia reticulata*). Gen. Comp. Endocrinol. 147, 323-328.

Hara, Y., Waters, E. M., McEwen, B. S., Morrison, J. H., 2015. Estrogen effects on cognitive and synaptic health over the lifecourse. Physiol. Rev. 95, 785-807.

Haraguchi, S., Hara, S., Ubuka, T., Mita, M., Tsutsui, K., 2012. Possible role of pineal allopregnanolone in Purkinje cell survival. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109, 21110-21115.

Harbott, L.K., Burmeister, S.S., White, R.B., Vagell, M., Fernald, R.D., 2007. Androgen receptors in a cichlid fish, *Astatotilapia burtoni*: Structure, localization, and expression levels. J. Comp. Neurol. 504, 57-73.

Hayden-Hixson, D.M., Ferris, C.F., 1991. Steroid-specific regulation of agonistic responding in the anterior hypothalamus of male hamsters. Physiol. Behav. 50:793–9.

He, F., Tai, F., Zhang, Y., Zhang, X., 2012. Effects of castration on aggression and levels of serum sex hormones and their central receptors in mandarin voles (*Microtus mandarinus*). Journal of Comparative Physiology A, 198(5), 347-362.

Heimovics, S. A., Trainor, B. C., Soma, K. K., 2015. Rapid Effects of Estradiol on Aggression in Birds and Mice: The Fast and the Furious. Integr. Comp. Biol. 55, 281-293.

Henkel, C. V., Burgerhout, E., de Wijze, D. L., Dirks, R. P., Minegishi, Y., Jansen, H. J., Spaink, H.P., Dufour, S., Weltzien, F.A., Tsukamato, K., Van Den Thillart, G. E., 2012. Primitive duplicate Hox clusters in the European eel's genome. PloS one. 7, e32231.

Hinfray, N., Nóbrega, R.H., Caulier, M., Baudiffier, D., Maillot-Maréchal, E., Chadili, E., Palluel, O., Porcher, J.M., Schulz, R., Brion, F., 2013. Cyp17a1 and Cyp19a1 in the zebrafish testis are differentially affected by oestradiol. J Endocrinol. 216, 375-388.

Hirschenhauser, K., Oliveira, R.F., 2006. Social modulation of androgen levels in Vertebrates: a meta-analysis of the challenge hypothesis. Anim. Behav. 71,265–77.

Hishida, T.O., Kawamoto, N., 1970. Androgenic and male-inducing effects of 11-ketotestosterone on a teleost, themedaka (*Oryzias latipes*). J. Exp. Zool. 173, 279–283.

Hofmann, H.A., Benson, M.E., Fernald, R.D., 1999. Social status regulates growth rate: consequences for life-history strategies. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 14171–14176.

Hojo, Y., Hattori, T. A., Enami, T., Furukawa, A., Suzuki, K., Ishii, H. T., Mukai, H., Morrison, J.H., Janssen, W.G.M., Kominami, S., H., Harada, N., 2004. Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017 $\alpha$  and P450 aromatase localized in neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101, 865-870.

Huffman, L.S., O'Connell, L.A., Hofmann, H.A., 2013. Aromatase regulates aggression in the African cichlid fish *Astatotilapia burtoni*. Physiol. Behav. 112, 77–83.

Huggard-Nelson, D.L., Nathwani, P.S., Kermouni, A., Habibi, H.R., 2002. Molecular characterization of LH-beta and FSH-beta subunits and their regulation by estrogen in the goldfish pituitary. Mol. Cell Endocrinol. 188,171-193.

Ijiri, S., Kazeto, Y., Lokman, P.M., Adachi, S., Yamauchi, K. 2003., Characterization of a cDNA encoding P-450 aromatase (CYP19) from Japanese eel ovary and its expression in ovarian follicles during induced ovarian development, Gen. Comp. Endocrinol. 130, 193–203.

Itzkowitz, M., Santangelo, N., Richter, M., 2002. How similar is the coordination of parental roles among different pairs? An examination of a monogamous fish. Ethol. 108, 727–738.

Iwata, E., Mikami, K., Manbo, J., Moriya-Ito, K., Sasaki, H., 2012. Social interaction influences blood cortisol values and brain aromatase genes in the protandrous false clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris*. Zool. Sci. 29, 849-855.

Jefferys, B. R., Kelley, L. A., Sternberg, M. J., 2010. Protein folding requires crowd control in a simulated cell. J. Mol. Biol. 397, 1329-1338.

Jeng, S. R., Yueh, W. S., Pen, Y. T., Gueguen, M. M., Pasquier, J., Dufour, S., Chang, C.F., Kah, O., 2012. Expression of aromatase in radial glial cells in the brain of the Japanese eel provides insight into the evolution of the *cyp191a* gene in Actinopterygians. PloS one. 7, e44750.

Jones, D.T., Taylor, W.R., Thornton, J.M., 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. Comput. Applic. Biosci. 8, 275–282.

Kazeto, Y., Trant, J.M., 2005. Molecular biology of channel catfish brain cytochrome P450 aromatase (CYP19A2): cloning, preovulatory induction of gene expression, hormonal gene regulation and analysis of promoter region. J. Mol. Endocrinol. 35, 571-83.

Keenleyside, M.H.A., 1991. Parental care. En: Keenleyside, M.H.A. (Ed.), Cichlid fishes: Behavior, Ecology, and Evolution. Chapman Hall, London, pp. 191–208.

Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., Sternberg, M. J., 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. Nat. Protoc. 10, 845-858.

Kempenaers, B., Peters, A., Foerster, K., 2008. Sources of individual variation in plasma testosterone levels. Philos. Trans. R. Soc., B. 363, 1711–1723.

Kindler, P.M., Philipp, D.P., Gross, M.R., Bahr, J.M., 1989. Serum 11-ketotestosterone and testosterone concentrations associated with reproduction in male bluegill (*Lepomis macrochirus*: Centrarchidae). Gen. Comp. Endocrinol. 75, 446–453.

Knapp, R., Wingfield, J.C., Bass, A.H., 1999. Steroid hormones and paternal care in the plainfin midshipman fish (*Porichthys notatus*). Horm. Behav. 35, 81–89.

Kobayashi, M., Aida, K., Furukawa, K., Law, Y. K., Moriwaki, T., Hanyu, I., 1988. Development of sensitivity to maturation-inducing steroids in the oocytes of the daily spawning teleost, the kisu *Sillago japonica*. Gen. Comp. Endocrinol. 72, 264-271.

Kobayashi, Y., Kobayashi, T., Nakamura, M., Sunobe, T., Morrey, C. E., Suzuki, N., Nagahama, Y., 2004. Characterization of two types of cytochrome P450 aromatase in the serial-sex changing gobiid fish, *Trimma okinawae*. Zool. Sci. 21, 417-425.

Koyama, S., Kamimura, S., 1998. Lowered sperm motility in subordinate social status of mice. Physiol. Behav. 65, 665–669.

Kroes, R.A., Panksepp, J., Burgdorf, J., Otto, N.J., Moskal, J.R., 2006. Modeling depression: social dominance–submission gene expression patterns in rat neocortex. Neuroscience. 137, 37–49.

Kumar, S. J., Dashrath, R. K., Pranati, S., Pallipuram, J., 2015. Evolutionary analysis and structural insights in Brain type Cytochrome P450/Aromatase of Stinging catfish, *Heteropneustes fossilis*. Res. J. Biotechnol. 10, 11.

Kuwamura, T., 1986. Parental care and mating systems of cichlid fishes in Lake Tanganyika: a preliminary field survey. J. Ethol. 4, 129-146.

Kwon, J.Y., Kim, J., 2013. Differential expression of two distinct aromatase genes (*cyp19a1a* and *cyp19a1b*) during vitellogenesis and gestation in the viviparous black rockfish *Sebastes schlegelii*. Anim. Cells Syst. 17, 88-98.

Lacava, R.V., Brasileiro, L., Maia, R., Oliveira, R.F., Macedo, R.H., 2011. Social environment affects testosterone level in captive male blue-black grassquits. Horm. Behav. 59, 51–55.

Lema, S. C., Sanders, K. E., Walti, K. A., 2015. Arginine Vasotocin, Isotocin and Nonapeptide Receptor Gene Expression Link to Social Status and Aggression in Sex-Dependent Patterns. J. Neuroendocrinol. 27, 142-157.

Lessells, C.M., Boag, P.T., 1987. Unrepeatable repeatabilities: a common mistake. Auk. 104, 116–121.

Levitis, D.A., Lidicker, W.Z., Freund, G., 2009. Behavioural biologists don't agree on what constitutes behaviour. Anim. Behav. 78, 103-110.

Li, G.L., Liu, X.C., Lin, H.R., 2007. Seasonal changes of serum sex steroids concentration and aromatase activity of gonad and brain in red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). Anim. Reprod. Sci. 99, 156–166.

Libersat F, Pflüger H-J. 2004. Monoamines and the orchestration of behavior. Bioscience. 54, 17–25

Liley, N.R., Breton, B., Fostier, A., Tan, E.S., 1986. Endocrine changes associated with spawning behavior and social stimuli in a wild population of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) I. Males. Gen. Comp. Endocrinol. 62, 145–156.

Lincoln, G.A., Guinness, F., Short, R.V., 1972. The way in which testosterone controls the social and sexual behavior of the red deer stag (*Cervus elaphus*). Horm. Behav. 3, 375–396.

Lock, B., Bennett, A., 2015. Changes in Plasma Testosterone and Aggressive Behavior in Male Green Iguanas (*Iguana iguana*) Following Orchidectomy. J. Herpetol. Med. Surg. 25, 107-115.

Lord, L. D., Bond, J., Thompson, R. R., 2009. Rapid steroid influences on visually guided sexual behavior in male goldfish. Horm. Behav. 56, 519-526.

Mackereth, R.W., Keenleyside, M.H.A., 1993. Breeding territoriality and pair formation in the convict cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*) Pisces, Cichlidae. Can. J. Zool. 71, 960–967.

Mangiamele, L. A., Gomez, J. R., Curtis, N. J., Thompson, R. R., 2016. GPER/GPR30, a membrane estrogen receptor, is expressed in the brain and retina of a social fish (*Carassius auratus*) and colocalizes with isotocin. J. Comp. Neurol. En prensa.

Marsh, K.E., Creutz, L.M., Hawkins, M.B., Godwin, J., 2006. Aromatase immunoreactivity in the bluehead wrasse brain, *Thalassoma bifasciatum*: immunolocalization and co-regionalization with arginine vasotocin and tyrosine hydroxylase, Brain. Res. 1126, 91–101.

Marsh-Hunkin, E.K., Heinz, M.H., Hawkins, B.M., Godwin, J., 2013. Estrogenic control of behavioral sex change in the Bluehead Wrasse, *Thalassoma bifasciatum*. Integr. Comp. Biol. 53, 951–959

Martinez-Cerdeno, V., Noctor, S.C., Kriegstein, A.R., 2006. Estradiol stimulates progenitor cell division in the ventricular and subventricular zones of the embryonic neocortex. Eur. J. Neurosci. 24, 3475–3488.

Maruska, K. P., Zhang, A., Neboori, A., Fernald, R. D., 2013. Social opportunity causes rapid transcriptional changes in the social behaviour network of the brain in an African cichlid fish. J. Neuroendocrinol. 25, 145-157.

Maruska, K.P., Carpenter, R.E., Fernald, R.D., 2012. Characterization of cell proliferation throughout the brain of the African cichlid fish *Astatotilapia burtoni* and its regulation by social status. J. Comp. Neurol. 520, 3471–3491

Maruska, K.P., Fernald, R.D., 2010a. Steroid receptor expression in the fish inner ear varies with sex, social status, and reproductive state. BMC Neurosci. 30, 11–58.

Maruska, K.P., Fernald, R.D., 2010b. Behavioral and physiological plasticity: rapid changes during social ascent in an African cichlid fish. Horm. Behav. 58, 230–240.

Maruska, K.P., Fernald, R.D., 2011. Plasticity of the reproductive axis caused by social status change in an African cichlid fish: II Testicular gene expression and spermatogenesis. Endocrinology 152, 291–302.

Marz, M., Chapouton, P., Diotel, N., Vaillant, C., Hesl, B., Takamiya, M., Lam, C.S., Kah, O., Bally-Cuif, L., Strahle, U., 2010. Heterogeneity in progenitor cell subtypes in the ventricular zone of the zebrafish adult telencephalon. Glia. 58, 870–888.

Mateos, J., Mañanos, E., Carrillo, M., Zanuy, S., 2002. Regulation of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and sexual steroids in the Mediterranean Sea bass. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 132, 75-86.

Matsuyama, M., Adachi, S., Nagahama, Y., Matsuura, S., 1994. Spawning characteristics and steroid hormone profile in the wild female Japanese sardine *Sardinops melanostictus*. Fishery Sci. 60,703–706.

McKaye, K. R., 1977. Competition for breeding sites between the cichlid fishes of Lake Jiloa, Nicaragua. Ecology. 58, 291-302.

McKaye, K. R., 1984. Behavioural aspects of cichlid reproductive strategies: patterns of territoriality and brood defence in Central American substratum spawners and African mouth brooders. En: Fish reproduction: strategies and tactics, 245-273.

McKaye, K.R., Murry, B.A., 2008. Sex role differentiation in brood defense by a Nicaraguan cichlid fish, *Amphilophus xiloanensis*. Caribb. J. Sci. 44, 13–20.

Meijide, F.J., Guerrero, G.A., 2000. Embryonic and larval development of a substrate- brooding cichlid *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) under laboratory conditions. J. Zool. 252, 481–493.

Menuet, A., Anglade, I., Le Guevel, R., Pellegrini, E., Pakdel, F., Kah, O., 2003. Distribution of aromatase mRNA and protein in the brain and pituitary of female rainbow trout: comparison with estrogen receptor A. J. Comp. Neurol. 462, 180–193.

Menuet, A., Pellegrini, E., Brion, F., Gueguen, M.M., Anglade, I., Pakdel, F., Kah, O., 2005. Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. J. Comp. Neurol. 485, 304-320.

Mileva, V.R., Fitzpatrick, J.L., Marsh-Rollo, S., Gilmour, K.M., Wood, C.M., Balshine, S., 2009. The stress response of the highly social African cichlid *Neolamprologus pulcher*. Physiol. Biochem. Zool. 82, 720–729.

Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., Nagahama, Y., 1991. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 5774–5778.

Moos, F., Poulain, D. A., Rodriguez, F., Guerne, Y., Vincent, J. D., Richard, P., 1989. Release of oxytocin within the supraoptic nucleus during the milk ejection reflex in rats. Exp. Brain. Res. 76, 593-602.

Morandini, L., Honji, R.M., Ramallo, M.R., Moreira, R.G., Pandolfi, M., 2014. The interrenal gland in males of the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*: relationship with stress and the establishment of social hierarchies. Gen. Comp. Endocrinol. 195, 88–98.

Mouriec, K., Gueguen, M. M., Manuel, C., Percevault, F., Thieulant, M. L., Pakdel, F., Kah, O., 2009. Androgens upregulate *cyp19a1b* (aromatase B) gene expression in the brain of zebrafish (*Danio rerio*) through estrogen receptors. Biol. Reprod. 80, 889-896.

Muller, M. N., Wrangham, R. W., 2004. Dominance, aggression and testosterone in wild chimpanzees: a test of the 'challenge hypothesis'. Anim. Behav. 67, 113-123.

Naftolin, F., Ryan, K. J., Petro, Z., 1972. Aromatization of androstenedione by the anterior hypothalamus of adult male and female rats. Endocrinology. 90, 295-298.

Naftolin, F., Ryan, K.J., Petro, Z. ,1971. Aromatization of androstenedione by the diencephalon. J. Clin. Endocrinol. Metab. 33, 368–370.

Nagahama, Y., Yoshikuni, M., Yamashita, M., Tokumoto, T., Katsu, Y., 1995. 4 Regulation of Oocyte Growth and Maturation in Fish. Curr. Top. Dev. Biol. 30, 103-145.

Nakagawa, S., Schielzeth, H., 2010. Repeatability for Gaussian and non-Gaussian data: a practical guide for biologists. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 85, 935–956.

Nakamura, T., Tanabe, Y., Hirano, H., 1978. Evidence of the in vitro formation of cortisol by the adrenal gland of embryonic and young chickens (*Gallus domesticus*). Gen. Comp. Endocrinol. 35, 302-308.

Nelson, J. S., 2006. Fishes of the World. 4a ed. John Wiley & Sons, Inc.

Nelson, R. J., Chiavegatto, S., 2001. Molecular basis of aggression. Trends Neurosci. 24, 713-719.

Nelson, R.J., 2011. An introduction to behavioral endocrinology (4a ed.) Sunderland, MA, US: Sinauer Associates An introduction to behavioral endocrinology (4a ed.).

Newman, S.W., 1999. The medial extended amygdala in male reproductive behavior: a node in the mammalian social behavior network. Ann. N. Y. Acad. Sci. 877, 242–257.

O'Connell, L. A., Matthews, B. J., & Hofmann, H. A., 2012. Isotocin regulates paternal care in a monogamous cichlid fish. Horm. Behav. 61, 725-733.

O'Connell, L.A., Hofmann, H.A., 2011. The vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: A comparative synthesis. J. Comp. Neurol. 519, 3599–3639.

Ogawa, S., Chester, A.E., Hewitt, S.C., Walker, V.R., Gustafsson, J.A., Smithies, O., Korach, K.S., Pfaff, D.W., 2000. Abolition of male sexual behaviors in mice lacking estrogen receptors alpha and beta (alpha beta ERKO). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 14737–14741.

Okubo, K., Takeuchi, A., Chaube, R., Paul-Prasanth, B., Kanda, S., Oka, Y., Nagahama, Y., 2011. Sex differences in aromatase gene expression in the medaka brain. J. Neuroendocrinol. 23, 412-423.

Oldfield, R. G., Mandrekar, K., Nieves, M. X., Hendrickson, D. A., Chakrabarty, P., Swanson, B. O., Hofmann, H. A., 2015. Parental care in the Cuatro Ciénegas cichlid, *Herichthys minckleyi* (Teleostei: Cichlidae). Hydrobiologia. 748, 233-257.

Oliveira, R. F., 2009. Social behavior in context: hormonal modulation of behavioral plasticity and social competence. Int. Comp. Biol. icp055.

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

Oliveira, R.F., 2004. Socialmodulation of androgens in vertebrates: mechanisms and function. Adv. Study Behav. 34, 165–240.

Oliveira, R.F., Almada, V.C., 1996. Dominance hierarchies and social structure in captive groups of the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* (Teleostei, Cichlidae). Ethol. Ecol. Evol. 8, 39–55.

Oliveira, R.F., Hirschenhauser, K., Carneiro, L.A., Canario, A.V., 2002. Social modulation of androgen levels in male teleost fish. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 132, 203–215.

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. Proc. Biol. Sci. 276, 2249–2256.

Overk, C.R., Perez, S.E., Ma, C., Taves, M.D., Soma, K.K., Mufson, E.J., 2013. Sex steroid levels and AD-like pathology in 3xTgAD mice. J. Neuroendocrinol. 25, 131–44.

Páll, M. K., Liljander, M., Borg, B., 2004. Prolactin diminishes courtship behaviour and stimulates fanning in nesting male three-spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*. Behaviour, 141, 1511-1519.

Pankhurst, N. W., Hilder, P. I., Pankhurst, P. M., 1999. Reproductive condition and behavior in relation to plasma levels of gonadal steroids in the spiny damselfish *Acanthochromis polyacanthus*. Gen. Comp. Endocrinol. 115, 53-69.

Pankhurst, N.E., 2011. The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective. Gen. Comp. Endocrinol. 170, 265–275.

Parikh, V.N., Clement, T.S., Fernald, R.D., 2006. Androgen level andmale social status in the African cichlid, *Astatotilapia burtoni*. Behav. Brain Res. 166, 291–295.

Pasmanik, M., Callard, G. V., 1985. Aromatase and  $5\alpha$ -reductase in the teleost brain, spinal cord, and pituitary gland. Gen. Comp. Endocrinol. 60, 244-251.

Pasmanik, M., Y Callard, G.V., 1988. Changes in Brain Aromatase and  $5\alpha$ -Reductase Activities Correlate Significantly with Seasonal Reproductive Cycles in Goldfish (*Carassius auratus*)\*. Endocrinology. 122, 1349-1356.

Paus, T., Keshavan, M., Giedd, J. N., 2008. Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence?. Nat. Rev. Neurosci. 9, 947-957.

Payne, A.H., Youngblood, G.L., 1995. Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig Cells. Biol. Reprod. 52, 217–225.

Pedersen, C. A., Ascher, J. A., Monroe, Y. L., Prange, A. J., 1982. Oxytocin induces maternal behavior in virgin female rats. Science. 216, 648-650.

Pellegrini, E., Mouriec, K., Anglade, I., Menuet, A., Le Page, Y., Gueguen, M.M., Marmignon, M.H., Brion, F., Pakdel, F., Kah, O., 2007. Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish. J. Comp. Neurol. 501, 150–167.

Perrone Jr., M., Zaret, T.M., 1979. Parental care patterns of fishes. Am. Nat. 113, 351–361.

Peterson, R. S., Yarram, L., Schlinger, B. A., Saldanha, C. J., 2005. Aromatase is pre-synaptic and sexually dimorphic in the adult zebra finch brain. Proc. R. Soc. [Biol]. 272, 2089-2096.

Pfennig, F., Kurth, T., Meißner, S., Standke, A., Hoppe, M., Zieschang, F., Reitmayer, C., Göbel, A., Kretzschmar, G., Gutzeit, H. O., 2012. The social status of the male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) influences testis structure and gene expression. Reproduction. 143, 71-84.

Pike, N., 2011. Using false discovery rates for multiple comparisons in ecology and evolution. Methods. Ecol. Evol. 2, 278–282.

Pinto, A., Oates, J., Grutter, A., Bshary, R., 2011. Cleaner wrasses Labroides dimidiatus are more cooperative in the presence of an audience. Curr. Biol. 21, 1140–1144.

Potts, A. 2012. 1. From T. rex to Transylvanian Naked Necks. In Chicken (pp 7). London: Reaktion Books.

Pradhan, D. S., Solomon-Lane, T. K., Willis, M. C., Grober, M. S., 2014. A mechanism for rapid neurosteroidal regulation of parenting behaviour. Proc. R. Soc. Lond. [Biol]. 281, 239.

Praporski, S., Ng, S. M., Nguyen, A. D., Corbin, C. J., Mechler, A., Zheng, J., Conley, A.J., Martin, L. L., 2009. Organization of Cytochrome P450 Enzymes Involved in Sex Steroid Synthesis PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS IN LIPID MEMBRANES. J. Biol. Chem. 284, 33224-33232.

Quiring, D.P., 1994. Transplantation of testes (por A. A. Bethold). Bull. Hist. Med. 16, 399–401.

Rakic, P., 1990. Principles of neural cell migration. Experientia. 46, 882–891.

Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.H., Moorman, A.F., 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. Neurosci. Lett. 339, 62-6.

Ramallo, M. R., Grober, M., Cánepa, M. M., Morandini, L., Pandolfi, M., 2012. Arginine-vasotocin expression and participation in reproduction and social behavior in males of the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. Gen. Comp. Endocrinol. 179, 221-231.

Reisz, R.R., Müller, J., 2004. Molecular timescales and the fossil record: a paleontological perspective. Trends. Genet. 20, 237-41. Erratum in: Trends Genet. 2005, 21, 36.

Remage-Healey, L., Maidment, N.T., Schlinger, B.A., 2008. Forebrain steroid levels fluctuate rapidly during social interactions. Nat. Neurosci. 11, 1327–1334.

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. Horm. Behav. 61, 496–503.

Rey Vázquez, G., Da Cuña, R.H., Meijide, F.J., Guerrero, G.A., 2012. Spermatogenesis and changes in testicular structure during the reproductive cycle in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). Acta Zool. (Stockholm) 93, 338–350.

Reynolds, J. D., Goodwin, N. B., Freckleton, R. P., 2002. Evolutionary transitions in parental care and live bearing in vertebrates. Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. 357, 269-281.

Rogers, W., 1988. Parental investment and division of labor in the Midas Cichlid (*Cichlasoma citrinellum*). Ethology 79, 126–142.

Romeo, R. D., 2003. Puberty: a period of both organizational and activational effects of steroid hormones on neurobehavioural development. J. Neuroendocrinol. 15, 1185-1192.

Roselli, C. E., Larkin, K., Resko, J. A., Stellflug, J. N., Stormshak, F., 2004. The volume of a sexually dimorphic nucleus in the ovine medial preoptic area/anterior hypothalamus varies with sexual partner preference. Endocrinology. 145, 478-483.

Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J., Moorman, A.F., 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. Nucleic Acids Res. 37:e45.

Saaristo, M., Craft, J. A., Lehtonen, K. K., Lindström, K., 2010. Exposure to  $17\alpha$ -ethinyl estradiol impairs courtship and aggressive behaviour of male sand gobies (*Pomatoschistus minutus*). Chemosphere, 79, 541-546.

Santangelo, N., 2015. Female breeding experience affects parental care strategies of both parents in a monogamous cichlid fish. Animal Behav. 104, 31-37.

Santen, R. J., Brodie, H., Simpson, E. R., Siiteri, P. K., Brodie, A., 2009. History of aromatase: saga of an important biological mediator and therapeutic target. Endocr. Rev. 30, 343-375.

Sapolsky, R.M., 2005. The influence of social hierarchy on primate health. Science 308, 648–652.

Schlinger, B.A., Callard, G.V., 1990. Aromatization mediates aggressive behavior in quail. Gen. Comp. Endocrinol. 79, 39–53.

Schulz, R. W., Miura, T., 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. Fish. Physiol. Biochem. 26, 43-56.

Scott, A.P., MacKenzie, D.S., Stacey, N.E., 1984. Endocrine changes during natural spawning in the white sucker *Catostomus commersoni*. II. Steroid hormones. Gen. Comp. Endocrinol. 56, 349–359.

Selmanoff, M. K., Goldman, B. D., Ginsburg, B. E., 1977. Serum testosterone, agonistic behavior, and dominance in inbred strains of mice. Horm. Behav. 8, 107-119.

Seredynski, A. L., Balthazart, J., Ball, G. F., Cornil, C. A., 2015. Estrogen Receptor  $\beta$  Activation Rapidly Modulates Male Sexual Motivation through the Transactivation of Metabotropic Glutamate Receptor 1a. J. Neurosci. 35, 13110-13123.

Sessa, A.K., Harris, R.M., Hofmann, H.A., 2013. Sex steroid hormones modulate responses to social challenge and opportunity in males of the monogamous convict cichlid, *Amatitliana nigrofasciata*. Gen. Comp. Endocrinol. 189, 59–65.

Sherman, G.D., Lee, J.J., Cuddy, A.J., Renshon, J., Oveis, C., Gross, J.J., Lerner, J.S., 2012. Leadership is associated with lower levels of stress. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109, 17903–17907.

Shibuya, K., Takata, N., Hojo, Y., Furukawa, A., Yasumatsu, N., Kimoto, T., Enami, T., Suzuki, K., Tanabe, N., Ishii, H., Mukai, H., Takahashi, T., Hattori, T., Mukai, H. (2003). Hippocampal cytochrome P450s synthesize brain neurosteroids which are paracrine neuromodulators of synaptic signal transduction. Biochim. Biophys. Acta. 1619, 301-316.

Simões, J. M., Barata, E. N., Harris, R. M., O'Connell, L. A., Hofmann, H. A., Oliveira, R. F., 2015. Social odors conveying dominance and reproductive information induce rapid physiological and neuromolecular changes in a cichlid fish. BMC genomics. 16, 1.

Simões, J. M., Teles, M. C., Oliveira, R. F., Van der Linden, A., Verhoye, M., 2012. A threedimensional stereotaxic MRI brain atlas of the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. PloS One. 7, e44086.

Simon, N.G., 2002. Hormonal processes in the development and expression of aggressive behavior. En: Pfaff, D.W., Arnold, A.P., Etgen, A.M., Fahrbach, S.E., Rubin, R.T. (Eds.), Hormones, Brain, and Behavior. Academic Press, New York, pp. 339–392.

Simpson, E. R., 2004. Aromatase: biologic relevance of tissue-specific expression. En Seminars in reproductive medicine (Vol. 22, No. 01, pp. 11-23). Copyright© 2004 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA.

Simpson, E. R., Clyne, C., Rubin, G., Boon, W. C., Robertson, K., Britt, K., Speed, C., Jones, M., 2002. Aromatase-a brief overview. Annu. Rev. Physiol. 64, 93-127.

Simpson, E. R., Mahendroo, M. S., Means, G. D., Kilgore, M. W., Hinshelwood, M. M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fsiher, C.R., Dodson, M.M., Mendelson, C. R., 1994. Aromatase Cytochrome P450, The Enzyme Responsible for Estrogen Biosynthesis\*. Endocr. Rev. 15, 342-355.

Sirkin, D. P., Suzuki, H., Cánepa, M. M., Vissio, P. G., 2013. Orexin and neuropeptide Y: tissue specific expression and immunoreactivity in the hypothalamus and preoptic area of the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. Tissue Cell. 45, 452-459.

Sisk, C. L., Zehr, J. L., 2005. Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior. Front. Neuroendocrinol. 26, 163-174.

Sloman, K.A., Armstrong, J.D., 2002. Physiological effects of dominance hierarchies: laboratory artefacts or natural phenomena? J. Fish Biol. 61, 1–23.

Smith, C. J., Haley, S. R., 1988. Steroid profiles of the female tilapia, *Oreochromis mossambicus*, and correlation with oocyte growth and mouthbrooding behavior. Gen. Comp. Endocrinol. 69, 88-98.

Smith, C., 1993. The costs of parental care in teleost fishes. Tesis doctoral, Univ. Wales. 174.

Snekser, J.L., Itzkowitz, M., 2009. Sex differences in retrieval behavior by the biparental convict cichlid. Ethol. 115, 457–464.

Soma, K.K., 2006. Testosterone and aggression: Berthold, birds and beyond. J. Neuroendocrinol. 18, 543–551.

Soma, K.K., Sullivan, K.A., Tramontin, A.D., Saldanha, C.J., Schlinger, B.A., Wingfield, J.C., 2000a. Acute and chronic effects of an aromatase inhibitor on territorial aggression in breeding and nonbreeding male song sparrows. J. Comp. Physiol. A. 186, 759–769.

Soma, K.K., Tramontin, A.D., Wingfield, J.C., 2000b. Oestrogen regulates male aggression in the non-breeding season. Proc. Biol. Sci. 267, 1089–1096.

Soma, K.K., Wingfield, J.C., 1999. Endocrinology of aggression in the nonbreeding season. En: Adams N, Slotow R, eds. Twenty-Second International Ornithological Congress. Durban: University of Natal. 1606–1620.

Soma, K.K., Wissman, A.M., Brenowitz, E.A., Wingfield, J. C., 2002. Dehydroepiandrosterone (DHEA) increases territorial song and the size of an associated brain region in a male songbird. Horm. Behav. 41, 203-212.

Specker, J.L. and Kishida, M., 2000. Mouthbrooding in the black-chinned tilapia, *Sarotherodon melanotheron* (Pisces: Cichlidae): the presence of eggs reduces androgen and estradiol levels during paternal and maternal parental behavior. Horm. Behav. 38, 44-51.

Starling, E.H., 1905. The Croonian Lectures. I. On the chemical correlation of the functions of the body. Lancet 166: 339–341

Stevenson, J.A., Yoon, M.G., 1982. Morphology of radial glia, ependymal cells, and periventricular neurons in the optic tectum of goldfish (*Carassius auratus*). J. Comp. Neurol., 205, 128–138.

Strobl-Mazzulla, P.H., Moncaut, N.P., López, G.C., Miranda, L.A., Canario, A.V., Somoza, G.M., 2005. Brain aromatase from pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis*): cDNA cloning, tissue expression, and immunohistochemical localization. Gen. Comp. Endocrinol. 143, 21-32.

Strobl-Mazzulla, P.H., Núñez, A., Pellegrini, E., Gueguen, M.M., Kah, O., Somoza, G.M., 2010. Progenitor radial cells and neurogenesis in pejerrey fish forebrain. Brain Behav. Evol. 76, 20-31.

Svare, B., 1983. Hormones and Aggressive Behavior. Plenum, New York.

Tacon, P., Baroiller, J. F., Le Bail, P. Y., Prunet, P., Jalabert, B., 2000. Effect of egg deprivation on sex steroids, gonadotropin, prolactin, and growth hormone profiles during the reproductive cycle of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. Gen. Comp. Endocrinol. 117, 54-65.

Tacon, P., Ndiaye, P., Cauty, C., Le Menn, F., & Jalabert, B., 1996. Relationships between the expression of maternal behaviour and ovarian development in the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. Aquaculture. 146, 261-275.

Takeuchi, A., Okubo, K., 2013. Post-proliferative immature radial glial cells female-specifically express aromatase in the medaka optic tectum. PloS One. 8, e73663.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28(10), 2731-2739.

Tanabe, Y., Nakamura, T., Fujioka, K., Doi, O., 1979. Production and secretion of sex steroid hormones by the testes, the ovary, and the adrenal glands of embryonic and young chickens (*Gallus domesticus*). Gen. Comp. Endocrinol. 39, 26-33.

Tata, J. R., 1976. The expression of the vitellogenin gene. Review. Cell, 9, 1-14.

Taves, M.D., Desjardins, J.K., Mishra, S., Balshine, S., 2009. Androgens and dominance: sexspecific patterns in a highly social fish (*Neolamprologus pulcher*). Gen. Comp. Endocrinol. 161, 202–207.

Teresa, F.B., Goncalves-de-Freitas, E., 2011. Reproductive behavior and parental roles of the cichlid fish *Laetacara araguaiae*. Neotrop. Ichthyol. 9, 355–362.

Tiefer, L., 1970. Gonadal hormones and mating behavior in the adult golden hamster. Horm. Behav., 189–202.

Timmers, R. J. M., Lambert, J. G. D., Peute, J., Van Oordt, P. G. W. J., Vullings, H. G. B., 1987. Localization of aromatase in the brain of the male African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by microdissection and biochemical identification. J. Comp. Neurol. 258, 368-377.

Timms, A.M., Keenleyside, M.H.A., 1975. The reproductive behaviour of *Aequidens* paraguayensis (Pisces, Cichlidae). Z. Tierpsychol. 39, 8–23.

Tong, S.K., Mouriec, K., Kuo, M.W., Pellegrini, E., Gueguen, M.M., Brion, F., Kah, O., Chung, B.C., 2009. A cyp19a1b-GFP (Aromatase B) transgenic zebrafish line that expresses GFP in radial glial cells. Genesis. 47, 67-73

Trainor, B. C., Bird, I. M., Alday, N. A., Schlinger, B. A., Marler, C. A., 2003. Variation in aromatase activity in the medial preoptic area and plasma progesterone is associated with the onset of paternal behavior. Neuroendocrinology. 78, 36-44.

Trainor, B.C., Finy, M.S., Nelson, R.J., 2008. Rapid effects of estradiol on male aggression depend on photoperiod in reproductively non-responsive mice. Horm. Behav. 53, 192–199.

Trivers, R.L., 1974. Parent–offspring conflict. Am. Zool. 14, 249–264.

Tsutsui, K., 2011. Neurosteroid biosynthesis and function in the brain of domestic birds. Front. Endocrinol. 2, 37.

Tsutsui, K., 2016. How to contribute to the progress of neuroendocrinology: new insights from discovering novel neuropeptides and neurosteroids regulating pituitary and brain functions. Gen. Comp. Endocrinol. 227, 3-15.

Tubert, C., Nostro, F. L., Villafañe, V., Pandolfi, M., 2012. Aggressive behavior and reproductive physiology in females of the social cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. Physiol. Behav. 106, 193-200.

Tudorache, C., Schaaf, M.J., Slabbekoorn, H., 2013. Covariation between behaviour and physiology indicators of coping style in zebrafish (*Danio rerio*). J. Endocrinol. 219, 251–258.

Tzchori, I., Degani, G., Hurvitz, A., Moav, B., 2004. Cloning and developmental expression of the cytochrome P450 aromatase gene (CYP19) in the European eel (*Anguilla anguilla*), Gen. Comp. Endocrinol. 138: 271–280.

Ubuka, T., Haraguchi, S., Tobari, Y., Narihiro, M., Ishikawa, K., Hayashi, T., Harada, N., Tsutsui, K., 2014. Hypothalamic inhibition of socio-sexual behaviour by increasing neuroestrogen synthesis. Nat. Commun. 5, 3061.

Vara Donado J. (1990) Historia de los animales (por Aristóteles). p 552 Akal Madrid.

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

Walker DL, Toufexis DJ, Davis M. Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. Eur J Pharmacol. 2003;463(1–3):199–216.

Wang, C., Wang, J., Li, M., Miao, L., Zhao, L., Chen, J., 2014. The genomic structure and expression patterns of cyp19a1a and cyp19a1b genes in the ayu *Plecoglossus altivelis*. Turk. J. Fish. Aquat. Sc. 14, 785-793.

Wang, J., Liu, X., Wang, H., Wu, T., Hu, X., Qin, F., Wang, Z., 2010. Expression of two cytochrome P450 aromatase genes is regulated by endocrine disrupting chemicals in rare minnow *Gobiocypris rarus* juveniles. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 152, 313-320.

Wass, M.N., Kelley, L.A., Sternberg. M.J., 2010. 3DLigandSite: predicting ligand-binding sites using similar structures. NAR 38 Suppl:W469-73.

Watterson, G.A., 1983. On the time for gene silencing at duplicate Loci. Genetics. 105:745–66.

Wazlavek, B. E., Figler, M. H., 1989. Territorial prior residence, size asymmetry, and escalation of aggression in convict cichlids (*Cichlasoma nigrofasciatum* Günther). Aggress. Behav. 15, 235-244.

Weiss, S.L., Moore, M.C., 2004. Activation of aggressive behavior by progesterone and testosterone in male tree lizards, *Urosaurus ornatus*. Gen. Comp. Endocrinol. 136, 282–288.

Werck-Reichhart, D., Feyereisen, R., 2000. Cytochromes P450: a success story. Genome biology. 1, 1.

White-Traut, R., Watanabe, K., Pournajafi-Nazarloo, H., Schwertz, D., Bell, A., & Carter, C. S., 2009. Detection of salivary oxytocin levels in lactating women. Dev. Psychobiol. 51, 367-373.

Williams, T.D., 2008. Individual variation in endocrine systems: moving beyond the 'tyranny of the Golden Mean'. Phil. Trans. R. Soc. B. 363, 1687–1698.

Wingfield, J. C., Ball, G. F., Dufty, A. M., Hegner, R. E., Ramenofsky, M., 1987. Testosterone and aggression in birds. American Scientist. 75, 602-608.

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

Wingfield, J.C., 1994. Regulation of territorial behavior in the sedentary song sparrow, *Melospiza melodia morphna*. Horm. Behav. 28: 1–15.

Wong, M., Balshine, S., 2011. The evolution of cooperative breeding in the African cichlid fish, Neolamprologus pulcher. Biol. Rev. 86, 511–530.

Yen, F.P., Lee, Y.H., He, C.L., Huang, J.D., Sun, L.T., Dufour, S., Chang, C.F., 2002. Estradiol- $17\beta$  triggers luteinizing hormone release in the protandrous black porgy (*Acanthopagrus schlegeli*, Bleeker) through multiple interactions with gonadotropin-releasing hormone control. Biol. Reprod. 66, 251-257.

Yen, S. S., Jaffe, R. B., Barbieri, R. L., 2001. Endocrinología de la reproducción: fisiología, fisiopatología y manejo clínico. Ed. Médica Panamericana.

Young III, W. S., Shepard, E., Amico, J., Hennighausen, L., Wagner, K. U., LaMarca, M. E., McKinney, C., Ginns, E. I., 1996. Deficiency in mouse oxytocin prevents milk ejection, but not fertility or parturition. J. Neuroendocrinol. 8, 847-853.

Zhang, S., Zhang, Y., Chen, W., Wu, Y., Ge, W., Zhang, L., Zhang, W., 2014. Aromatase (Cyp19a1b) in the pituitary is dynamically involved in the upregulation of lhb but not fshb in the vitellogenic female ricefield eel *Monopterus albus*. Endocrinology. 155, 4531-41.

Zhang, Y., Zhang, S., Zhou, W., Ye, X., Ge, W., Cheng, C.H., Lin, H., Zhang, W., Zhang, L., 2012. Androgen rather than estrogen up-regulates brain-type cytochrome P450 aromatase (*cyp19a1b*) gene via tissue-specific promoters in the hermaphrodite teleost ricefield eel *Monopterus albus*. Mol. Cell Endocrinol.350(1), 125-35.

Zhang, Y., Zhang, W., Yang, H., Zhou, W., Hu, C., Zhang, L., 2008. Two cytochrome P450 aromatase genes in the hermaphrodite ricefield eel *Monopterus albus*: mRNA expression during ovarian development and sex change. J. Endocrinol. 199, 317-331.

Zondek, B. (1934). Mass excretion of oestrogenic hormone in the urine of the stallion. Nature. 133, 209-210.

Zuber, M.X., John, M.E., Okamura, T., Simpson, E.R., Waterman, M.R., 1986. Bovine adrenocortical cytochrome P-450<sub>17 $\alpha$ </sub>, regulation of gene expression by ACTH and elucidation of primary sequence. J. Biol. Chem. 261, 2475-2482.

Zumpe, D., Bonsall, R.W., Michael, R.P., 1993. Effects of the nonsteroidal aromatase inhibitor, fadrozole, on the sexual behavior of male cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). Horm. Behav. 27, 200–215.

Zupanc, G. K. H., 2006. Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain. J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol. 192, 649-670.