



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental**

# **“Reconocimiento social y memoria de largo término en el pez cebra, *Danio rerio*”**

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

**Lic. Luciano Cavallino**

Directora de tesis: Dra Maria Eugenia Pedreira

Directora adjunta: Dra Maria Florencia Scaia

Consejero de Estudios: Dr Arturo Romano

Fecha de defensa: 13/07/2023

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

Buenos Aires, 2023

## **Resumen**

En un encuentro agonístico, los despliegues agresivos pueden demandar un gran gasto energético y provocar lesiones que pueden resultar en la muerte de los contendientes. En muchos casos los oponentes tienen distintas estrategias para resolver dichos conflictos con menores niveles de agresividad evitando estos costos. En esta tesis se planteó evaluar cómo la experiencia previa puede afectar la dinámica y resolución de conflictos sucesivos entre individuos de pez cebra, y el papel de la formación de memoria de largo término asociada a dichas interacciones sociales, caracterizando en experimentos comportamentales y farmacológicos los mecanismos involucrados, así como también a nivel neuroanatómico la activación de distintos núcleos cerebrales. Para ello se llevaron a cabo encuentros diádicos entre parejas de machos de pez cebra, *Danio rerio*, repitiendo el oponente a las 24 horas, o presentando un oponente novedoso. Además, se realizaron distintos intervalos entre peleas para evaluar la duración del efecto (48 y 72 horas) y se evaluó el efecto del tratamiento con un antagonista de receptores glutamatérgicos NMDA (MK-801), involucrados en la formación de memoria de largo término, sobre los cambios comportamentales observados. También se evaluó el efecto de la experiencia previa en encuentros entre hembras. Se observó que los machos resuelven los encuentros sucesivos con menores niveles de agresividad únicamente cuando se repite el oponente, pero no así contra un oponente novedoso, efecto que se mantiene hasta con 72 horas de intervalo entre encuentros. Este efecto es prevenido si se inhibe la formación de memoria de largo término inmediatamente después del primer encuentro. En hembras, al igual que en machos, el segundo encuentro se resuelve con menores niveles de agresividad. Al evaluar la activación de distintos núcleos cerebrales mediante la cuantificación de la proteína C-fos por técnicas inmunohistoquímicas, se observó una activación mayor en el núcleo ventral telencefálico (Vv) en individuos con interacción social previa que en controles sin encuentro agonístico. Una tendencia similar se observó en el núcleo dorsal del área ventral telencefálica (Vd) y en el núcleo medial dorsal (Dm). Por otro lado, el núcleo dorsal lateral (Dl) presentó mayor actividad en individuos previamente tratados con MK-801 que en el control, o que en peces con interacción social pero tratados con agua. En esta tesis presentamos evidencias en el pez cebra sobre la modulación comportamental en encuentros sucesivos, producto de la experiencia previa, el papel de los receptores NMDA en la formación de este tipo de memorias, y sus posibles correlatos neuroanatómicos.

# “Social recognition and long term memory in zebrafish, *Danio rerio*”

## Abstract

In an agonistic encounter, aggressive behaviors can be energy-intensive and lead to injuries that can result in the death of contenders. In many cases opponents have different strategies to resolve these conflicts with lower levels of aggressiveness avoiding these costs. In this thesis it was proposed to evaluate how previous experience can affect the dynamics and resolution of successive conflicts between individuals of zebrafish, and the role of long-term memory formation associated with such social interactions, characterizing in behavioral and pharmacological experiments the mechanisms involved, as well as at the neuroanatomical level the activation of different brain nuclei. For this, dyadic encounters were carried out between pairs of male zebrafish, *Danio rerio*, repeating the opponent at 24 hours, or presenting a novel opponent. In addition, different intervals between fights (48 and 72 hours) were performed and the effect of blocking NMDA receptors (MK-801), involved in the formation of long-term memory, on the behavioral changes was evaluated. The effect of previous experience on encounters between females was also evaluated. It was observed that males resolve successive encounters with lower levels of aggressiveness only when the opponent is repeated, but not against a novel opponent, an effect that is maintained up to 72 hours of the interval between encounters. This effect is prevented if long-term memory formation is inhibited immediately after the first encounter. In females, the same effect was observed as in males, resolving the second conflict with lower levels of aggressiveness. When evaluating brain activation by quantification of the C-fos protein by immunohistochemical techniques, greater activation in the ventral telencephalic nucleus (Vv) was observed in individuals with previous social interaction than in controls without interaction. A similar trend was observed in the dorsal nucleus of the ventral telencephalic area (Vd) and in the medial dorsal nucleus (Dm). On the other hand, the lateral dorsal nucleus (Dl) showed greater activity in individuals previously treated with MK-801 than in the control, or in fish with social interaction, but treated with water. In this thesis we present evidence in zebrafish on behavioral modulation in successive encounters, due to prior experience, the role of NMDA receptors in the formation of this type of memories, and its possible neuroanatomic correlates.

# **Contenido**

CAPÍTULO 1.....	13
Introducción .....	13
1.1 Comportamiento animal .....	14
1.2 Comportamientos agonísticos .....	16
1.3 Aprendizaje y memoria .....	19
1.4 Rol del sistema glutamatérgico .....	26
1.5 Genes de expresión temprana y actividad neuronal .....	29
1.6 Estructuras cerebrales en mamíferos y homologías en peces teleósteos.....	32
1.7 Resolución de un encuentro agonístico y efecto ganador/perdedor .....	36
1.8 Pez cebra, nuestro modelo experimental.....	38
1.9 Hipótesis y objetivos .....	41
CAPÍTULO 2.....	43
Experiencia previa y efecto del oponente .....	43
2.1 Introducción.....	44
2.2 Materiales y métodos.....	46
2.2.1 Individuos y mantenimiento .....	46
2.2.2 Testeo de la experiencia previa contra el mismo oponente .....	47
2.2.3 Evaluación de la experiencia previa con un oponente novedoso.....	49
2.2.4 Análisis comportamental .....	50

2.2.5 Análisis estadístico.....	52
2.3 Resultados .....	53
2.3.1 Variables morfológicas .....	53
2.3.2 ¿Afecta la experiencia previa a la dinámica de encuentros sucesivos? .....	53
2.3.2.1 Latencia .....	53
2.3.2.2 Duración de la agresividad .....	54
2.3.2.3 Mordidas.....	55
2.3.3 El cambio en la dinámica del encuentro ¿se debe solo a la pelea previa o al oponente en particular? .....	56
2.3.3.1 Latencia .....	57
2.3.3.2 Duración de la agresividad .....	58
2.3.3.3 Mordidas.....	58
2.4 Conclusión.....	60
CAPÍTULO 3.....	61
Duración del efecto de la experiencia previa sobre los comportamientos en encuentros sucesivos .....	61
3.1 Introducción.....	62
3.2 Materiales y métodos.....	63
3.2.1 Animales y mantenimiento .....	63
3.2.2 Protocolo experimental .....	63
3.2.3 Análisis estadístico.....	64

3.3 Resultados .....	65
3.3.1 Variables morfológicas .....	65
3.3.2 Efecto de 48 y 72 horas de intervalo entre encuentros agonísticos .....	65
3.4 Conclusión.....	69
CAPÍTULO 4.....	70
Inhibición de la formación de memoria de largo término.....	70
4.1 Introducción.....	71
4.2 Materiales y métodos.....	72
4.2.1 Animales y mantenimiento .....	72
4.2.2 Protocolo experimental .....	73
4.2.3 Tratamiento con MK-801 .....	75
4.2.4 Análisis estadístico.....	75
4.3 Resultados .....	76
4.3.1 Variables morfológicas .....	76
4.3.2 Efecto de bloquear los receptores NMDA sobre la formación de memoria de largo término .....	76
4.3.2.1 Tratamiento 15 minutos de MK-801 .....	76
4.3.2.2 Tratamiento 60 minutos MK-801 con 24 horas de intervalo entre encuentros .....	79
4.3.2.3 Efecto del tratamiento por 60 minutos con MK-801 en encuentros de 48 horas de intervalo .....	82
4.4 Conclusión.....	85

CAPÍTULO 5.....	86
Patrones de activación cerebral.....	86
5.1 Introducción.....	87
5.2 Materiales y métodos.....	92
5.2.1 Tratamientos analizados.....	92
5.2.2 Inmunohistoquímica de C-fos.....	93
5.2.3 Análisis de imágenes.....	94
5.2.4 Análisis de datos .....	96
5.3 Resultados .....	96
5.3.5 Ganadores versus perdedores.....	98
5.3.1 Núcleo ventral del área ventral telencefálica (Vv) .....	99
5.3.2 Núcleo dorsal del área ventral telencefálica (Vd).....	100
5.3.3 Núcleo medial del área dorsal telencefálica (Dm).....	101
5.3.4 Núcleo lateral del área dorsal telencefálica (Dl).....	103
5.4 Conclusión.....	104
CAPÍTULO 6.....	106
Agresividad en hembras y estado reproductivo .....	106
6.1 Introducción.....	107
6.2 Materiales y métodos.....	109
6.2.1 Individuos y mantenimiento .....	109
6.2.2 Protocolo experimental .....	109

6.2.3 Análisis estadístico.....	110
6.3 Resultados .....	110
6.3.1 Variables morfológicas .....	110
6.3.2 Duración de la agresividad.....	111
6.4 Conclusión.....	112
7. Discusión final .....	113
Conclusiones finales.....	132
8. Material suplementario .....	134
8.1 Puesta a punto inmunohistoquímica.....	134
8.2 Ethovision.....	134
8.3 Paquetes estadísticos utilizados.....	139
8.4 Supuestos.....	141
8.5 Análisis complementarios Wilcoxon.....	148
8.6 Redes de conectividad funcional .....	149
9. <i>Bibliografía</i> .....	155



Durante esta tesis han sido realizados los siguientes trabajos científicos:

Los resultados presentados en el capítulo 1 han sido publicados en el siguiente trabajo:

**.Cavallino, L.,** Dramis, A., Pedreira, M. E., & Pandolfi, M. (2020). Effect of previous fighting on the dynamic of agonistic encounters in zebrafish males. *Animal Cognition*, 23(5), 999-1006.

Los resultados de los capítulos 2 y 3 se desarrollan en el siguiente trabajo:

**.Cavallino, L.,** Scaia MF., Pozzi AG & Pedreira ME (2022). Recognizing the opponent: the consolidation of long-term social memory in zebrafish males. *Neurobiology of learning and memory*. En revisión.

Durante el desarrollo de esta tesis se llevaron a cabo otros trabajos científicos referidos a las bases neuroendocrinas del comportamiento social en teleósteos:

**.Cavallino, L.,** Rincon, L & Scaia MF. Social behavior as welfare indicators in teleost fish (2022). *Frontiers in veterinary science*. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 520.

.Pintos, S., **Cavallino, L.,** Yañez, A. V., Pandolfi, M., & Pozzi, A. G. (2021). Effects of intraspecific chemical cues on the behaviour of the bloodfin tetra *Aphyocharax anisitsi* (Ostariophysi: Characidae). *Behavioural Processes*, 104533.

.Scaia, M., **Cavallino, L.,** & Pandolfi, M. (2019). Social control of spermatogenesis and steroidogenesis in cichlid fish: a comparative approach. *Reproduction*, REP18-0650 <https://doi.org/10.1530/REP-18-0650>

**.Cavallino, L.,** Valchi, P., Morandini, L., & Pandolfi, M. (2019). Modulation of behavior in zebrafish, *Danio rerio*, according to female reproductive status and visual and chemical cues. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 52(1), 53-66.

## **Agradecimientos**

Me gustaría empezar agradeciendo a la UBA, al CONICET, al laboratorio de neuroendocrinología de peces y anfibios, y al laboratorio de neurociencias de la memoria por permitirme llevar a cabo esta tesis de doctorado. También al repositorio Sci-hub, ya que sin este sería imposible acceder a toda la bibliografía necesaria para realizar esta investigación. Agradecerle a todos los que me ayudaron a mantener a los peces durante la pandemia, momento en el que teníamos restringida la entrada a la facultad, el grupo de Fabi Lo Nostro, de Pau Vissio, ara, que alimentaron a los peces cuando yo no podía ingresar.

A Matias, ya que gracias a el entre en el laboratorio de neuroendocrinología y comportamiento, allá por el 2014. Mi decisión final de estudiar comportamiento animal fue gracias a un seminario que dio sobre ese tema, y después del cual me di cuenta que eso era lo que quería hacer. Luego de la tesis de licenciatura llego la de doctorado, también bajo su dirección. No solo tengo que agradecerle por ser la primer persona que me acompañó en mi formación como investigador, sino también por todo lo que aprendí en los años de doctorado que pudimos compartir. Me quedare siempre con el recuerdo de cuando llegaba y nos contaba algún dato interesante sobre comportamiento animal que había visto, recomendaciones de literatura y libros en general, la libertad de trabajo que siempre me dio y la confianza en lo que hacía. También por su guía en el desarrollo de los experimentos, y toda la ayuda que me brindo para poder llevarlos a cabo.

A Andrea ya que gracias a ella el laboratorio siguió su marcha, estuvo siempre atenta de que tengamos todos los elementos para poder continuar nuestras investigaciones, y dispuesta a ayudarnos con lo que pudiera. Se puso el laboratorio al hombro y gracias a eso pudimos continuar con todo, y también por su ayuda en las últimas etapas, para poder solucionar cuestiones burocráticas que entorpecieron el desarrollo de la tesis.

A flor, que desde el primer momento que le propusimos ser directora adjunta se volcó de lleno, aportando y trayendo el entusiasmo y la pasión por hacer ciencia de calidad que siempre la caracterizó. Me ayudó en el día a día, la puesta a punto de las técnicas, y la discusión de los experimentos. Compartimos horas y horas de audios discutiendo la mejor forma de hacer las cosas, que modificar, como seguir. Fue un gran apoyo durante todo el doctorado, y un privilegio haber podido trabajar con ella en proyectos conjuntos, siempre me impulsó a querer hacer mejor las cosas.

A Euge, que durante todo el doctorado estuvo presente y dispuesta a ayudarme, pero en particular al convertirse en mi directora se ocupó (y preocupó) de hacerme parte de su grupo, integrándome a los seminarios, las juntadas, estando atenta a todo lo que necesitaba. Me enseñó mucho sobre memoria, y me hizo sentir que todo iba a poder continuar su camino. Al igual que mati, me dio libertad para proponer cosas y llevar a cabo los experimentos, y me hizo sentir muy cómodo con el desarrollo de la tesis. Siempre valoro mis opiniones y me dio la oportunidad de crecer y llevar a cabo de la mejor manera esta tesis. Sin importar los tiempos, o las situaciones adversas, siempre estuvo ahí.

A todo el labo de Andre, lucas, ara, las chicas y chicos que entraron nuevos, por haber compartido esta etapa. A Lau, con quien compartimos laboratorio desde los primeros momentos y que siempre estuvo dispuesta a dar una mano, y colaborar con todos. A Chiara de quien tuve la suerte de asistir en la dirección de su tesis, una experiencia muy buena y enriquecedora, y un gusto haber trabajado con ella. A todos los que pasaron por el laboratorio durante los casi 10 años de los que forme parte, con los que además de una hermosa experiencia de trabajo, formamos un hermoso grupo, tincho, agus, pau, ale, lau, flor, santi y leo. A todo el grupo que conocí en el CBC. Agus, sofi, andrey, amigos que me fue dando la carrera y por suerte pude mantener a lo largo de los años. Mis amigos de toda la vida, Laucha

y Jenny, con quienes realmente compartimos todas las etapas de nuestra vida, nos conocemos desde jardín. A los chicos de futbol, a cólicos anónimos, mítico equipo de futbol que formamos con leo para jugar el torneo exactas.

A mi familia: mis padres, hermanos, abuelos, a mis primos y tíos, siempre fueron pilares fundamentales en mi vida, me ayudaron a convertirme en lo soy hoy, y a transitar con felicidad las distintas etapas de mi vida. A Lu, mi compañera durante todos estos años, con quien pasamos toda la pandemia encerrados, y una co-escritura de nuestras tesis en paralelo... Y todo fue excelente! no hay nadie más con quien hubiera pasado tan bien ambas etapas complicadas, y nadie más con quien me hubiera gustado compartir todos estos años, y los que quedan por delante.

Al igual que hice con mi tesis de licenciatura, me gustaría cerrar con la siguiente frase.

# **CAPÍTULO 1**

## **Introducción**

En esta tesis abordaremos temas de memoria asociada a comportamientos agresivos, particularmente cómo la experiencia previa puede modificar los despliegues comportamentales en encuentros sucesivos y cómo los mecanismos de formación de memoria de largo término están involucrados en dichos cambios. Evaluaremos también la activación cerebral en distintos núcleos cerebrales asociados a estos procesos. En este capítulo describiremos los conceptos básicos que enmarcan la hipótesis central y los objetivos propuestos.

## 1.1 Comportamiento animal

El estudio del comportamiento animal ha despertado la curiosidad de científicos, investigadores y observadores de la naturaleza a lo largo del tiempo, disparando preguntas como ¿Por qué este animal hace lo que hace? ¿Cómo lo hace? ¿Qué ventajas le puede traer hacerlo? entre otras. Estas preguntas sientan las bases del estudio del comportamiento, en el cual podemos identificar dos niveles de estudio 1) Las causas próximas: evaluando los procesos fisiológicos que determinan la existencia de los comportamientos y 2) Las causas últimas: orientadas a los procesos evolutivos que determinan la existencia de ellos. Además, podemos definir dos corrientes principales de estudio: La etología y la psicología experimental. Mientras los etólogos se basan en los comportamientos innatos de los animales en su hábitat natural, los psicólogos experimentales basan sus estudios en el análisis del comportamiento aprendido en un contexto de laboratorio (Shettleworth, 2001).

En esta tesis nos interesaran particularmente los comportamientos sociales, es decir, aquellos comportamientos que surgen de la interacción de dos o más individuos de la misma especie, como pueden ser los comportamientos de cortejo o los agonísticos. Dichas interacciones involucran una comunicación en la cual tendrán lugar distintos tipos de claves y señales, ya sean químicas, visuales, auditivas, mecánicas o eléctricas. Las características de la señal o clave emitidas dependerán de la intención y el estado del emisor, mientras que la respuesta frente a estas dependerá del estado del receptor, ya sea fisiológico o debido a la experiencia previa (Guilford y Dawkins, 1991). En este sentido será importante la forma en la que el individuo adquiera la información a través de sus sentidos, la procese, la retenga y decida como comportarse frente a esta, lo cual podemos enmarcar en lo que conocemos como

cognición animal, que abarca la percepción, el aprendizaje, la memoria y la toma de decisiones (Shettleworth, 2001).

En este marco, podemos mencionar la teoría de juegos, la cual es una metodología para analizar estrategias de toma de decisiones. Particularmente la teoría de juegos evolutiva asume “jugadores” cuyos comportamientos han sido modelados por selección natural para aumentar su fitness. Esta teoría predice que existirán dos factores que determinarán los costos y la duración de un encuentro agonístico: la disparidad que exista entre contendientes en cuanto a la probabilidad de ganar el encuentro; y el valor de la recompensa (Dugatkin y Reeve, 2000). Un modelo sencillo para evaluar un encuentro entre dos individuos es el llamado juego halcón-paloma. En este, un individuo puede adoptar una postura agresiva e ir escalando en los niveles de agresividad de sus comportamientos (halcón), o tomar una postura más pasiva, retirándose del enfrentamiento si los niveles de agresividad son altos (paloma). Si los dos individuos toman una postura de paloma, se dividen el recurso, o tendrán la mitad de probabilidad de llevárselo. Si un individuo toma una postura de halcón puede o llevarse todo el recurso (si su oponente se retira, es decir actúa como paloma), o si su oponente también toma una postura agresiva, no solo que cada uno tendrá la mitad de las posibilidades de llevarse el recurso, sino que al valor positivo que este provee se le restará el costo de ser lastimado (Smith 1986). Teniendo en cuenta estas evidencias podemos pensar que, si los oponentes pueden evaluarse, cambiarán su estrategia teniendo en cuenta los posibles costos/beneficios del encuentro agonístico.

## 1.2 Comportamientos agonísticos

Intuitivamente podemos pensar que cada vez que dos animales de la misma especie compiten por un recurso (pareja, territorio, comida, entre otros) y esta competencia los lleva a un enfrentamiento, la resolución se dé antes de la muerte de algún contrincante. Dicha predicción es confirmada por observaciones que demuestran que efectivamente muchas especies desarrollaron estrategias para resolver dichos conflictos con menores riesgos, ya sea evaluando al oponente y evitando el encuentro si el contrincante es de mayor tamaño o con mayor habilidad de pelea, o retirándose sin necesidad de llegar a despliegues más agresivos (Smith y Price, 1973; McElligott *et al.*, 1998).

Podemos definir a los comportamientos agonísticos como “los patrones comportamentales que tienen la función de adaptarse a situaciones que involucran un conflicto físico entre individuos de la misma especie” (Scott 1966). Se propone que este tipo de comportamientos se seleccionarán a lo largo de la evolución en aquellos casos en que sus beneficios, como generar un mayor éxito reproductivo, sean mayores a los costos. Con costos nos referimos a que este tipo de comportamientos, además de generar un gran gasto energético (Castro *et al* 2006), pueden resultar en severas lesiones de los individuos, llegando hasta la muerte (Georgiev *et al.*, 2013). En este sentido, algunos animales emiten vocalizaciones, en muchos casos relacionados al tamaño del individuo, y este despliegue vocal es suficiente para que un potencial oponente se aleje (Zahavi., 1982). Un ejemplo de esto es lo que pasa en los machos del ciervo colorado, donde los encuentros agonísticos comienzan con estas vocalizaciones (cuyo sonido estaría relacionado con el tamaño de la laringe, y el tamaño total) y, de no resolverse, continúan con caminatas en paralelo. Si en esta etapa ninguno de los oponentes se retira, el conflicto continúa con comportamientos más agresivos que involucran el contacto



entre ambos, como por ejemplo entrecruzar las cornamentas (Clutton-Brock y Albon, 1979). Algo similar ocurre en los peces *Nannacara anomala*, donde dos machos que compiten por una hembra van aumentando progresivamente los niveles de agresividad a lo largo del encuentro. Inicialmente los individuos cambian su coloración y se aproximan al rival con las aletas extendidas, seguido por un intenso periodo en el cual golpean y atacan la aleta caudal del oponente. Luego aparecen las primeras mordidas, que escalan en sujeciones boca a boca entre ambos y finalmente círculos, en donde ambos individuos intentan morderse describiendo movimientos circulares (Enquist *et al.*, 1990). Se observó que la longitud de la contienda depende de la asimetría de tamaño entre individuos. Individuos más parecidos entre sí presentaban encuentros más largos y más agresivos, mientras que oponentes asimétricos resolvían el conflicto más rápido y con menos agresividad, evidenciado por una relación negativa entre la asimetría de los contendientes y el índice de escalamiento agresivo (un mayor índice refleja un mayor escalamiento, es decir la aparición de mordidas y agarradas de boca) (Enquist y Leimar, 1990). Si bien históricamente se ha estudiado mayormente la agresividad en machos es importante remarcar que en muchas especies las hembras presentan los mismos comportamientos agresivos que los machos, con un desarrollo del encuentro con dinámicas similares (Been *et al.*, 2019; Scaia *et al.*, 2018, 2022)

En base a estos estudios podemos concluir que los oponentes pueden evaluar a su contrincante y modular su comportamiento como resultado de dicha evaluación. En este sentido, no sólo la evaluación puede ser beneficiosa, sino también el aprender de una experiencia previa y recordarla, para poder actuar en consecuencia en futuros encuentros. El aprendizaje y recuerdo de lo ocurrido durante un encuentro agonístico es un ejemplo más de que el aprendizaje y la memoria son elementos claves para la supervivencia y el desarrollo de los individuos.

En línea con esta idea, la teoría de decisión bayesiana nos plantea que los individuos pueden formar una representación acerca de un evento, teniendo en cuenta la información adquirida en ese momento y la representación previa que tengan sobre dicha situación, la cual puede provenir de una experiencia pasada. De esta manera el individuo puede combinar la experiencia previa con la nueva información obtenida, para tomar la mejor decisión posible (McNamara *et al.*, 2006). Cuando un encuentro agonístico comienza, los individuos deben tomar decisiones acerca de la estrategia que adoptaran y los comportamientos que van a desplegar, si persistirán con dichos comportamientos, se retiraran o escalaran en agresividad. Estos cambios comportamentales estarán determinados por la evaluación que realice el individuo, pudiendo ser una evaluación de su propio estado, del estado del oponente, del valor de la recompensa o el contexto social (Reichert y Quinn, 2017). Si bien en algunos casos la evaluación física del oponente puede ser suficiente para identificar sus capacidades, la información obtenida antes, durante y después del encuentro, y aprender de dichas experiencias serán factores determinantes en los cambios comportamentales a futuro (Reichert y Quinn, 2017).

### 1.3 Aprendizaje y memoria

Como para muchos otros conceptos en la Neurobiología de la memoria y el aprendizaje, podemos encontrar distintas definiciones de aprendizaje y memoria. Una de ellas nos dice que el aprendizaje es el proceso de adquisición de nueva información que produce un cambio en el comportamiento, y la memoria es la retención en el tiempo de la información adquirida a través del aprendizaje. Profundizando esta última definición, podemos pensar a la memoria como la representación interna de la información adquirida a través del aprendizaje, el cual se codifica en circuitos neuronales a través de modificaciones en la conectividad entre neuronas (Maldonado, 2008).

Los aprendizajes pueden clasificarse en función de la información adquirida en: aprendizajes no asociativos, los cuales resultan de la experiencia con un único tipo de estímulo como la habituación, un decrecimiento en la respuesta frente a la presentación repetida del estímulo, y la sensibilización, un incremento en la respuesta luego de la presentación del mismo; Por otro lado, el aprendizajes asociativos resulta de la conjunción de dos o más estímulos (Thompson, 1986). Un ejemplo de este tipo de aprendizaje es el condicionamiento clásico, en donde un individuo aprende a establecer una relación entre dos estímulos. Un estímulo, el incondicionado (EI), posee relevancia biológica y genera una respuesta en el individuo, mientras que el estímulo condicionado (EC), sin relevancia biológica no produce una respuesta. Sin embargo, la presentación repetida del EC seguido del EI, genera en el individuo una asociación entre los estímulos. Ahora la presentación del EC genera una respuesta condicionada, ya que este EC le permite predecir la llegada del estímulo incondicionado. Otro caso es el condicionamiento operante, en donde se establece la relación

entre realizar una tarea y recibir un refuerzo positivo (una recompensa), o evitar un refuerzo negativo.

Han sido descriptos otros tipos de aprendizajes más complejos, como el aprendizaje intuitivo (*insight*, en inglés) que es la resolución de una tarea por reorganización de la información sin experiencia previa; los aprendizajes abstractos como el relacional, en donde el animal aprende a ejecutar una tarea de acuerdo a una relación; la percepción de simetría, el reconocimiento de objeto novedoso, el aprendizaje de reglas, el aprendizaje espacial, entre otros (Carew, 2000).

Luego de un aprendizaje, algunos aspectos de este son codificados, lo cual inicia una serie de procesos conocidos como consolidación, que, con el tiempo, permitirán la formación de una traza de memoria permanente. A nivel celular, durante la adquisición, se da la activación mediada por neurotransmisores de enzimas asociadas a receptores, las cuales a través de segundos mensajeros activan quinasas que fosforilaran proteínas necesarias para la plasticidad neuronal. De esta manera, en una primera etapa de la formación de la memoria, podemos identificar una memoria de corto término, que puede durar desde minutos hasta algunas horas, y que no depende de la síntesis *de novo* de proteínas. Para que se dé la consolidación y se forme una memoria de largo término estable, debe ocurrir un refuerzo de las modificaciones ocurridas en las proteínas existentes, y una activación de ciertos genes reguladores relacionados con el mantenimiento de dichas memorias. Por lo tanto, podemos definir una memoria de largo término como el almacenamiento de la información de una manera estable y duradera y que es dependiente del proceso de consolidación. La consolidación involucra procesos de plasticidad neuronal a largo término, que a su vez son dependiente de la síntesis *de novo* de proteínas y de la síntesis de mensajeros (Goelet *et al.*, 1986; Nadel *et al.*, 2012). Sin embargo, no solo la síntesis de proteínas, sino también la

degradación de las mismas puede ser importante para los mecanismos de plasticidad sináptica, evidenciado por experimentos en los cuales se observó que la inhibición del proteasoma (encargado de la degradación proteica controlada) afectaba tanto a la potenciación como a la facilitación de largo término, dos de los mecanismos de plasticidad neuronal asociados a la formación de memoria de largo término (McGaugh, 2000; Jarome y Helmstetter, 2014). Cabe destacar que estas memorias una vez consolidadas pueden ser reactivadas, generando una nueva labilización seguido por un proceso de re-estabilización conocido como reconsolidación (Haubrich y Nader, 2018). La disrupción de este proceso afecta el guardado de la memoria reactivada observándose un efecto amnésico; pudiéndose además actualizar la memoria en fuerza y contenido (Nadel *et al.*, 2012).

Actualmente es aceptado que la memoria no sería un único proceso, sino que la podemos clasificar en memorias declarativas y no declarativas. Las memorias declarativas son aquellas que nos permiten de forma consciente adquirir y recolectar datos y eventos. Están involucradas en la concepción y modelado del mundo externo, y el almacenamiento de las representaciones acerca de distintos episodios permitiéndonos evocar hechos o eventos. (Milner *et al.*, 1998). Las memorias no declarativas por otro lado, subyacen a los cambios en las habilidades, y a la capacidad para responder de la mejor manera a un estímulo mediante la práctica, por ejemplo a través del condicionamiento, los cambios en la habilidad de detectar o identificar un objeto como resultado de un encuentro reciente, o las habilidades motoras, entre otras. Si bien los cambios celulares que subyacen a las memorias declarativas y no declarativas difieren entre sí, en ambos están involucrados mecanismos moleculares similares y cambios en la fuerza de conexión entre neuronas (Nicoll, 2017). Un resumen de las distintas clasificaciones de la memoria de largo término y las regiones cerebrales involucradas en mamíferos se puede ver en la figura 1

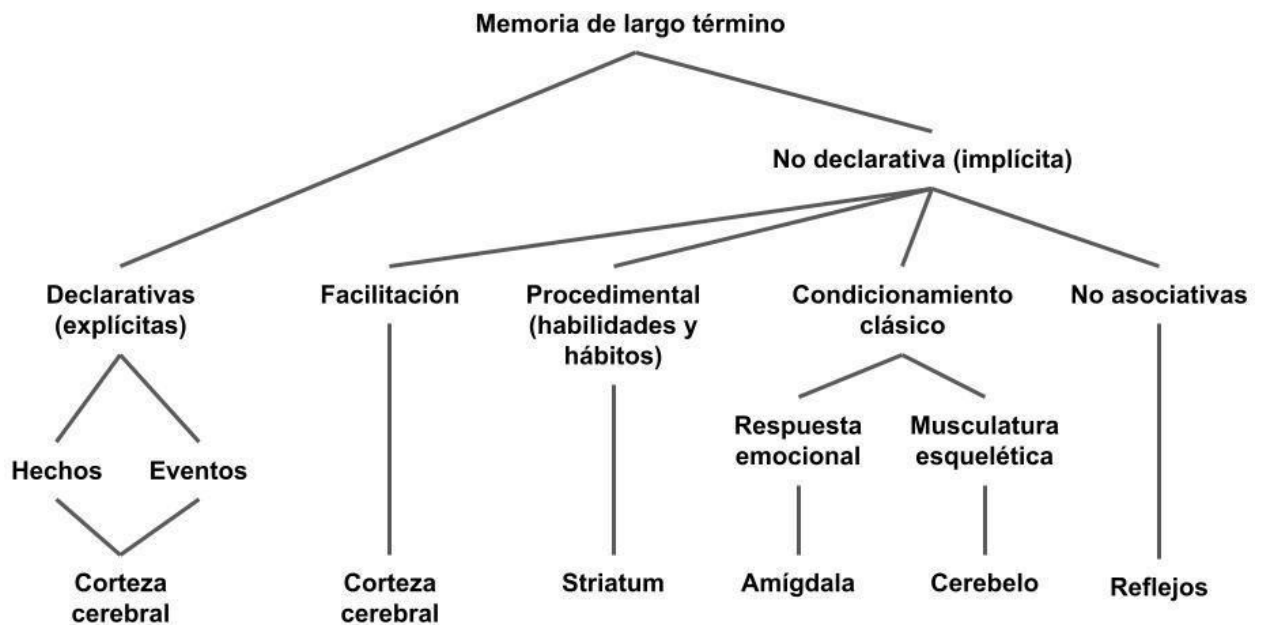


Figura 1. Taxonomía de la memoria de largo término y áreas cerebrales involucradas, en mamíferos. Adaptado de Dudai 2002.

Se observó en diversas especies que la memoria de largo término puede durar desde días hasta años, dependiendo de la especie y el tipo de aprendizaje adquirido. Por ejemplo, el pez paraíso puede recordar a su oponente 24 horas después del primer encuentro, pero no luego de una semana (Miklósi *et al.*, 1992), mientras que los delfines pueden recordar y responder a un llamado familiar 15 años más tarde (Bruck *et al.*, 2013).

Como mencionamos anteriormente, podemos distinguir entre memorias de corto y de largo término, que presentan diferentes características (Cowan, 2008). Las memorias de largo término (MLT) son aquellas en que el individuo puede evocar dicha memoria, por lo menos 24 horas después del aprendizaje. Dependen de la síntesis *de novo* de ARN y proteínas, como también de la degradación de estas últimas (McGaugh, 2000; Jarome y Helmstetter, 2014).

Sin embargo, estos cambios moleculares por si solos son insuficientes para explicar la formación y mantenimiento de memorias duraderas. Junto con estos cambios a nivel proteico tienen que existir cambios estructurales en la morfología de las sinapsis que permitan la plasticidad neuronal (Lamprecht y LeDoux, 2004). Mediante estudios de microscopia electrónica se encontraron las primeras evidencias de que la inducción de plasticidad sináptica podía afectar el tamaño y la forma de las espinas dendríticas (Van Harreveld y Fifkova, 1975). Experimentos posteriores demostraron una asociación entre el incremento de la fuerza de interacción sináptica y un alargamiento de las cabezas de las espinas dendríticas (Goelet *et al.*, 1986). En experimentos de condicionamiento clásico en conejos, se observó que los individuos condicionados presentaban una mayor formación de múltiples botones sinápticos que en individuos pseudo-condicionados o no estimulados (Geinisman *et al.*, 2001). En aves, el aprendizaje de canto por imitación llevaba a una rápida estabilización y alargamiento de las espinas dendríticas, relacionado a un aumento en la actividad sináptica (Roberts *et al.*, 2010) (Caroni *et al.*, 2012). En cuanto a los mecanismos moleculares de estabilización de la sinapsis y de la formación de la memoria, podemos destacar la actividad de los mecanismos de fosforilación. En particular la calcio calmodulina quinasa de tipo II (CaMKII) cuya actividad es necesaria para el alargamiento de las espinas, y la proteína quinasa c (PKC) que estaría involucrada en la estabilización de las espinas, evidenciado en experimentos de enriquecimiento ambiental, cuya actividad quinasa era necesaria para aumentar el aprendizaje en ratones (Bednarek y Caroni, 2011). Otros mecanismos involucran la regulación local de traducción proteica mediante MAPK (proteína quinasas activadas por mitógenos) y otras quinasas como PI3K, observándose que la inhibición *in vivo* de síntesis proteica desestabilizaba la sinapsis (Caroni *et al.*, 2012). Podemos mencionar también los caminos de señalización que controlan la actina del citoesqueleto de las espinas dendríticas como otro de los factores críticos para la plasticidad sináptica, evidenciándose mediante

experimentos en los que interferir con la polimerización de actina impedía la potenciación de largo término y la memoria (Cingolani y Goda, 2008). En un paradigma de condicionamiento contextual al miedo, ratones expuestos a un contexto asociado a un shock eléctrico mostraban altos niveles de *freezing* cuando eran reexpuestos al mismo contexto (sin shock eléctrico) 24 horas más tarde. Sin embargo, individuos a los que se les inyectaba una droga que induce la despolarización de los filamentos de actina mostraban un impedimento tanto en la reconsolidación como en la consolidación de la memoria, poniendo de manifiesto la importancia de esta vía en la formación de memoria de largo término (Medina *et al.*, 2020). Un resumen de los mecanismos mencionados se puede observar en la figura 2.



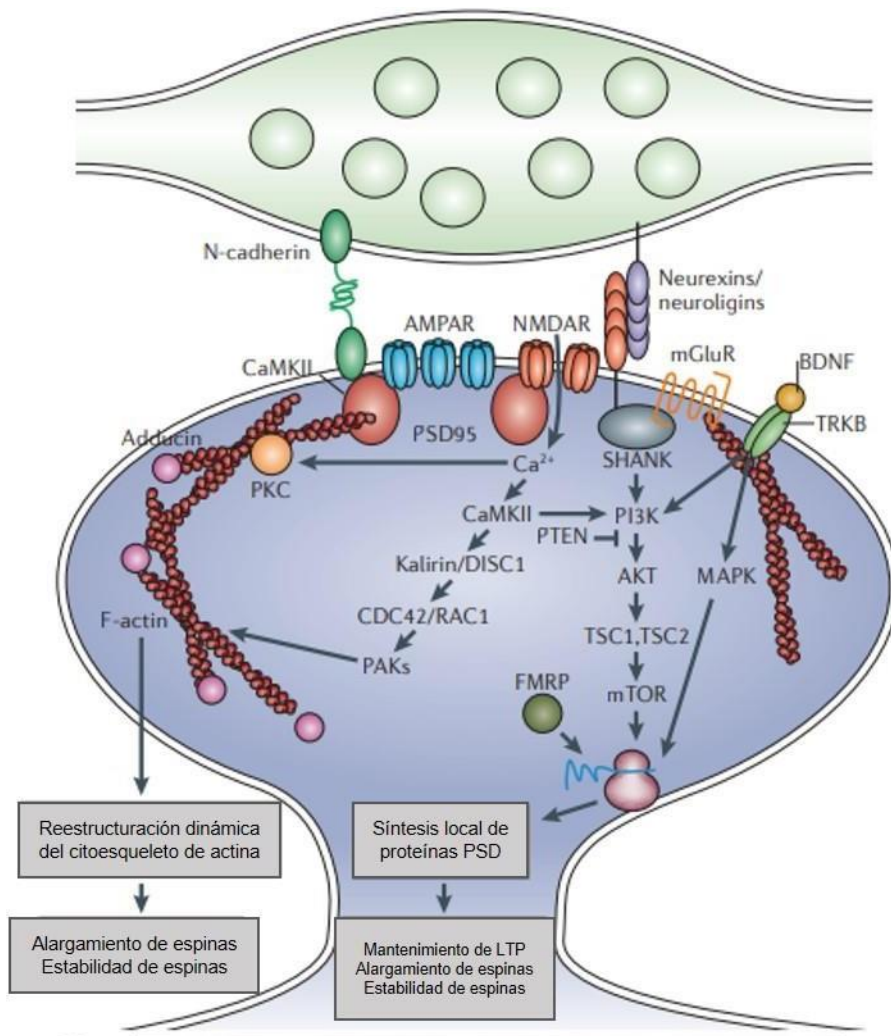


Figura 2. Esquema de los mecanismos moleculares que regulan la estabilización y alargamiento de las espinas dendríticas, manteniendo la potenciación de largo término. Se observan los mecanismos por los cuales el calcio que ingresa a través de los receptores NMDA actúa como segundo mensajero disparando procesos que generan la reestructuración de los filamentos de actina, la síntesis de proteínas de la densidad postsináptica (PSD), entre otras, lo que genera el alargamiento y estabilización de las espinas y el mantenimiento de la potenciación de largo término. Modificado de Caroni *et al* 2012.

Teniendo en cuenta que el glutamato es uno de los principales neurotransmisores excitatorios en el sistema nervioso, ha sido ampliamente estudiado el rol del sistema glutamatergico en la formación de memoria de largo término (Aigner, 1995). Siendo que en esta tesis utilizaremos un tratamiento con una droga que bloquea un receptor sensible a glutamato, a continuación describiremos el rol del sistema glutamatergico en la formación de memorias de largo término.

## 1.4 Rol del sistema glutamatérgico

Ya hemos mencionado distintos mecanismos moleculares por los cuales se da un alargamiento y estabilización de las espinas neuronales, ya sea mediante la síntesis proteica o la reestructuración de los filamentos de actina, lo que permitiría la plasticidad sináptica y la consolidación de la memoria. En este sentido ha sido descrito el rol central del sistema glutamatérgico en la formación de estas (Watkins y Jane, 2006). En la sinapsis, frente a un potencial de acción, las neuronas pre-sinápticas experimentan una despolarización que abre canales de calcio, lo cual genera que vesículas que contienen neurotransmisores, como por ejemplo el glutamato, se fusionen a la membrana celular liberando dichos neurotransmisores al espacio sináptico. El glutamato se une a receptores específicos en la membrana de la neurona post-sináptica. Estos receptores pueden ser metabotrópicos, en los cuales el receptor y el canal son proteínas distintas y están asociadas a proteína G, o bien pueden ser ionotrópicos, en donde el mismo polipéptido tiene una región que conforma el poro, y otra zona en la cual se unirá el neurotransmisor, generando un cambio conformacional. En cuanto a los receptores ionotrópicos activados por glutamato, podemos mencionar a los receptores AMPA y NMDA, que cumplen un papel fundamental en la consolidación de la memoria. Mientras que los receptores AMPA serían los responsables de la transmisión inmediata y transitoria, generando una breve despolarización, los receptores NMDA estarían involucrados en la plasticidad sináptica, mediante la potenciación de largo término (LTP), asociada a la formación de memoria de largo término (Nicoll, 2017). Las primeras evidencias de plasticidad sináptica surgen en la época de los años 60, reportándose por primera vez la LTP (Lømo, 2003). Recién en los años 80 se observó una correlación entre aprendizaje espacial y formación de memoria con la potenciación de largo término. En ratas expuestas a una tarea de aprendizaje espacial se encontró una correlación entre la magnitud de la LTP y el

desempeño al final del entrenamiento (Barnes, 1979). En otro experimento encontraron que ratas jóvenes retenían la información espacial y niveles significativos de LTP durante mucho más tiempo que ratas de edad avanzada (Barnes y McNaughton, 1985). En línea con estos resultados, se encontraron evidencias que bloquear la LTP mediante un antagonista de receptores NMDA o saturarla, impedía el aprendizaje espacial (Morris *et al.*, 1986; Castro *et al.*, 1989). Estudios posteriores demostraron que en un condicionamiento del miedo donde se establecía la relación entre un tono y un shock eléctrico, al medir la actividad en la amígdala lateral durante la presentación del tono, los potenciales evocados que se incrementaban durante el entrenamiento se mantenían luego de los mismos, pero disminuían durante la extinción del condicionamiento (Rogan *et al.*, 1997). Resultados similares fueron obtenidos al evaluar el aprendizaje motor y de evitación, los cuales resultaban en potenciación de largo término en distintas regiones del cerebro (Rioult-Pedotti *et al.* 1998, 2000; Whitlock *et al.* 2006). En 2014 Nabavi y colaboradores llevaron a cabo un condicionamiento de miedo utilizando un shock eléctrico como estímulo incondicionado y la activación optogenética de fibras que llevan la información auditiva a la amígdala lateral como estímulo condicionado. Este condicionamiento produjo una LTP en las sinapsis de la amígdala. Sin embargo, la inducción de la depresión de largo término (debilita la fuerza sináptica) revertía la LTP generada por el entrenamiento y el condicionamiento asociado, mientras que la inducción optogenética de la LTP restauraba el condicionamiento (Nabavi *et al.*, 2014). Los trabajos aquí mencionados, sustentados por muchos otros que fueron surgiendo hasta la actualidad, proveen evidencias fuertes que la potenciación de largo término sería uno de los mecanismos que permiten la adquisición, almacenamiento y evocación de memorias de largo término (Dringenberg, 2020). A continuación, se describirán los mecanismos moleculares que subyacen a la LTP.

Frente a la llegada de glutamato, los receptores AMPA se abren dejando pasar  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , pero los receptores NMDA permanecen bloqueados. Estos receptores son sensibles al glutamato y permeables al  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$ , sin embargo, el poro del receptor está bloqueado por  $\text{Mg}^{2+}$ . La co-ocurrencia de despolarización y unión de glutamato, es decir una estimulación sináptica acoplada a una despolarización post-sináptica, libera el  $\text{Mg}^{2+}$  y maximiza el flujo de calcio a través del receptor (Nicoll *et al.*, 1988). De esta manera, los descubrimientos de la dependencia de voltaje para la liberación de los receptores NMDA (Nowak *et al.*, 1984) y la necesidad de una despolarización postsináptica (Dale y Roberts, 1895) sentaron las bases para proponer que el mecanismo hebbiano subyacente a la LTP residía en los receptores NMDA (la teoría hebbiana propone que cuando una neurona presináptica estimula de manera repetida y persistente a una neurona postsináptica aumenta la eficiencia sináptica, (Hebb, 2005)). Esta evidencia junto con los trabajos de Lynch y colaboradores en 1983 que demostraron que quelar calcio postsináptico prevenía la formación de LTP, pusieron de manifiesto la importancia de los receptores NMDA en la potenciación de largo término (Nicoll, 2017). La LTP se refiere al incremento duradero en las fuerzas de interacción entre neuronas a través de su sinapsis. Los tipos de LTP asociados a sinapsis excitatorias más representativos dependen de la activación de receptores de NMDA y modificaciones postsinápticas. Cuando el receptor NMDA se activa y el magnesio se desprende, el calcio ingresa a la neurona a través de los receptores activando a la CaMKII, la cual está involucrada en el alargamiento de las espinas dendríticas. Además, CaMKII actúa sobre proteínas postsinápticas de andamiaje que permiten acomodar receptores AMPA en la membrana (Lisman *et al.*, 2012). Actualmente se cree que la LTP está asociada con un incremento en la liberación de glutamato, lo que requiere una vía de señalización retrógrada. En la última etapa de la LTP se da una rápida acumulación de receptores AMPA en la sinapsis, lo que la vuelve más receptiva al glutamato (Nicoll, 2017). De esta manera la

activación de los receptores NMDA genera una cascada de señalizaciones internas que modifican la eficiencia sináptica promoviendo la formación de memoria de largo término (figura 2).

Se ha comprobado que bloquear los receptores de NMDA inhibe la formación de memoria de largo término en distintas especies y paradigmas de aprendizaje (Nicoll y Malenka, 1999; Newcomer *et al.*, 2022). Una droga muy utilizada para este propósito es la dizocilpina, MK-801, la cual es un antagonista no competitivo de los receptores NMDA, que se une al poro del receptor inhibiendo el paso de iones a través de este poro (Nicoll y Malenka, 1999).

## 1.5 Genes de expresión temprana y actividad neuronal

Hemos mencionado previamente que el calcio ingresa a las neuronas a través de los receptores NMDA cuando co-ocurren estimulación sináptica y despolarización post-sináptica. Este funciona como uno de los principales segundo mensajero en células excitables estimulando la expresión de genes inmediatos de expresión temprana (IEG) (Sheng y Greenberg, 1990). Si bien la expresión de estos genes no es específica de neuronas, se ha observado en cultivo de células neuronales como la transcripción de los genes tempranos estaba inducida por la estimulación eléctrica y por la activación mediante análogos de neurotransmisores, como la nicotina (Morgan y Curran, 1986; Bartel *et al.*, 1989). El mismo efecto fue observado cuando se estimulaba el sistema nervioso *in vivo*, induciendo la expresión de C-fos, uno de estos tipos de genes (Mizuno *et al.*, 1989).

De esta manera se ha observado que la expresión de los IEG, que codifican para factores de transcripción, se daba de manera rápida y transitoria luego de la estimulación sináptica

(Okuno, 2011). En particular la expresión de varios de estos genes, entre ellos C-fos, se veía rápidamente aumentada luego de la activación neuronal, ya sea mediante un tratamiento farmacológico o mediante estimulación sensorial. (Minatohara *et al.*, 2016). De manera complementaria se observó que el desarrollo de tareas comportamentales, como por ejemplo la exploración espacial (Ramirez-Amaya *et al.*, 2005), también inducían la expresión de este tipo de genes (Minatohara *et al.*, 2016).

Teniendo en cuenta la expresión de los IEG dependiente de la activación neuronal, como también el rol de los receptores NMDA y el flujo de calcio en esta, ha sido muy estudiada la expresión de algunos de estos genes durante el aprendizaje y la memoria (Tischmeyer y Grimm, 1999). Por ejemplo, en pollos se observó un aumento del mensajero y la proteína de C-fos luego de un único entrenamiento de evitación pasiva. El mismo aumento se observó una hora luego del entrenamiento en individuos que recordaban la tarea, pero no en aquellos que no la habían recordado. Dicho aumento se evaluó en la región cerebral IMHV, homóloga al neocórtex en mamíferos (Freeman y Rose, 1995).

La cuantificación de C-fos ha sido muy utilizada como marcador de actividad neuronal en distintas especies, entre ellas el pez cebra (Wilson *et al.*, 2002; Hudson, 2018; Chen *et al.*, 2016). Una técnica muy utilizada es la medición de la proteína C-fos por técnicas inmunohistoquímicas (Chatterjee *et al.*, 2015). Chatterjee y colaboradores observaron que en el pez cebra la estimulación mediante la exposición de los individuos a cafeína, se correlacionaba con un aumento en la medición de la proteína C-fos en distintas regiones del cerebro (Chatterjee *et al.*, 2015). En experimentos de aprendizaje apetitivo olfatorio, ratas entrenadas en donde debían asociar un olor particular con la presencia de una recompensa, mostraban una mayor expresión de proteína C-fos inmediatamente después del entrenamiento que ratas en donde ambos estímulos no estaban pareados. Esa diferencia se observó en ciertas

regiones particulares del cerebro: la amígdala basolateral, la corteza prelimbica y la corteza ventrolateral orbital. Sin embargo, durante la evocación de esta memoria, no se encontraron diferencias entre grupos en esas regiones, sino que era la habénula lateral la que mostraba una mayor activación, únicamente en individuos que previamente habían aprendido la tarea (Tronel y Sara, 2002). Otras evidencias demostraron que los IEG, incluido C-fos, eran rápidamente inducidos en ciertas regiones del cerebro, en tareas comportamentales. En particular se observó en el hipocampo un rápido aumento de la expresión de estos genes en paradigmas como la exposición a un ambiente novedoso, el laberinto acuático de Morris y el condicionamiento contextual de miedo. Complementariamente, en condicionamientos de miedo se encontró un aumento rápido de los IEG en la amígdala lateral, lo que sugeriría que la expresión de dichos genes en esa región estaría involucrada en los cambios plásticos asociados al aprendizaje y la formación de memorias relacionadas a las emociones (Minatohara *et al.*, 2016).

Es interesante notar que se ha postulado que C-fos tendería a disminuir su expresión con la presentación repetida del estímulo, revelando eventos de activación o plasticidad neuronal novedosos (Knapska *et al.*, 2017). En ratas expuestas a un laberinto se encontraron mayores niveles de proteína C-fos en individuos expuestos por primera vez, que en aquellos que fueron expuestos repetidamente, o no fueron expuestos. Lo cual se evidencio en distintas regiones del cerebro, entre ellas el hipocampo (Papa *et al.*, 1993).

## 1.6 Estructuras cerebrales en mamíferos y homologías en peces teleósteos

Como mencionamos anteriormente, los individuos pueden evaluar una experiencia o estímulo e integrarlo con información fisiológica interna generando un comportamiento que podría ser adaptativo. Podemos definir un comportamiento adaptativo como aquel asociado a una recompensa o un refuerzo de alguna manera. En este sentido podemos mencionar dos circuitos neuronales muy importante en mamíferos: El sistema de recompensa mesolímbico y la red de comportamiento social, los cuales estarían involucrados en la evaluación de la saliencia de los estímulos y en la regulación de los comportamientos sociales. Ambos conforman lo que en inglés se conoce como *Social Decision-Making Network* (SDMN). La red de comportamiento social está formada por el área preóptica, el hipotálamo anterior, el hipotálamo ventromedial y el periacueducto gris, la amígdala medial, el septum lateral y el BNST (bed nucleus of the stria terminalis). Se ha observado en mamíferos que estas regiones son importantes en la regulación de los comportamientos agresivos y reproductivos. Por su parte, el sistema de recompensa mesolímbico está formado por el estriatum, nucleus accumbens, el pallium ventral, la amígdala basolateral, el hipocampo, el área tegmental ventral, y comparte con la red de comportamiento social la amígdala medial, el septum lateral y el BNST. Se sugiere que esta red sería la encargada de evaluar la saliencia de los estímulos recibidos para generar la respuesta comportamental apropiada.

Los aprendizajes mencionados y los cambios comportamentales pueden perdurar en el tiempo mediante la formación de memoria de largo término que requiere de cambios en la plasticidad sináptica, los cuales dependen de cascadas de señalización moleculares. Estos cambios pueden fortalecer conexiones sinápticas en redes cerebrales particulares y discretas (Asok *et al.*, 2019). De esta manera, evaluando la activación neuronal, el fortalecimiento de los



circuitos neuronales, como también el efecto de inhibir o activar ciertas regiones cerebrales, se pueden relacionar áreas cerebrales particulares con ciertos tipos de aprendizajes y memorias. En el cerebro de los mamíferos podemos destacar una estructura denominada amígdala, la cual estaría formada por circuitos neuronales asociados a las emociones, la recompensa, los refuerzos positivos y el miedo, mediando también el impacto negativo de las emociones en la memoria (Fernando *et al.*, 2013). Además, se cree que funcionaría como un “centro de memoria” (Perathoner *et al.*, 2016). En aves, reptiles, anfibios y teleósteos podemos encontrar estructuras cerebrales homólogas, tanto a la amígdala de mamíferos, como a otras regiones cerebrales (O'Connell, y Hofmann, 2011).

En peces se encontraron evidencias neurofisiológicas, comportamentales, de conectividad y moleculares de ciertas regiones telencefálicas que serían homólogas a región cerebrales de mamíferos (Perathoner *et al.*, 2016). En cuanto a la topología, si bien en mamíferos es fácil de identificar la amígdala teniendo en cuenta proyecciones del órgano vomeronasal, en peces teleósteos, que no lo poseen, es más complicado establecer una homología. Sin embargo, teniendo en cuenta evidencias en cuanto al desarrollo del cerebro, se ha establecido que las zonas ventral (Vv) y lateral (Vl) del telencéfalo ventral serían homólogas con los núcleos septales de los mamíferos, la zona dorsal (Vd) del telencéfalo ventral lo sería con el Striatum, y en parte con el núcleo accumbens, mientras que la zona medial del telencéfalo dorsal (Dm) en los teleósteos correspondería al pallium ventral en los mamíferos (amígdala basolateral), la zona posterior (Dp) al pallium lateral y la zona lateral (Dl) al pallium medial (hipocampo). Estas homologías luego se comprobaron con evidencias de conectividad, evaluando como ciertas regiones respondían a estímulos particulares y la interconexión entre las distintas regiones y poblaciones celulares ya conocidas. El estudio de la expresión genética en las distintas áreas cerebrales en peces sumo más evidencia a estas homologías, comparando la

expresión de ciertos genes característicos de las distintas regiones en mamíferos. Finalmente, experimentos de activación y lesiones en distintas regiones cerebrales permitieron comparar el efecto en peces con el efecto de activar o lesionar áreas conocidas en mamíferos, sumando así evidencia neurofisiológica y comportamental de las homologías expuestas (Perathoner *et al*, 2016).

En peces teleósteos podemos encontrar algunas regiones homólogas a las mencionadas en mamíferos, por ejemplo, el núcleo Dm involucrado en el aprendizaje emocional, homólogo a la amígdala basolateral, o el núcleo Vs homólogos a la amígdala medial y el BNST, relacionados a la agresión (O'Connell, y Hofmann, 2011) (figura 3). En este sentido, se ha planteado al pez cebra como un buen modelo para evaluar el rol de estos núcleos en las memorias emocionales (Perathoner *et al*, 2016). Un resumen de las homologías se presenta en la tabla 1.

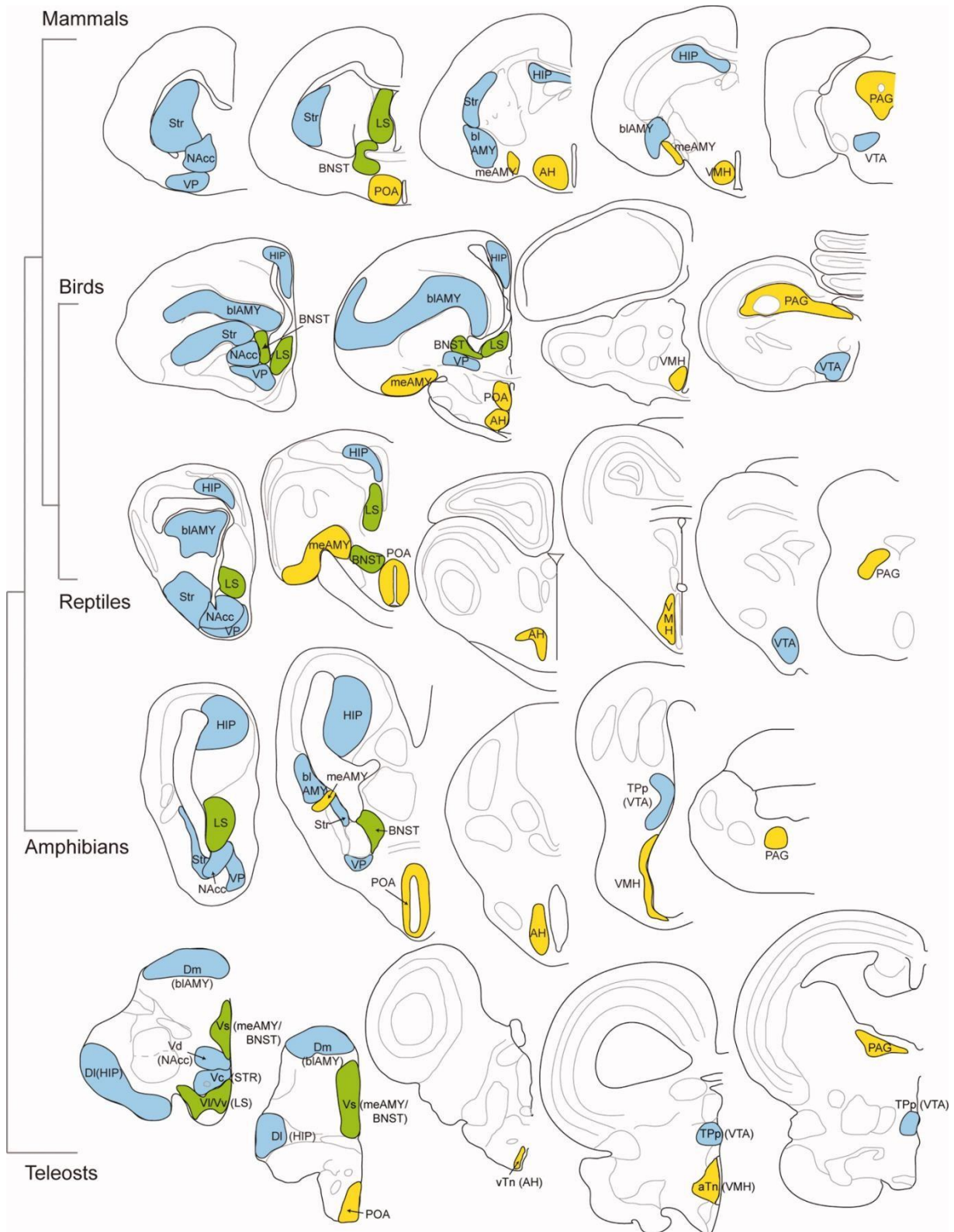


Figura 3. Tomado de O'Connell, y Hofmann, 2011. Las imágenes cerebrales en plano transversal muestran en amarillo las regiones asociadas a la red de comportamiento social, en azul el sistema de recompensa mesolímbico, y en verde las regiones compartidas, para mamíferos, aves, reptiles, anfibios y teleosteos. De izquierda a derecha se muestran las regiones rostral a caudal.

<b>Regiones cerebrales en mamíferos</b>	<b>Homologías en teleósteos</b>
Septum Lateral	Núcleo ventral y lateral del área ventral telencefálica ( <b>Vv,VI</b> )
Striatum	Núcleo central del área ventral telencefálica ( <b>Vc</b> )
Núcleo accumbens	Núcleo dorsal del área ventral telencefálica ( <b>Vd</b> ). En parte <b>VC</b>
Amígdala medial/BNST	Región supracomisural del pallium ventral ( <b>Vs</b> )
Amígdala basolateral	Núcleo medial del telencéfalo dorsal ( <b>Dm</b> )
Hipocampo	Núcleo lateral del telencéfalo dorsal ( <b>Dl</b> )

Tabla 1. Homología entre las regiones cerebrales del SDM en mamíferos con los núcleos cerebrales en teleósteos.

## 1.7 Resolución de un encuentro agonístico y efecto ganador/perdedor

Previamente hemos mencionado que los individuos pueden hacer una evaluación sobre su entorno, y en el caso de un encuentro diádico, sobre su oponente. En base a esta evaluación pueden modificar su estrategia de pelea, y en el caso de participar de múltiples encuentros, pueden modular sus comportamientos futuros en base a la experiencia previa. Esta modulación podría estar dada por el reconocimiento individual de un oponente repetido, o por el efecto de haber ganado o perdido un encuentro previo. En este sentido podemos mencionar lo que se conoce como el efecto ganador-perdedor, el cual postula que un individuo que gana un encuentro tiene más probabilidades de ganar el próximo, mientras que los perdedores previos tienen más probabilidad de perder el nuevo encuentro. Este efecto se ha observado en

distintas especies de artrópodos, mamíferos, reptiles, aves y peces (Rutte *et al.*, 2006). Se postula que el efecto de experimentar una victoria o derrota no cambiaría la evaluación que se hace del recurso por el que se está compitiendo, sino que lo que se modificaría entre encuentros es: la evaluación del oponente, es decir que la experiencia previa de la pelea le permitiría al individuo utilizar nuevas claves para evaluar la capacidad del próximo oponente; y/o mejorar la percepción de la propia habilidad de pelea, al tener una experiencia contra la cual contrastar (Hsu y Wolf, 1999). Si bien las causas últimas de este efecto no están bien claras, para las causas próximas ha surgido evidencia que demuestra que en los cambios en el estatus social estarían involucrados respuestas hormonales diferenciales, particularmente un aumento en los niveles de andrógenos, lo que está relacionado a una mayor agresividad (Teles y Oliveira, 2016), como también en los estados genómicos y epigenéticos de las redes cerebrales (Cardoso *et al.*, 2015; Rilich y Stevenson, 2011). Este efecto ganador-perdedor se ha estudiado principalmente evaluando la probabilidad de ganar o perder un segundo encuentro contra un oponente desconocido. Sin embargo, si el oponente fuera el mismo, la modulación comportamental producto de la experiencia previa podría deberse al reconocimiento individual de ese oponente en particular y al recuerdo del encuentro previo, lo cual podría generar cambios en la estrategia de pelea independientes del efecto ganador-perdedor.

## 1.8 Pez cebra, nuestro modelo experimental.

El pez cebra, *Danio rerio*, es un ciprínido de agua dulce que habita principalmente cuerpos de agua con poco movimiento en el noreste de India, Bangladesh y Nepal (Jayaram, 2010). Sin embargo, es criado en todo el mundo debido a que es un modelo de vertebrado muy utilizado en investigaciones científicas. Esto se debe a que presenta muchas características que lo convierten en un buen modelo, como por ejemplo: ser una especie relativamente pequeña que no suele superar los 4 cm de longitud, su fácil mantenimiento y cría en condiciones de acuario, los estadios tempranos larvales son transparentes, lo que permite estudios in vivo como imágenes de calcio u observación del desarrollo de los órganos (Spence *et al.*, 2008), ya se ha secuenciado su genoma, posee muchos genes conservados con homologías en mamíferos y se han desarrollado gran cantidad de herramientas genéticas para la especie (Granato *et al.*, 1996; Haffter *et al.*, 1996). El pez cebra se ha utilizado en estudios de desarrollo, medicina, genética, así como también en experimentos comportamentales y de memoria, principalmente en los últimos años. Es una especie social, que forma cardúmenes y en la cual se establecen jerarquías de dominancia (Paull *et al.* 2010). Se cree que la dominancia en esta especie estaría relacionada al mantenimiento del territorio lo cual llevaría al mayor acceso de potenciales parejas, o parejas de mejor calidad (Paull *et al.* 2010). Han sido descritos los principales comportamientos agresivos en esta especie, tanto en diadas entre machos, como entre hembras (Oliveira *et al.*, 2011; Scaia *et al.*, 2022). El encuentro suele comenzar con lo que se conoce como *display*, los individuos se posicionan de frente o en forma antiparalela extendiendo las aletas, en algunos casos realizando movimientos ascendentes en la columna de agua. Este comportamiento es seguido por círculos, en donde de forma antiparalela los oponentes van persiguiendo la aleta caudal del otro individuo. Luego puede continuar con persecuciones por parte de ambos, y mordidas. Esta fase de pelea

culmina cuando uno de los individuos comienza a realizar comportamientos sumisos como alejarse del oponente o hacer *freezing* (quedándose quieto en una posición del acuario), mientras que el ganador lo ataca y lo persigue activamente. En esta etapa el conflicto está resuelto y no hay reversión del resultado, por lo menos a corto término (Oliveira *et al.*, 2011).

En el pez cebra, al igual que en muchas otras especies de peces, las hembras también presentan despliegues agresivos, con una dinámica similar a la observada en machos, aunque presentan algunas diferencias (Scaia *et al.*, 2022). Además, los individuos llegan a la madurez sexual a los 3 meses aproximadamente y siendo una especie de fecundación externa, las hembras pueden liberar los huevos para que los machos los fertilicen, estando disponibles para una nueva liberación entre 3 y 5 días más tarde (Spence *et al.*, 2007). De esta manera podemos distinguir dos estados reproductivos en las hembras, pre-puesta de huevos y post-puesta de huevos, los cuales se pueden distinguir inicialmente por la prominencia del vientre, y luego confirmar a través del índice gonadosomático. Hemos visto en trabajos previos del laboratorio que las hembras presentan comportamientos diferentes según su estado reproductivo, particularmente las hembras pre-puesta se acercan más a los machos que las post-puesta (Cavallino *et al.*, 2019)

En esta especie, hembras y machos presentan dimorfismo sexual, aunque no muy marcado. Los machos muestran un vientre más plano y una coloración más dorada, mientras que las hembras presentan un vientre más abultado y una coloración más plateada (figura 4)

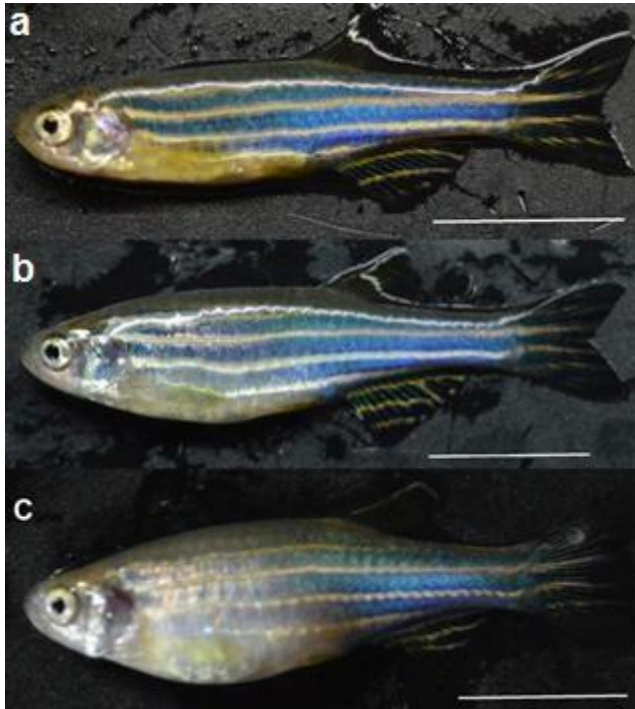


Figura 4. a) Macho de pez cebra. b) Hembra postpuesta de pez cebra. c) Hembra pre-puesta de pez cebra. Barra 1 cm.

El pez cebra ha sido muy utilizado para experimentos de aprendizaje y memoria, como por ejemplo en evaluaciones de preferencia de objeto novedoso (May *et al.*, 2016), memoria espacial, donde aprenden a evitar el brazo de un laberinto asociado a un shock eléctrico (Yashina *et al.*, 2019), condicionamientos clásicos relacionados a asociar el nado de un compartimento luminoso a uno oscuro con un shock eléctrico (Xu *et al.*, 2007), entre otros (Gerlai 2016). Sin embargo, son muy escasos los estudios que evalúan aprendizajes y memorias relacionados a interacciones sociales (Madeira y Oliveira., 2017; Pinho *et al.*, 2020)



## 1.9 Hipótesis y objetivos

Teniendo en cuenta los antecedentes descritos en la introducción, el **objetivo general** de esta tesis es establecer un paradigma de memoria relacionada a interacciones sociales en el pez cebra, para evaluar a nivel comportamental y de activación neuronal el reconocimiento individual de conespecíficos y la formación de una memoria de largo término asociada a interacciones sociales. De esta manera buscamos analizar el efecto de encuentros sucesivos entre oponentes de pez cebra sobre los comportamientos agonísticos y como el efecto comportamental a largo plazo puede ser dependiente de la formación de una memoria de largo término, asociada a reconocer y recordar un oponente y/o las características del encuentro agonístico previo.

De este objetivo general se desprenden los siguientes objetivos específicos:

- 1) Evaluar cómo cambian los despliegues agresivos en encuentros sucesivos, y como este efecto está relacionado al oponente en particular o a una pelea previa independiente del oponente.
- 2) Establecer la duración del efecto observado evaluando intervalos más grandes entre encuentros.
- 3) Analizar cómo la experiencia previa y el efecto sobre los comportamientos agonísticos sucesivos depende de la formación de memoria de largo término a través de los receptores NMDA.
- 4) Evaluar la activación neuronal relacionada a las interacciones sociales y el reconocimiento de un individuo en los núcleos del cerebro implicados en el aprendizaje social y la memoria.

5) Comprobar si la experiencia previa tiene un efecto sobre los comportamientos agresivos en encuentros diádicos sucesivos entre hembras.

Como **hipótesis** planteamos que los encuentros agonísticos entre individuos de pez cebra generaran una memoria de largo termino relacionada al reconocimiento del oponente, lo que les permitirá modular sus comportamientos en encuentros sucesivos.

Si bien todos los objetivos están interrelacionados, cada uno tiene un desarrollo experimental y un marco teórico específico, por lo tanto, cada capítulo donde se desarrollan dichos objetivos contará con una introducción y materiales y métodos propios.

## **CAPÍTULO 2**

### **Experiencia previa y efecto del oponente**

## 2.1 Introducción

En muchas especies, durante un encuentro agonístico los individuos son capaces de evaluar a su oponente y cambiar su estrategia de pelea acorde a esta nueva información, en algunos casos provocando que uno de los individuos se retire y trate de evitar el conflicto. Se ha observado también que algunos de estos encuentros agonísticos pueden generar lesiones graves a los oponentes (Enquist y Leimar, 1990). Teniendo en cuenta esto, podemos esperar que algunos individuos hayan desarrollado no solo la capacidad de evaluar al oponente, sino también la de recordar la experiencia previa, y con este aprendizaje cambiar su estrategia en futuros encuentros, como también que hayan evolucionado comportamientos y estrategias que minimicen las lesiones (Smith y Price, 1973).

Solo para citar algunos ejemplos, en trucha multicolor, *Oncorhynchus mykiss*, se observó que los niveles de agresividad eran menores cuando se enfrentaban oponentes que ya habían tenido experiencia previa entre sí, que cuando el oponente era novedoso (Johnsson 1997). Algo similar se observó en otras especies, como por ejemplo en los grillos de campo, *Gryllus bimaculatus*, donde los ganadores presentaban una menor latencia al primer ataque y los perdedores una supresión de los comportamientos agresivos en encuentros sucesivos (Adamo y Hoy 1995).

Con respecto a nuestro modelo experimental, pez cebra, Madeira y Oliveira encontraron que estos peces podían reconocer y recordar a otros conespecíficos. En una tarea de evaluación de objeto novedoso, un individuo focal fue expuesto a dos individuos. Luego de 24 horas se expuso al mismo individuo focal a dos conespecíficos, uno conocido (de la primera experiencia) y uno novedoso, mostrando una preferencia por el individuo desconocido. Este resultado pone de manifiesto que los peces cebra pueden reconocer y recordar, por al menos

24 horas, a un conespecífico (Madeira y Oliveira, 2017). Además, en esta especie se observó un efecto ganador/perdedor a corto plazo. Con un intervalo entre peleas de 1 hora, individuos que ganan un encuentro, tienen más posibilidades de ganar una segunda pelea frente a un oponente *naive* (que no participo de una pelea previa) y, por otro lado, los perdedores previos tienen más posibilidad de perder la segunda pelea (Oliveira *et al.* 2011). Sin embargo, este perfil de resolución entre peleas no se observaba a largo término (intervalo de 24 horas), perdiéndose así el efecto ganador/perdedor (Chou *et al.* 2016).

Teniendo en cuenta que el pez cebra tiene la capacidad de reconocer y recordar conespecíficos, y que distintas especies pueden evaluar a los oponentes y resolver conflictos de manera de minimizar el gasto energético y las posibles lesiones, el **primer objetivo fue** evaluar los cambios comportamentales a largo término en encuentros sucesivos entre machos de pez cebra evaluándose además si ese efecto se debe a un reconocimiento individual del oponente previo.

## 2.2 Materiales y métodos

### 2.2.1 Individuos y mantenimiento

78 machos adultos de pez cebra de peso=  $0.220 \pm 0.005$ g y longitud estándar=  $2.51 \pm 0.02$ cm (media $\pm$ sem) fueron utilizados en estos experimentos. Los mismos fueron conseguidos en un acuario comercial. Un mes antes de comenzar los experimentos, los individuos fueron aclimatados en peceras de 20 litros (con una densidad de 1 pez por litro), temperatura de 25-26 c, pH= 7.5/7.8 y un fotoperiodo de 14 horas luz: 10 horas oscuridad (Avdesh *et al.*, 2012). Fueron alimentados 2 veces al día, con alimento comercial marca Tetra.

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

Un día antes del primer ensayo, dos machos de tamaño similar y provenientes de distintas peceras comunitarias fueron aislados en acuarios de 2l, con una barrera entre ellos que permitió el pasaje de claves químicas, pero no visuales (figura 5). Durante todo el protocolo (4 días en total) los peces fueron alimentados una vez por día, con la misma cantidad de alimento. El día del encuentro agonístico fueron alimentados después del mismo. Teniendo en cuenta bibliografía previa (Oliveira *et al.*, 2011) consideramos que diferencias de 1 mm en la longitud estándar son despreciables, representando una diferencia de aproximadamente 4% del total.

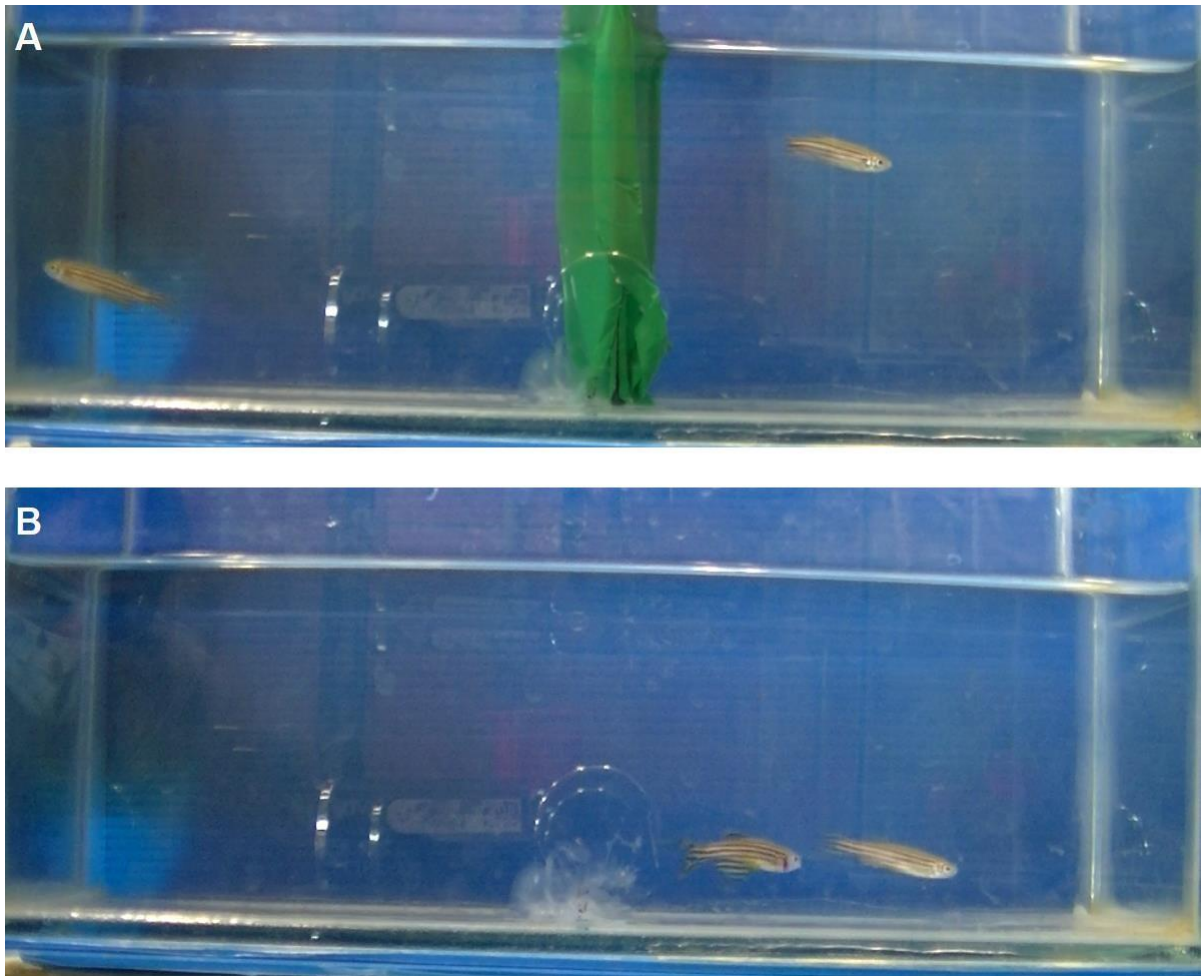


Figura 5. A) Los individuos están separados por una barrera opaca que deja pasar un flujo de agua por el fondo y los costados. B) Misma pecera luego de remover la barrera.

## 2.2.2 Testeo de la experiencia previa contra el mismo oponente

Luego de 24 horas de aislamiento, se removió la barrera entre oponentes, permitiendo la interacción entre ambos individuos durante 30 minutos. El encuentro se grabó con una filmadora Everio jvc. Todos los encuentros fueron llevados a cabo en el mismo rango horario (entre las 10:30 am y las 13 pm). Se eligió este rango horario teniendo en cuenta bibliografía previa (Oliveira *et al.*, 2011). Observamos en experimentos realizados entre las 14 y las 16

horas menor cantidad de encuentros agresivos, por lo cual consideramos que el horario elegido era el más adecuado. Para poder evaluar el efecto de encuentros previos entre los mismos oponentes sobre los despliegues agresivos y la dinámica y resultado del conflicto, luego del primer encuentro se volvieron a separar los oponentes, colocando nuevamente la división, quedando aislados como se explicó anteriormente. Luego de 24 horas se removió la barrera permitiendo la interacción entre ambos, y se filmó el encuentro durante 30 minutos. Este procedimiento se repitió de manera tal de tener 3 encuentros entre los mismos oponentes, con intervalos de 24 horas entre encuentro (figura 6).

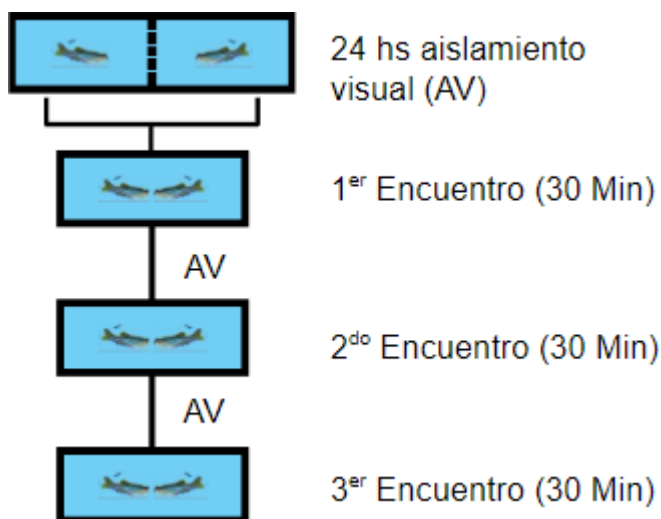


Figura 6. Dispositivo experimental donde dos individuos quedan separados por una barrera opaca que permite el flujo de agua. Inicialmente quedan separados durante 24 horas (AV) para luego tener un encuentro durante 30 minutos hasta que se los vuelve a separar según AV. Esto se repite hasta llegar a un tercer y último encuentro, teniendo un intervalo de 24 horas entre cada uno. Durante el aislamiento visual los peces no pueden observarse, pero si intercambiar señales químicas.



### 2.2.3 Evaluación de la experiencia previa con un oponente novedoso

Para evaluar si el efecto de la experiencia previa sobre las dinámicas del encuentro agonístico se debe a volver a enfrentarse al mismo individuo, o si dependen únicamente de haber perdido o ganado un encuentro previo, se repitió el protocolo mencionado, pero en este nuevo experimento el segundo encuentro se llevó a cabo entre el ganador de una pelea y el perdedor de otro encuentro. Luego de este segundo encuentro entre oponentes novedosos, los mismos quedaron separados por la barrera hasta el siguiente día cuando se volvieron a enfrentar (figura 7).

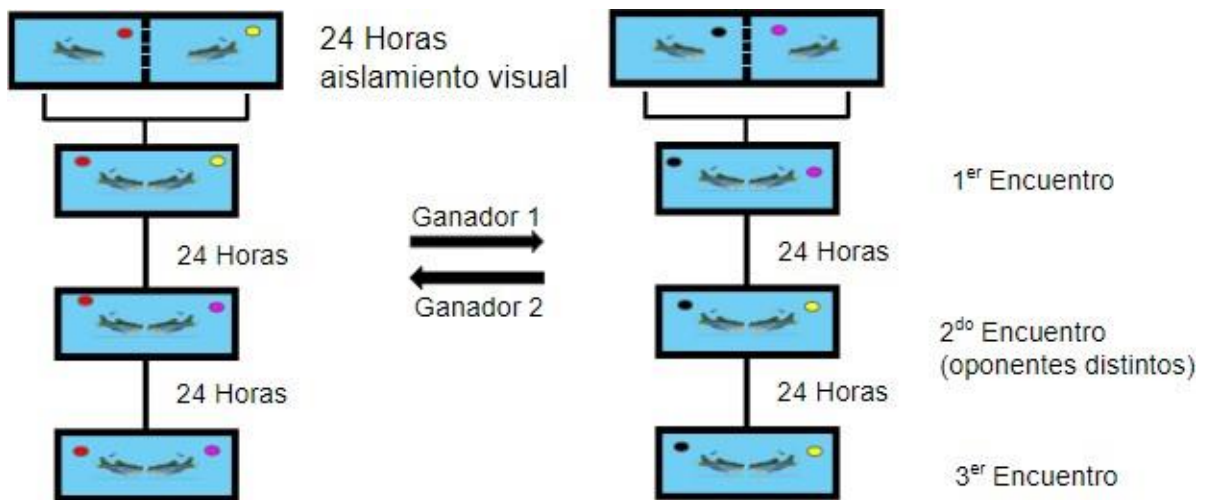


Figura 7. Dispositivo experimental donde dos individuos son separados mediante una barrera opaca que permite el flujo de agua. Luego de 24 horas se levanta la barrera e interactúan durante 30 minutos, hasta que son separados nuevamente, pero en este caso el ganador de una pelea es reemplazado por el ganador de otra pelea diferente (o perdedor por perdedor). Los individuos de esta nueva pareja quedan aislados otras 24 horas hasta que tienen un segundo encuentro. Esta misma pareja participa de un tercer y último encuentro 24 horas más tarde.

Luego del último encuentro los individuos fueron pesados, medidos y sacrificados mediante un shock frío y corte cervical (American Veterinary Medical Association, AVMA, Guidelines for the Euthanasia of Animals, 2020) para la posterior confirmación del sexo a través de la observación de sus gónadas.

#### 2.2.4 Análisis comportamental

Durante las interacciones diádicas se pueden identificar tres fases distintas:

1) Una fase inicial que corresponde al tiempo entre que se remueve la barrera y que se da el primer despliegue agresivo (Tiempo de latencia). 2) Una segunda fase, la fase de pelea, donde ocurren los despliegues agresivos simétricos (*display*, círculos, persecuciones y mordidas) por parte de ambos individuos. 3) La fase 2 culmina con la resolución del conflicto, en donde ocurren los comportamientos asimétricos, el ganador ataca y persigue al perdedor, el cual se retira o hace *freezing*. La resolución del conflicto se determina cuando un individuo (el perdedor) nada en dirección opuesta al otro (el ganador), y solo este último realiza persecuciones y ataca al perdedor (figura 8). Durante la segunda etapa, la pelea, se contabilizaron el número de mordidas y el tiempo total que los individuos realizaron comportamientos agresivos (*display*, círculos, mordidas y persecuciones). Luego de la resolución, no se observó reversión del resultado durante el encuentro, es decir que una vez establecido, el ganador continúa siendo el ganador y lo mismo para el perdedor. Para poder evaluar si el resultado de la pelea anterior se mantiene en las siguientes, se identificó a cada pez mediante marcas naturales en el cuerpo y aletas (debido a patrones propios de la coloración) y la posición final en la pecera.

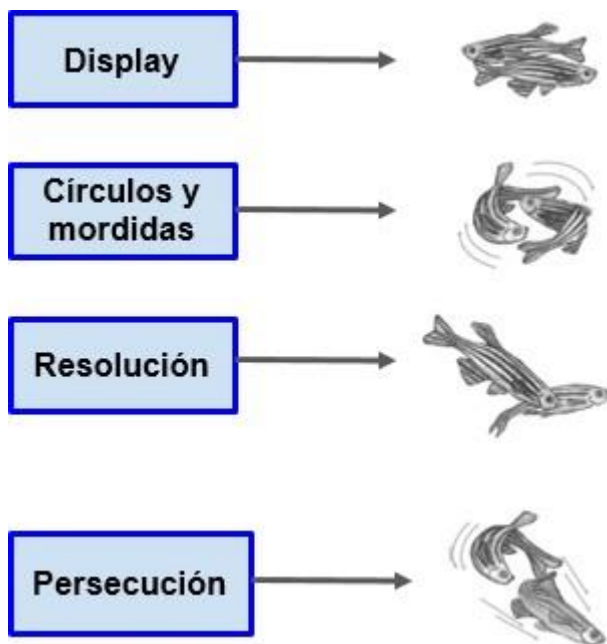


Figura 8. Esquema de los principales comportamientos agresivos en pez cebra. Durante el *display*, círculos y mordidas ambos individuos realizan los mismos comportamientos. En la resolución y persecución el ganador, a la izquierda de la imagen, ataca y persigue al perdedor, a la derecha de la imagen. Modificado de Oliveira *et al.*, 2011.

En experimentos piloto se intentó marcar artificialmente a los peces según bibliografía previa (Oliveira *et al.*, 2011), sin embargo, los riesgos de lastimar a los peces, sumado al estrés generado por la manipulación y la anestesia hicieron imposible que este método pueda realizarse sin afectar a los individuos en una pelea posterior. Teniendo en cuenta esto, no se utilizaron marcas artificiales, si no que se buscaron marcas naturales que los diferencien, como por ejemplo patrones diferentes en la coloración del cuerpo, o las líneas pigmentadas que los atraviesan. Un grupo de experimentos al azar fue analizado por otro observador, no obteniéndose diferencias con la cuantificación inicial.

Para cada encuentro se midió la latencia, la duración de los comportamientos agresivos (Tiempo total que los peces estaban realizando despliegues agresivos durante la pelea), y el

número de mordidas, y se los comparó entre encuentros sucesivos. Solo se tomaron en cuenta encuentros donde se estableció una resolución clara, pudiéndose determinar un ganador y un perdedor. En el caso de no observarse agresividad y resolución, dichos experimentos fueron descartados. Experimentos que al segundo día muestran una duración de la agresividad de 0, refieren a un encuentro en el cual no se observa una fase de pelea, sino que el ganador previo comienza a perseguir al perdedor previo, el cual escapa o hace *freezing*. En esos casos si se puede establecer un ganador y perdedor, ya que resolvieron el conflicto sin los despliegues típicos de la etapa de pelea.

### 2.2.5 Análisis estadístico

Como los datos no cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza (material suplementario, sección 8.4), se realizó un análisis no paramétrico (Test de Friedman seguido de un análisis post hoc de comparación de a pares, test de Dunn). Dichos test se utilizaron para comparar datos pareados (Latencia, tiempo de agresividad y número de mordidas, entre los encuentros sucesivos). Los datos se presentan como mediana y rango intercuartílico (RI). La significancia estadística se setó en  $p < 0.05$ . Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa RStudio (R i386 3.6.2). Los paquetes utilizados se detallan en la sección 8.3 de material suplementario

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Variables morfológicas

No se encontraron diferencias entre ganadores y perdedores en el peso (Peso de los perdedores: mediana = 0.21 g, RI = 0.07; Peso de los ganadores: mediana = 0.21 g, RI = 0.06;  $N = 18$ ,  $p = 0.6660$ ) ni en la longitud estándar (Perdedores LE: mediana = 2.5 cm, RI = 0.2; Ganadores LE: mediana = 2.5 cm; RI = 0.3;  $N = 18$ ,  $p\text{-valor} = 0.5614$ ).

### 2.3.2 ¿Afecta la experiencia previa a la dinámica de encuentros sucesivos?

Para evaluar cómo la experiencia previa afecta la dinámica de encuentros agonísticos sucesivos, se compararon la latencia, duración de la agresividad y mordidas de los tres encuentros entre los mismos oponentes, con un intervalo de 24 horas entre encuentro.

#### 2.3.2.1 Latencia

No se encontraron diferencias en la latencia entre los 3 días (día 1: mediana = 250 seg; RI = 455;  $N = 19$ ; día 2: mediana = 442 seg; RI = 473;  $N = 17$ ; día 3: mediana = 389.5 seg; RI = 732;  $N = 12$ ;  $p\text{-valor} = 0.9131$ ) (figura 9).

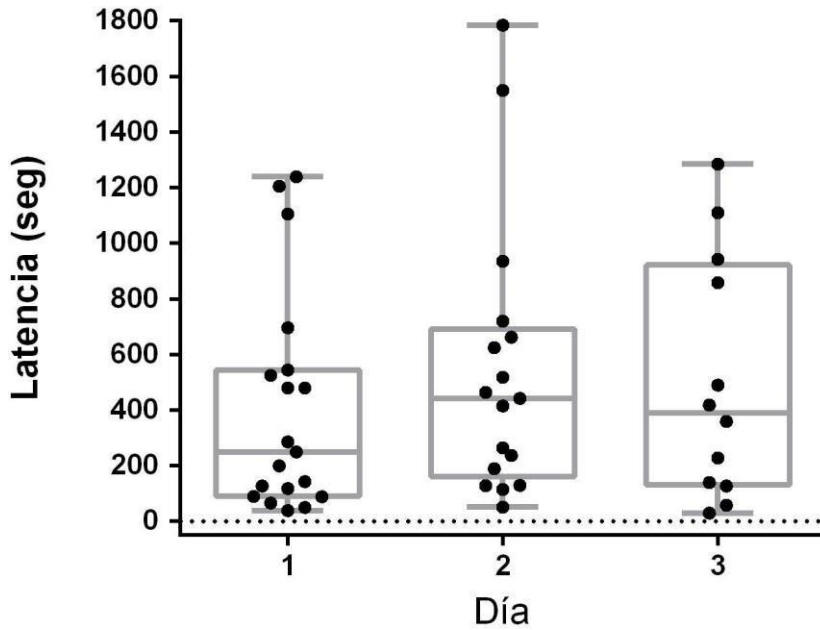


Figura 9. *Boxplot* para la latencia al primer comportamiento agresivo en segundos, para los tres encuentros entre los mismos oponentes. La banda dentro de la caja representa la mediana, y los bigotes los máximos y mínimos. Los círculos representan el valor para cada encuentro. (día 1: mediana = 250 seg; RI = 455;  $N = 19$ ; día 2: mediana = 442 seg; RI = 473;  $N = 17$ ; día 3: mediana = 389.5 seg; RI = 732;  $N = 12$ ;  $p$ -valor = 0.9131). No se encontraron diferencias significativas entre los tres encuentros.

### 2.3.2.2 Duración de la agresividad

En cada encuentro se midió el tiempo total que los individuos realizaron comportamientos agresivos durante la fase de pelea (*display*, círculos, mordidas y persecuciones). Para evaluar el efecto de volver a pelear contra el mismo oponente, se comparó la duración de la agresividad entre los tres encuentros sucesivos. La duración de la agresividad fue mayor en el día 1 que en el día 2 (día 1: mediana = 179 seg; RI = 305;  $N = 20$ .; día 2: mediana = 23.5 seg; RI = 68;  $N = 20$ ,  $p$ -valor < 0.0001). También fue mayor que el día 3 (día 3: mediana = 38 seg; RI = 51;  $N = 17$ .  $P$ -valor < 0.0001). No hubo diferencias entre día 2 y 3 ( $p$ -valor = 0.2695) figura 10.

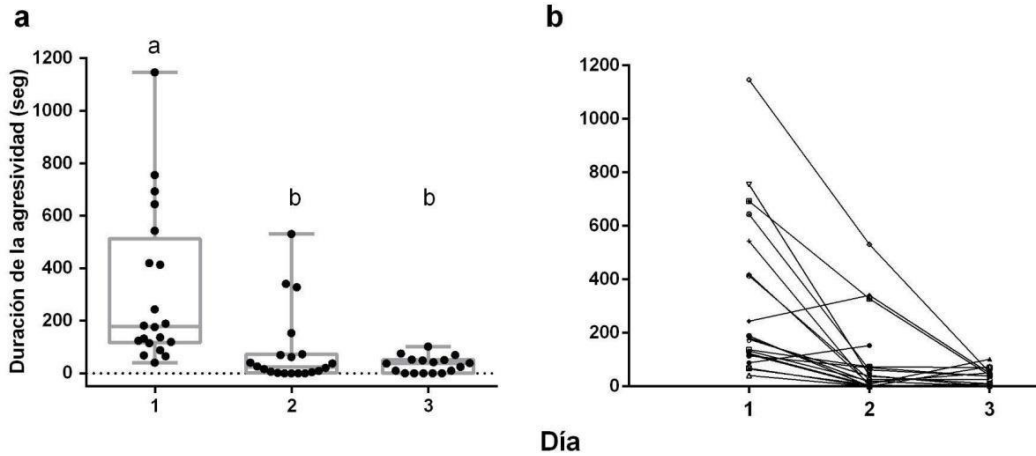


Figura 10. Tiempo total que los individuos pasan realizando despliegues agresivos, en encuentros sucesivos entre los mismos oponentes. a) *Boxplot* para la duración de los comportamientos agresivos en segundos, para los tres encuentros. La banda dentro de la caja representa la mediana, y los bigotes los máximos y mínimos. Los círculos representan el valor medido para cada encuentro. Letras diferentes indican diferencias significativas. (día 1: mediana = 179 seg; RI = 305;  $N = 20$ .; día 2: mediana = 23.5 seg; RI = 68;  $N = 20$ ; día 3: mediana = 38 seg; RI = 51;  $N = 17$ ) b) Cada línea representa una pareja de oponentes, que se repite durante los 3 encuentros.

### 2.3.2.3 Mordidas

Durante la fase de pelea se cuantificaron la cantidad de mordidas realizadas. El número total de mordidas se comparó entre los 3 encuentros sucesivos. Los encuentros del día 1 se resolvieron con mayor cantidad de mordidas que el día 2 (día 1: mediana = 24.5 mordidas; RI = 132;  $N = 20$ ; día 2: mediana = 3 mordidas; RI = 10;  $N = 20$ .  $P$ -valor = 0.0003), y también mayor que en el día 3 (día 3: mediana = 2 mordidas; RI = 7;  $N = 17$ .  $P$ -valor < 0.0001). No se encontraron diferencias entre el día 2 y 3 ( $p$ -valor = 0.2368) (figura 11).

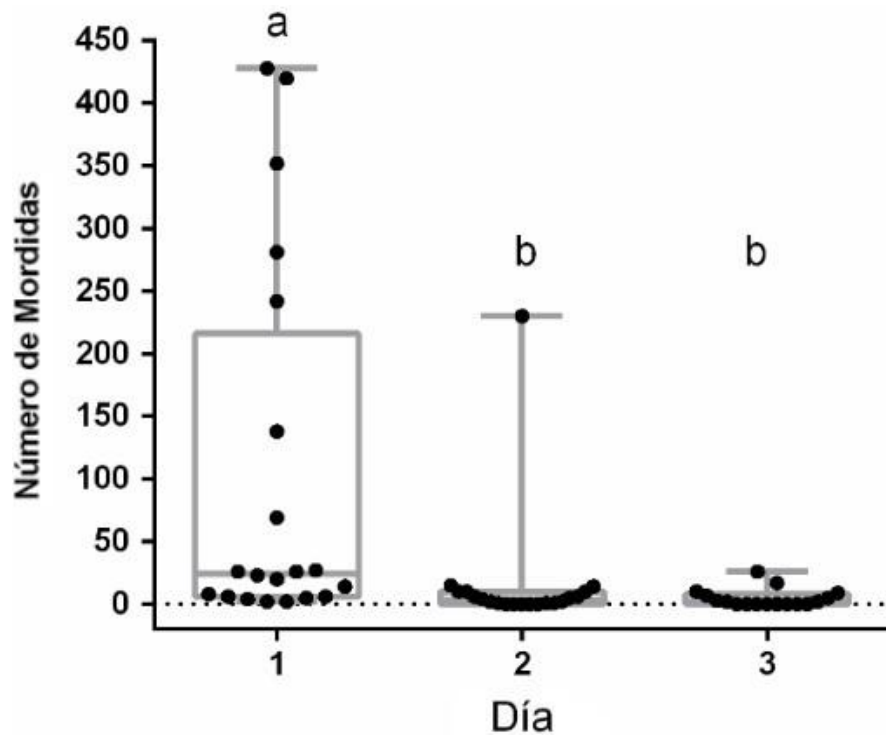


Figura 11. *Boxplot* para el número total de mordidas, para los tres encuentros. La banda dentro de la caja representa la mediana, y los bigotes los máximos y mínimos. Los círculos representan el valor medido para cada encuentro. Letras distintas indican diferencias significativas. (día 1: mediana= 24.5 mordidas; RI = 132; N= 20; día 2: mediana= 3 mordidas; RI = 10; N= 20; día 3: mediana = 2 mordidas; RI = 7; N= 17)

### 2.3.3 El cambio en la dinámica del encuentro ¿se debe solo a la pelea previa o al oponente en particular?

Para evaluar si los cambios comportamentales de los encuentros sucesivos se deben al haber participado en un encuentro previo, o al hecho de enfrentarse nuevamente contra ese oponente en particular, se repitieron los experimentos, pero cambiando el oponente en el segundo día.

Para analizar el posible efecto de diferencias morfológicas al cambiar los oponentes, se compararon la diferencia en el peso y la longitud estándar entre los oponentes en el día 1 y el día 2, calculando un delta para cada par de oponentes. No se encontraron diferencias significativas entre las diferencias entre oponentes del día 1 y el día 2 ( $\Delta$  Peso: día 1:



mediana = 0.02 g, RI=0.4; día 2: mediana = 0.02 g, RI=0.3; p-valor = 0.8568;  $\Delta$  LE: día 1: mediana = 0.1 cm, RI=0.2; día 2: mediana = 0.1 cm, RI=0.1; p-valor = 0.8870).

### 2.3.3.1 Latencia

No se encontraron diferencias en la latencia para los 3 días (día 1: mediana = 269.5 seg; RI = 571;  $N = 18$ ; día 2: mediana = 297 seg; RI = 691;  $N = 17$ ; día 3: mediana = 586 seg; RI = 418;  $N = 11$ .  $P$ -valor = 0.3359) (figura 12).

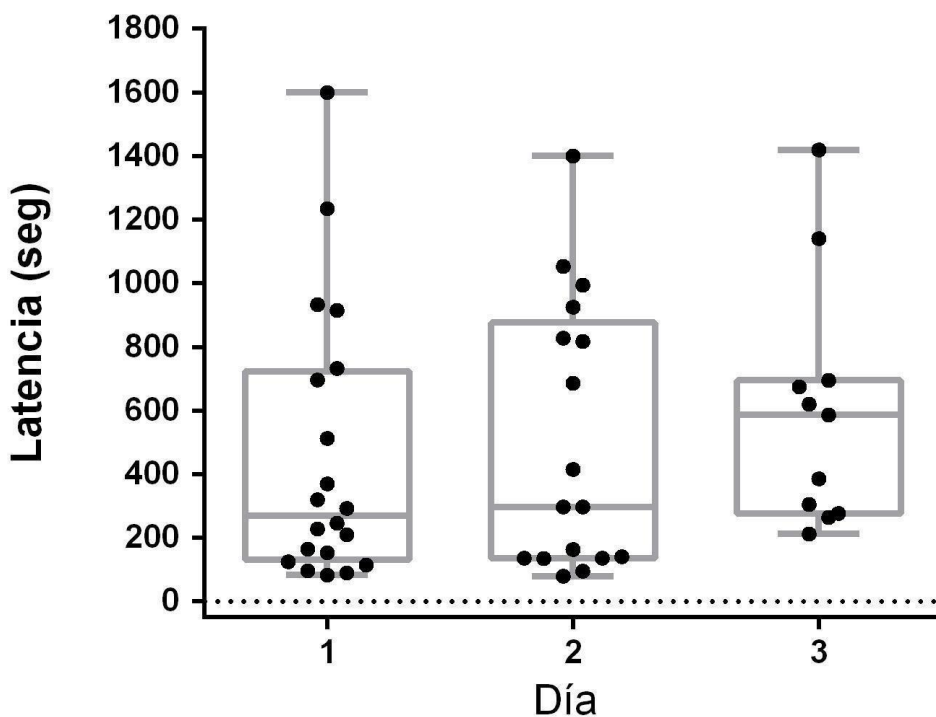


Figura 12. *Boxplot* para la latencia al primer comportamiento agresivo en segundos, para los tres encuentros. Los oponentes cambian en el día dos, los que luego se repiten en el tercer encuentro. La banda dentro de la caja representa la mediana, y los bigotes los máximos y mínimos. Los círculos representan el valor medido para cada encuentro. No se encontraron diferencias significativas entre los tres encuentros. (día 1: mediana = 269.5 seg; RI = 571;  $N = 18$ ; día 2: mediana = 297 seg; RI = 691;  $N = 17$ ; día 3: mediana = 586 seg; RI = 418;  $N = 11$ )

### 2.3.3.2 Duración de la agresividad

Se encontró un efecto de los encuentros sucesivos sobre el tiempo de los comportamientos agresivos ( $p < 0.0001$ ). No se encontraron diferencias entre los días 1 y 2 en el tiempo de comportamientos agresivos (día 1: mediana = 200.5 seg ; RI = 335; N = 20; día 2: mediana 128 seg ; RI = 253; N = 19;  $p$ -valor = 1235). Sin embargo, la agresividad del día 2 fue mayor que en el día 3 (día 3: mediana = 1 seg; RI = 61; N = 19;  $p$ -valor = 0.0006). En el día 1 se observó una mayor agresividad que en el día 3 ( $p$ -valor < 0.0001) (figura 13)

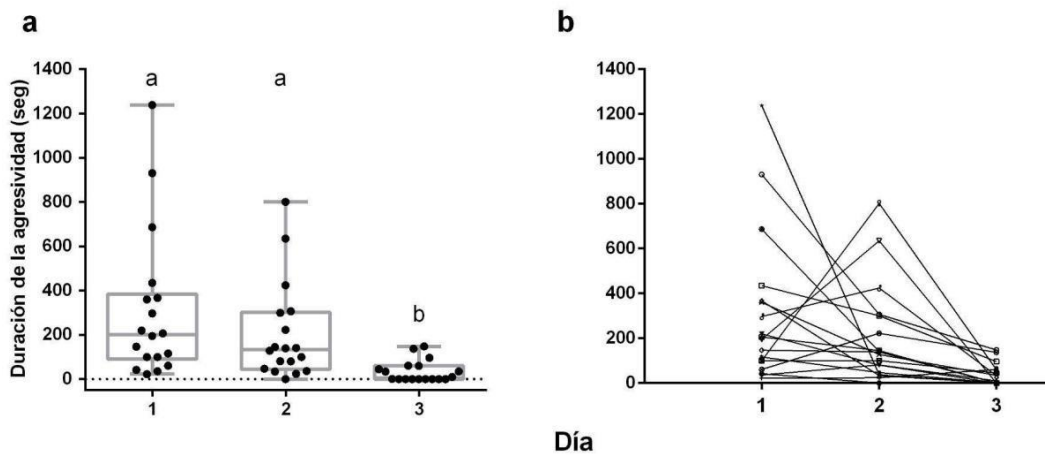


Figura 13. Tiempo total que los individuos pasan realizando despliegues agresivos, en encuentros sucesivos. Los oponentes cambian en el segundo encuentro, repitiendo los mismos en el tercero. a) *Boxplot* para la duración de los comportamientos agresivos en segundos, para los tres encuentros. La banda dentro de la caja representa la mediana, y los bigotes los máximos y mínimos. Los círculos representan el valor cuantificado para cada encuentro. Letras diferentes indican diferencias significativas. (día 1: mediana = 200.5 seg ; RI = 335; N = 20; día 2: mediana 128 seg ; RI = 253; N = 19; día 3: mediana = 1 seg; RI = 61; N = 19). b) Cada línea representa los tres encuentros en donde está involucrado el mismo individuo.

### 2.3.3.3 Mordidas

Se encontraron diferencias en la cantidad de mordidas entre encuentros ( $p$ -valor = 0.0112).

No se encontraron diferencias en la cantidad de mordidas entre el día 1 y el día 2 (día 1: mediana = 7.5 mordidas; RI = 28; N = 18; día 2: mediana = 7 mordidas; RI = 27; N = 17;  $p$ -

valor = 0.4149). El día 2 mostró mayor número de mordidas que el día 3 (día 3: mediana = 0 mordidas; N = 16; *p*-valor = 0.0002). En el día 1 se observaron mayor cantidad de mordidas que el día 3 (*p*-valor = 0.0001). (figura 14).

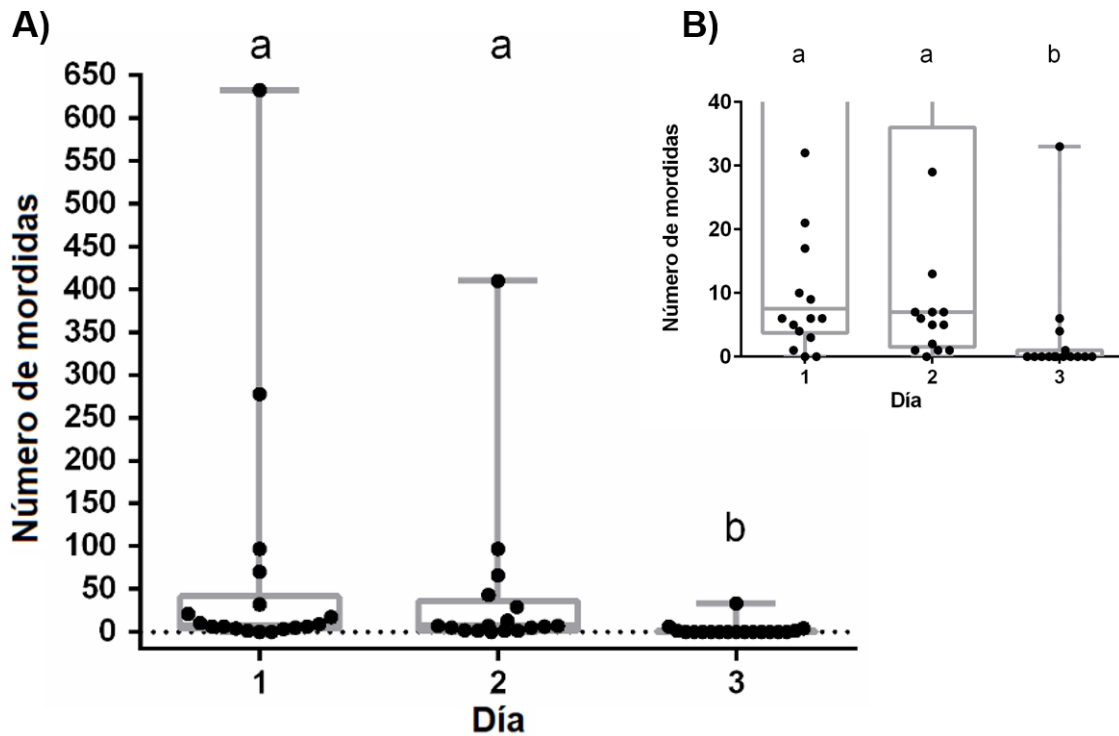


Figura 14. A) *Boxplot* para el número total de mordidas, para los tres encuentros. Los oponentes cambian en el día dos, los que luego se repiten en el tercer día. La banda dentro de la caja representa la mediana, y los bigotes los máximos y mínimos. Los círculos representan el valor medido para cada encuentro. Letras distintas indican diferencias significativas. (día 1: mediana = 7.5 mordidas; RI = 28; N = 18; día 2: mediana = 7 mordidas; RI = 27; N = 17; día 3: mediana = 0 mordidas; N = 16) B) Se presentan los mismos datos que en A, pero mostrando un intervalo de 0-40 mordidas para poder observar las diferencias que no se llegan a observar en la parte A.

Al cambiar el oponente, en 4 de 20 encuentros el ganador del día 1 perdió en el encuentro del segundo día contra un perdedor novedoso. Todos los encuentros del tercer día se resolvieron con el mismo resultado que el segundo.

## 2.4 Conclusión

Cuando dos oponentes pelean, y 24 horas más tarde vuelven a pelear, este nuevo encuentro se resuelve con menores niveles de agresividad (tanto en el tiempo total de comportamientos agresivos, como en el número de mordidas). El mismo efecto se observa en un tercer encuentro, 24 horas más tarde, entre los mismos oponentes. En todos los casos el resultado se repite en los 3 días, siendo el ganador del día 1 también el ganador del segundo y tercer encuentro. Es decir que se observa un efecto de la experiencia previa sobre la dinámica de encuentros sucesivos. Es interesante notar que este efecto solo se observa si el oponente es el mismo. En el caso de cambiar el oponente en el segundo día, no disminuye la agresividad en la resolución de ese segundo encuentro. Esto demuestra que el efecto comportamental observado a las 24 horas, no solo se debe a participar en un encuentro previo, sino también a enfrentarse al mismo oponente. Esto no se debe a diferencias de tamaño entre los oponentes ya que se demostró que no había diferencias ni en peso ni en el largo estándar entre oponentes, ni al cambiar los mismos. En cuanto a la latencia, no se observaron diferencias significativas entre ningún encuentro, lo que indicaría que la motivación para entablar un encuentro agonístico no se modifica con la experiencia previa.

Teniendo en cuenta estos resultados y nuestra hipótesis de que este efecto se debe a la formación de una memoria de largo término asociada al reconocimiento del oponente y las características del encuentro previo, en el siguiente capítulo evaluaremos la duración de este efecto.

## **CAPÍTULO 3**

### **Duración del efecto de la experiencia previa sobre los comportamientos en encuentros sucesivos**

### 3.1 Introducción

No solo puede ser beneficioso aprender y recordar una experiencia previa, si no también poder mantener en el tiempo este aprendizaje. En este sentido la formación y el mantenimiento de memorias a lo largo del tiempo pueden tener un papel muy importante en las interacciones entre individuos, y entre estos con su entorno. Por ejemplo, en un contexto natural, en poblaciones de tiburones (*Carcharhinus melanopterus*) que forman una red social, se observó que cuando se capturaba a ciertos individuos y luego se los devolvía a su entorno, en una captura posterior esos individuos presentaban una menor probabilidad de ser recapturados que los individuos que no habían experimentado una captura y liberación previa, lo que presentaría evidencias de un aprendizaje que les permitiría evitar una futura captura (Mourier *et al.*, 2017). Algo similar ocurre en los peces limpiadores, *Labroides dimidiatus*, donde se observó que, en distintas poblaciones estables de un arrecife, aquellas poblaciones que habían sido expuestas a una situación de captura con una red presentaban comportamientos de evitación frente a dicha red 11 meses más tarde de la primera experiencia, lo cual estaría evidenciando un aprendizaje y recuerdo de largo término (Triki & Bshary, 2020). En individuos sociales la estabilidad de los grupos puede depender de la capacidad de reconocer y recordar a otros individuos familiares; este es el caso de los ratones, donde los individuos de un grupo muestran una memoria hacia un juvenil conespecífico con el cual interactuaron durante 2 minutos, y esta memoria dura por lo menos 7 días (Kogan *et al.*, 2000). En el pez cebra se han encontrado evidencias de memorias de largo término que pueden durar más de 24 horas. Por ejemplo, en un paradigma de condicionamiento al miedo asociativo, en donde los individuos eran entrenados para asociar un contexto con la exposición a sustancia de alarma, se observó un recuerdo del condicionamiento 4 días después del mismo (Baker y Wong, 2019). En otro experimento, larvas de pez cebra preferían

un lugar asociado con una recompensa incluso 36 horas después del condicionamiento. Estas evidencias ponen de manifiesto que el pez cebra es capaz de formar y mantener una memoria por más de 24 horas (Hinz *et al.*, 2013b).

Teniendo en cuenta esto, y que los machos de pez cebra recuerdan al oponente en particular y la pelea previa con el mismo, al menos por 24 horas, podemos plantear como **segundo objetivo** evaluar la retención de la memoria en tiempos más prolongados que 24 horas, realizando el segundo encuentro a las 48 o 72 horas.

## 3.2 Materiales y métodos

### 3.2.1 Animales y mantenimiento

60 machos adultos de pez cebra se utilizaron para estos experimentos (Longitud estándar  $LE=2.53\pm 0.03$  cm, Peso,  $P=0.21\pm 0.009$  g). Los mismos fueron aclimatados un mes antes en acuarios de 20 L con una densidad de 1 individuo por litro. Se mantuvo la temperatura de 25-26 °C, pH= 7.5/7.8 y un fotoperiodo de 14 horas luz: 10 horas oscuridad (Avdesh *et al.*, 2012). Fueron alimentados 2 veces al día con alimento comercial marca Tetra.

### 3.2.2 Protocolo experimental

Siguiendo el protocolo mencionado en la sección 2.2.2, dos machos adultos se aislaron durante 24 horas y luego se los dejó interactuar durante 30 minutos. Luego de ese encuentro se los volvió a separar, para realizar una segunda pelea a las 48 o a las 72 horas (figura 15).

Teniendo en cuenta que se observaron los mismos resultados en una segunda y tercera pelea, a partir de ahora solo se realizará un segundo encuentro.

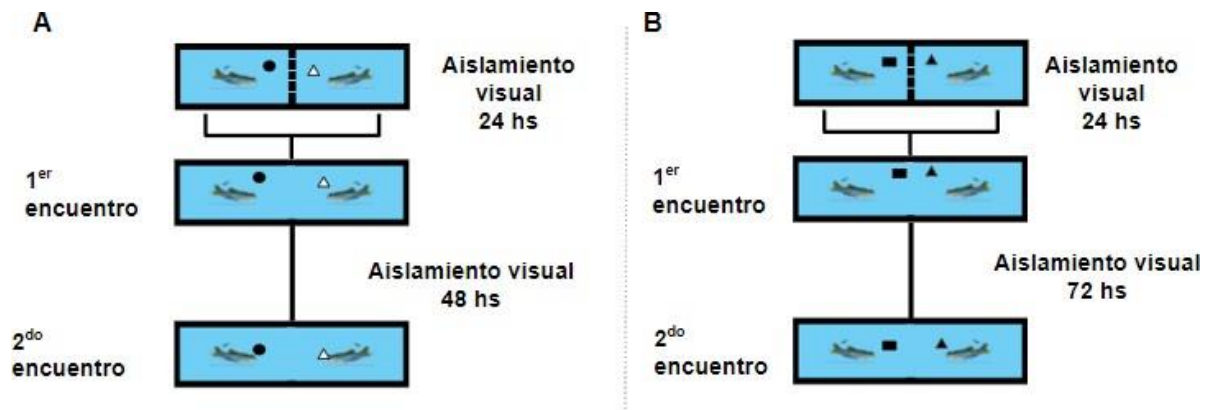


Figura 15. Dispositivo experimental en el que dos individuos son separados por una barrera opaca que permite el flujo de agua. Luego de 24 horas los individuos interactúan por 30 minutos hasta ser aislados nuevamente. Luego de este primer encuentro los individuos son aislados por A) 48 horas o B) 72 horas hasta un nuevo encuentro de 30 minutos.

### 3.2.3 Análisis estadístico

Como los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza (material suplementario, sección 8.4), se llevó a cabo un análisis bayesiano y un análisis no paramétrico de Mann-Whitney. El análisis bayesiano se llevó a cabo para comparar el tiempo total de comportamientos agresivos y el número de mordidas entre encuentros sucesivos. Teniendo en cuenta que la misma pareja de oponentes se enfrentaba en el primer y segundo encuentro, se calculó la diferencia entre estos, para cada par de oponentes. Este índice se comparó contra una media hipotética de 0, es decir, sin diferencias entre primer y segundo encuentro. Se utilizó una *prior* no informativa. Se calcularon el intervalo de credibilidad superior (ICS) e inferior (ICI), como también el p-valor con  $\alpha = 0.05$ , en un testeo de una



cola. Como complemento al análisis bayesiano se realizó un análisis no paramétrico de Wilcoxon (Material suplementario 8.5).

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Variables morfológicas

Se compararon el peso y la longitud estándar entre ganadores y perdedores, no observándose diferencias significativas (ganadores: LE=  $2.55 \pm 0.04$  cm, P=  $0.21 \pm 0.01$  g; Perdedores: LE=  $2.52 \pm 0.03$  cm, P=  $0.200 \pm 0.007$  g; p-valor=0.07).

#### 3.3.2 Efecto de 48 y 72 horas de intervalo entre encuentros agonísticos

Como hemos visto, cuando dos machos de pez cebra se enfrentan, y luego de 24 horas lo vuelven a hacer, este segundo encuentro se resuelve con menores niveles de agresividad, únicamente cuando el oponente es el mismo. Para evaluar si este efecto se observa con intervalos mayores a 24 horas, se realizó un segundo encuentro a las 48 o 72 horas.

En cuanto al intervalo de 48 horas, se observó una reducción en los niveles de agresividad en el segundo encuentro, siendo la diferencia entre ambos distinta de cero, tanto para el tiempo total de comportamientos agresivos (ICI=94.47 seg, ICS=256 seg, Z=-3.56, n=15, p-valor=0.00017) (figura 16), como para el número de mordidas (ICI=6.85 mordidas, ICS=76.41 mordidas, Z=-1.96, n=15 p-valor=0.024) (figura 17). En todos los casos el resultado se mantuvo en el segundo encuentro.

## Intervalo de 48 horas

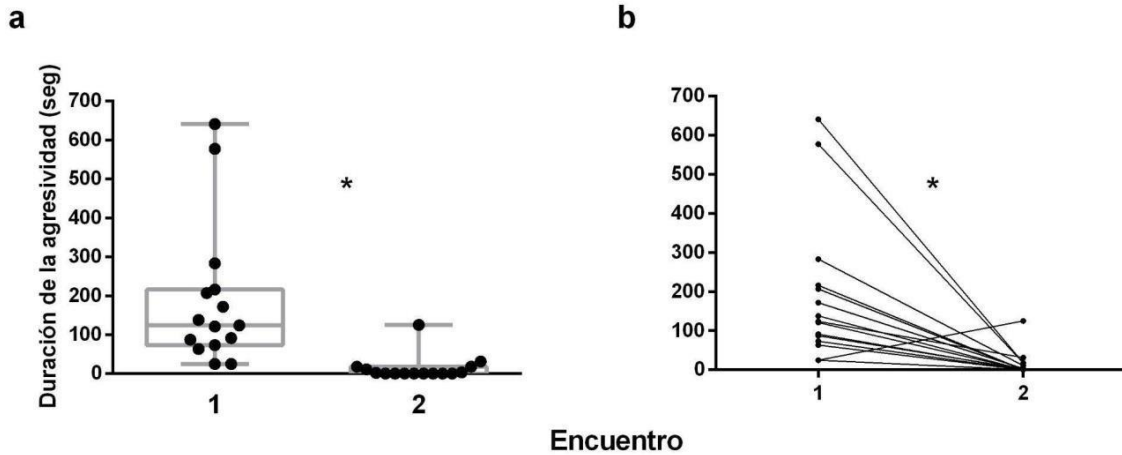


Figura 16. Tiempo total que los individuos pasan realizando despliegues agresivos, en encuentros sucesivos con un intervalo de 48 horas entre encuentro. a) *Boxplot* para la duración de los comportamientos agresivos en segundos, para los dos encuentros. La banda dentro de la caja representa la mediana, y los bigotes los máximos y mínimos. Los círculos representan el valor cuantificado para cada encuentro. El asterisco indica diferencias significativas (Encuentro 1: 124 seg, RI=131,5, N=15; Encuentro 2: 0 seg, RI=14,5; N=15; Se presenta la mediana y el Rango Intercuartílico). b) Cada línea representa un encuentro entre los mismos oponentes.

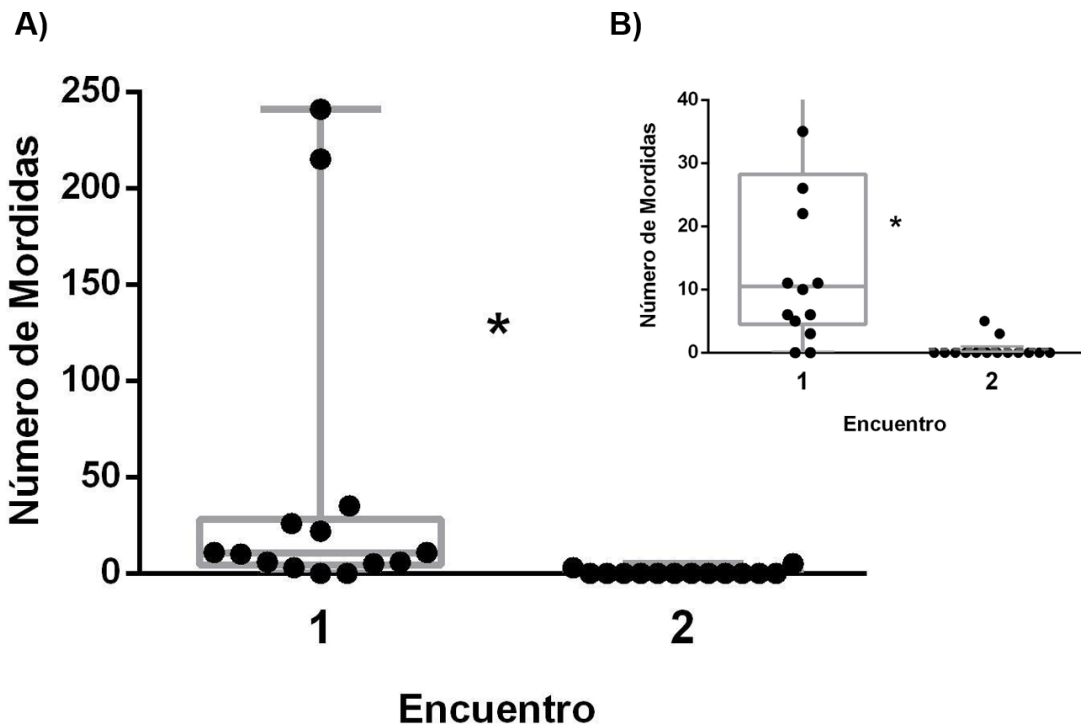


Figura 17. *Boxplot* para el número de mordidas entre los dos encuentros con un intervalo de 48 horas. La banda dentro de la caja representa la mediana, y los bigotes los máximos y mínimos. Los círculos representan el valor cuantificado para cada encuentro. El asterisco indica diferencias significativas (Encuentro1:10.5 mordidas, RI=19.75; Encuentro 2: 0 mordidas, RI=0; N=14; Se presenta la mediana y el Rango Intercuartílico). B) Se

presentan los mismos datos que en A, pero mostrando un intervalo de 0-40 mordidas para poder observar las diferencias que no se llegan a observar en la parte A

Al realizar el mismo experimento pero con un intervalo de 72 horas, nuevamente el segundo encuentro se resolvió con menores niveles de agresividad, tanto para el tiempo total de comportamientos agresivos (ICI=72.90 seg, ICS=437.03 seg,  $Z=-2.30$ ,  $n=15$ ,  $p\text{-valor}=0.010$ ) (figura 18) como para el número de mordidas (ICI=48.47 mordidas, ICS=243.77 mordidas,  $Z=-2.46$ ,  $n=15$ ,  $p\text{-valor}=0.006$ ) (figura 19). En todos los casos el resultado se mantuvo en el segundo encuentro.

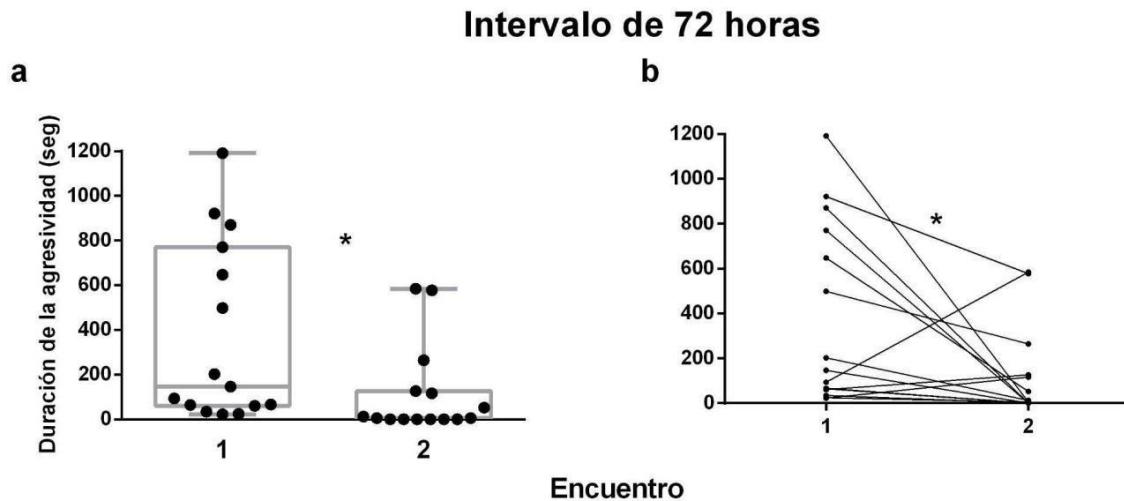


Figura 18. Tiempo total que los individuos pasan realizando despliegues agresivos, en encuentros sucesivos con un intervalo de 72 horas entre encuentro. a) *Boxplot* para la duración de los comportamientos agresivos en segundos, para los dos encuentros. La banda dentro de la caja representa la mediana, y los bigotes los máximos y mínimos. Los círculos representan el valor cuantificado para cada encuentro. El asterisco indica diferencias significativas (Encuentro 1: 146 seg,  $RI=646.5$ ,  $N=15$ ; Encuentro 2: 5 seg,  $RI=121$ ;  $N=15$ ; Se presenta la mediana y el Rango Intercuartílico). b) Cada línea representa un encuentro entre los mismos oponentes.

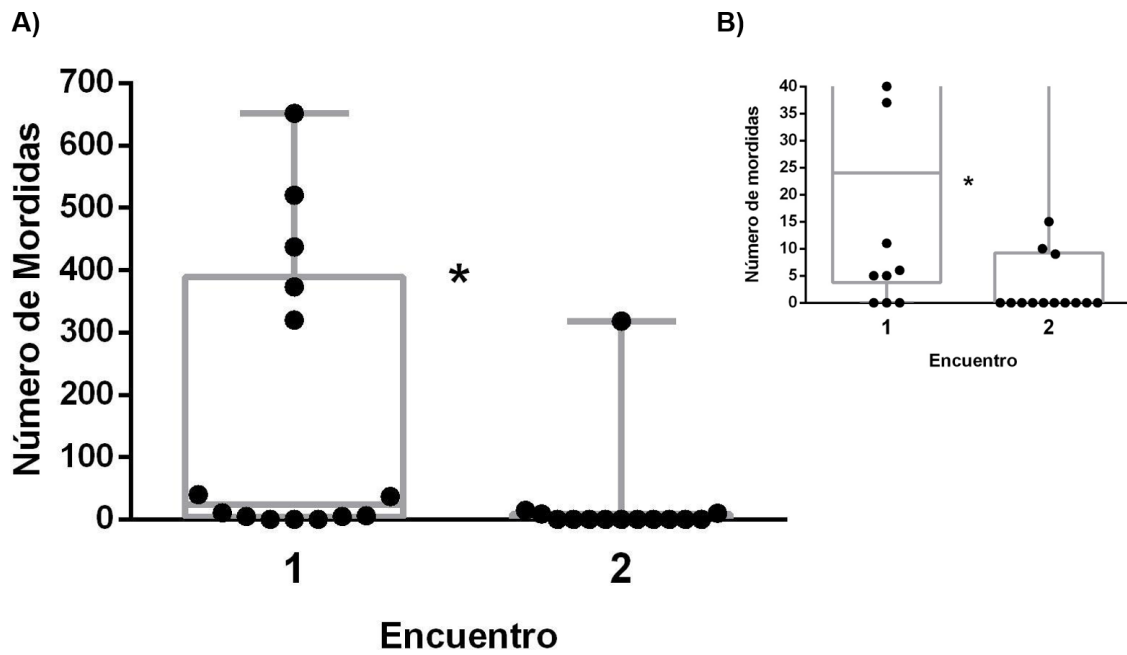


Figura 19. *Boxplot* para el número de mordidas entre los dos encuentros con un intervalo de 72 horas. La banda dentro de la caja representa la mediana, y los bigotes los máximos y mínimos. Los círculos representan el valor cuantificado para cada encuentro. El asterisco indica diferencias significativas (Encuentro1:24 mordidas, RI=254.75; Encuentro 2: 0 mordidas, RI=6.75; N=14; Se presenta la mediana y el Rango Inter cuartílico). B) Se presentan los mismos datos que en A, pero mostrando un intervalo de 0-40 mordidas para poder observar las diferencias que no se llegan a observar en la parte A.

### 3.4 Conclusión

Con intervalos de 24 horas entre encuentros se había observado una reducción en los niveles de agresividad y las mordidas en la resolución del segundo conflicto entre los mismos oponentes. Este efecto se observó incluso con intervalos mayores a 24 horas, tanto de 48 como de 72 horas. Esto demuestra que el efecto de la experiencia previa relacionado a reconocer y recordar un oponente en particular y una pelea previa dura, por lo menos, 72 horas.

Siendo entonces un efecto del reconocimiento del oponente y el resultado previo de una pelea, lo cual perdura al menos 72 horas, avanzamos al siguiente objetivo de caracterizar el rol de los receptores NMDA en la consolidación de la memoria asociado a la interacción agonística inicial.

## **CAPÍTULO 4**

### **Inhibición de la formación de memoria de largo término**

## 4.1 Introducción

Hemos mencionado que se ha estudiado el papel de los receptores NMDA en la consolidación de memorias de largo término y la utilización de antagonistas de estos receptores para inhibir su formación (McGaugh e Izquierdo, 2000). Una droga muy utilizada para este propósito es MK-801, la cual es un antagonista no competitivo de estos receptores, que se une al interior del canal evitando el flujo de calcio y la consecuente potenciación de largo término (Nicoll & Malenka, 1999). Se ha observado que el pez cebra puede incorporar esta droga cuando está disuelta en agua, y este tratamiento tiene un efecto amnésico. Blank y colaboradores (2009) encontraron que en experimentos de evitación inhibitoria, individuos que eran entrenados para asociar un shock eléctrico con un compartimento oscuro, mostraban una mayor latencia a entrar en dicho compartimento durante la evaluación, luego de un único entrenamiento. Inmediatamente después del entrenamiento un grupo de peces era expuesto a agua, mientras que otro grupo era expuesto a una solución 20  $\mu\text{M}$  de MK-801 durante 15 minutos. Al realizar la evaluación a las 24 horas, solo en el grupo tratado con MK-801 no observaron diferencias entre el entrenamiento y el testeo, poniendo de manifiesto el efecto de inhibir los receptores de NMDA sobre la formación de memoria de largo término (Blank *et al.*, 2009).

En otro experimento, donde los individuos aprenden a asociar un estímulo neutro con la presencia de conoespecíficos en un laberinto, luego de 4 días de entrenamiento recordaban lo aprendido a las 24 horas, excepto cuando eran tratados inmediatamente después del aprendizaje con 20  $\mu\text{M}$  de MK-801 durante 30 minutos (Sison y Gerlai, 2011a), sumando evidencia acerca del efecto amnésico de esta concentración de MK-801 en el pez cebra.

Teniendo en cuenta que hemos observado cómo la experiencia previa tiene un efecto a largo plazo sobre la dinámica de resolución de un segundo encuentro agonístico, podemos planteamos el **tercer objetivo** de evaluar como la exposición de los individuos a un antagonista de receptores de NMDA, MK-801, afecta la formación de memoria de largo término relacionada a interacciones sociales. Como objetivo previo, nos planteamos evaluar distintos tiempos de exposición para encontrar el tratamiento adecuado para nuestro protocolo.

## 4.2 Materiales y métodos

### 4.2.1 Animales y mantenimiento

120 machos adultos de pez cebra se utilizaron para esta serie de experimentos (LE=  $2.45 \pm 0.023$  cm, Peso, P=  $0.196 \pm 0.005$ g). Los mismos fueron aclimatados un mes antes en acuarios de 20 L con una densidad de 1 individuo por litro. Se mantuvo la temperatura de 25-26 c, pH= 7.5/7.8 y un fotoperiodo de 14 horas luz: 10 horas oscuridad (Avdesh *et al.*, 2012). Fueron alimentados 2 veces al día con alimento comercial marca Tetra.



#### 4.2.2 Protocolo experimental

Se siguió el protocolo mencionado en 2.2.2 pero en este caso, inmediatamente después del primer encuentro se trasladaron a los individuos a un acuario individual (100 ml, 6 cm (alto) x 10 cm (largo) x 10 cm (ancho)) conteniendo agua o solución 20  $\mu$ M de MK-801, disuelto en agua. En una primera serie de experimentos se realizó un tratamiento por 15 minutos. Dicha concentración y tiempo de exposición fueron elegidos teniendo en cuenta bibliografía previa (Blank *et al.*, 2009). Como 15 minutos no fueron suficiente para observar un efecto amnésico, se realizó una segunda serie de experimentos, aumentando la exposición a 60 minutos. Luego de un tratamiento de 15 o 60 minutos, los individuos fueron devueltos a su acuario, donde quedaron aislados por 24 o 48 horas hasta el segundo encuentro contra el mismo oponente. Luego del tratamiento, se filmó 5 minutos a los individuos separados por la barrera en la pecera experimental. Repitiendo esta filmación en los 5 minutos anteriores a remover la barrera, previo al segundo encuentro. Ambos periodos de 5 minutos fueron analizados con el programa *ethovision* para observar un posible efecto sobre los comportamientos individuales de los peces (material suplementario 8.2) (figura 20).

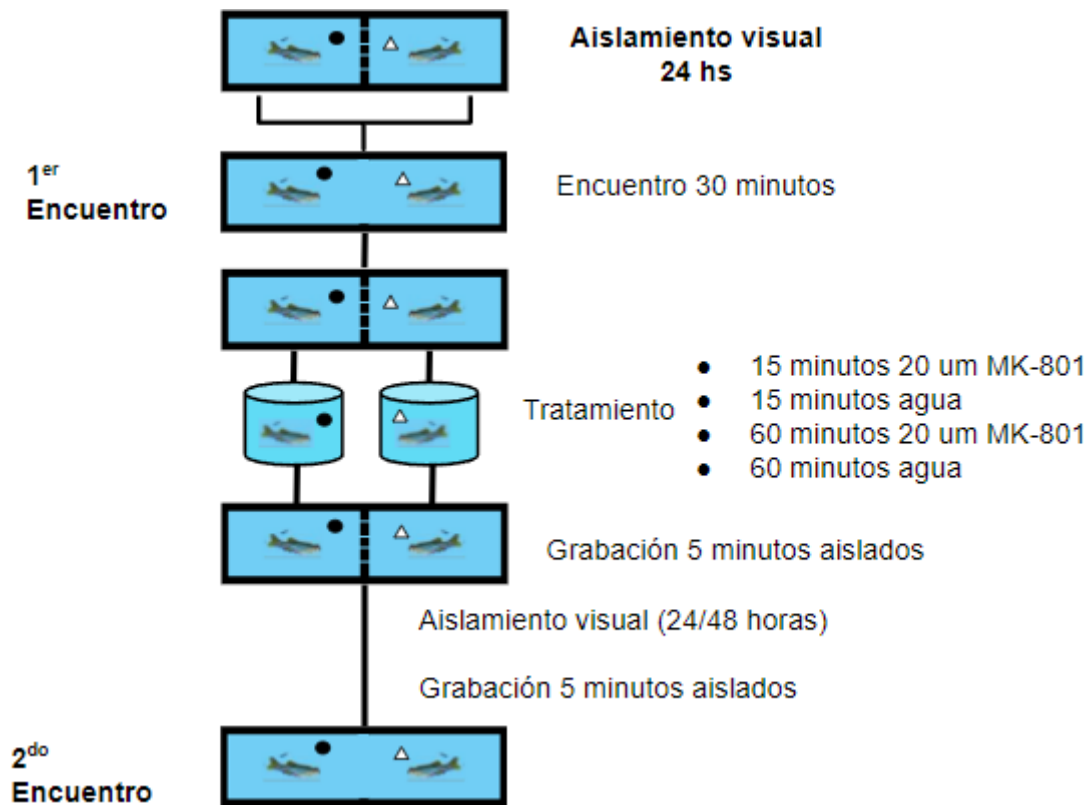


Figura 20. Dispositivo experimental donde dos individuos son separados mediante una barrera opaca que permite el flujo de agua. Luego de 24 horas, interactúan durante 30 minutos, se los separa e inmediatamente después son transferidos a una pecera individual y tratados con 100 ml de agua o MK-801 por 15 o 60 minutos. Luego de este periodo se devuelve a los individuos a su pecera, se los filma separados por 5 minutos para dejarlos aislados por 24 o 48 horas hasta el segundo y último encuentro. Previo a esto se vuelve a filmar a los peces por 5 minutos.

Todos los experimentos se llevaron a cabo en el mismo rango horario (10:30 am-13 pm).

Luego del último encuentro, los individuos se sacrificaron con un shock frío seguido de corte cervical, para confirmar el sexo, pesar y medir los individuos y tomar muestras de cerebro para posterior medición de actividad neuronal, como será explicado en el siguiente capítulo.

### 4.2.3 Tratamiento con MK-801

La solución de MK-801 se preparó disolviendo 0.675 mg de (+) MK-801 hydrogen maleate (Sigma-Aldrich), (+)-5-methyl-10,11-dihydroxy-5H-dibenzo(a,d)cyclohepten-5,10-imine, en 100 ml de agua filtrada (Obteniendo una concentración de 20  $\mu\text{M}$ ). Se eligió inicialmente un tratamiento por 15 minutos teniendo en cuenta bibliografía previa (Blank *et al* 2009). Como no se obtuvo el efecto amnésico esperado, se realizó un tratamiento más prolongado, de 60 minutos. Al observar que sin tratamiento (o tratando con agua) el segundo encuentro se resuelve con menores niveles de agresividad, y que este efecto se pierde si se presenta un oponente novedoso (Capítulo 2), consideramos que un mantenimiento de dichos niveles de agresividad en el segundo encuentro sería indicador de un efecto amnésico, ya que, en ese caso, al segundo día no estarían recordando al oponente.

### 4.2.4 Análisis estadístico

Como los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza (material suplementario, sección 8.4), se llevó a cabo un análisis bayesiano y un análisis no paramétrico de Mann-Whitney. El análisis bayesiano se llevó a cabo para comparar el tiempo total de comportamientos agresivos y el número de mordidas entre encuentros sucesivos. Teniendo en cuenta que la misma pareja de oponentes se enfrentaba en el primer y segundo encuentro, se calculó la diferencia entre estos, para cada par de oponentes. Este índice se comparó contra una media hipotética de 0, es decir, sin diferencias entre primer y segundo encuentro. Se utilizó una *prior* no informativa. Se calcularon el intervalo de credibilidad superior (ICS) e inferior (ICI), como también el p-valor con  $\alpha = 0.05$ , en un testeo de una cola. Como complemento al análisis bayesiano se realizó un análisis no paramétrico de Wilcoxon (material suplementario, sección 8.5).

## 4.3 Resultados

### 4.3.1 Variables morfológicas

Se compararon el peso y la longitud estándar entre ganadores y perdedores, no observándose diferencias significativas (Perdedores  $P=0.188 \pm 0.007$  g; Ganadores  $P=0.203 \pm 0.007$  g;  $N=80$ ,  $p$ -valor= $0.077$ . Perdedores  $LE=2.41 \pm 0.03$  cm; Ganadores  $LE=2.48 \pm 0.03$  cm;  $N=80$ ,  $p$ -valor= $0.095$ ).

### 4.3.2 Efecto de bloquear los receptores NMDA sobre la formación de memoria de largo término

#### 4.3.2.1 Tratamiento 15 minutos de MK-801

Para poder observar el efecto de inhibir la formación de memoria de largo término sobre los cambios comportamentales debido a la experiencia previa y el reconocimiento del oponente, se realizó un tratamiento durante 15 minutos en agua, o en solución de  $20 \mu\text{M}$  MK-801 inmediatamente después del primer encuentro.

Los individuos tratados con 15 minutos de agua resolvieron el segundo encuentro con menores niveles de agresividad para el tiempo total de comportamientos agresivos (ICI= $62.12$  seg, ICS= $249.11$  seg,  $Z=-2.73$ ,  $n=10$ ,  $p$ -valor= $0.0030$ ) (figura 21). Cuando fueron tratados con 15 minutos de MK-801, se observaron los mismos resultados que el tratamiento con agua, el segundo encuentro se resolvió con menores niveles de agresividad para el tiempo total de comportamientos agresivos (ICI= $97.67$  seg, ICS= $370.48$  seg,  $Z=-2.82$ ,  $n=10$ ,  $p$ -valor= $0.0023$ ) (figura 22). Los mismos resultados se obtuvieron al analizar el número de

mordidas para el tratamiento con agua (ICI=11.96 mordidas, ICS=73.4 mordidas,  $Z=-2.28$ ,  $n=10$ ,  $p\text{-valor}=0.011$ ) (figura 23a) como para el tratamiento MK-801 (ICI=39.9 mordidas, ICS=133.9 mordidas,  $Z=-3.04$ ,  $n=10$ ,  $p\text{-valor}=0.001$ ) (figura 23b). En todos los casos el ganador del primer encuentro también ganó el segundo.

### 15 minutos agua

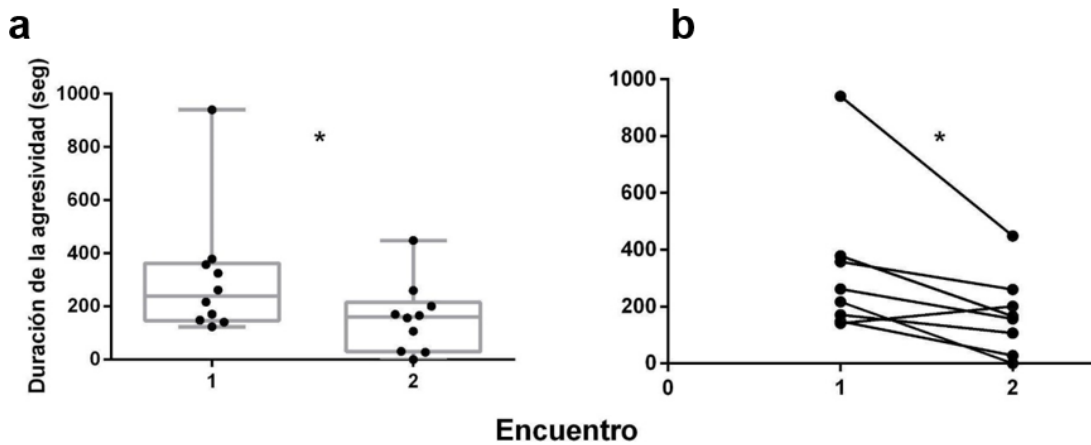


Figura 21. Tiempo total que los individuos pasan realizando despliegues agresivos, en encuentros sucesivos con un intervalo de 24 horas, para individuos tratados previamente con 15 min agua. a) *Boxplot* para la duración de los comportamientos agresivos en segundos, para los dos encuentros. La banda dentro de la caja representa la mediana, y los bigotes los máximos y mínimos. Los círculos representan el valor cuantificado para cada encuentro. El asterisco indica diferencias significativas (Encuentro 1: 239.5 seg, RI=195.2, N=10; Encuentro 2: 161.5 seg, RI=143.2; N=10; Se presenta la mediana y el Rango Intercuartílico) b) Cada línea representa un encuentro entre los mismos oponentes.

## 15 minutos MK-801

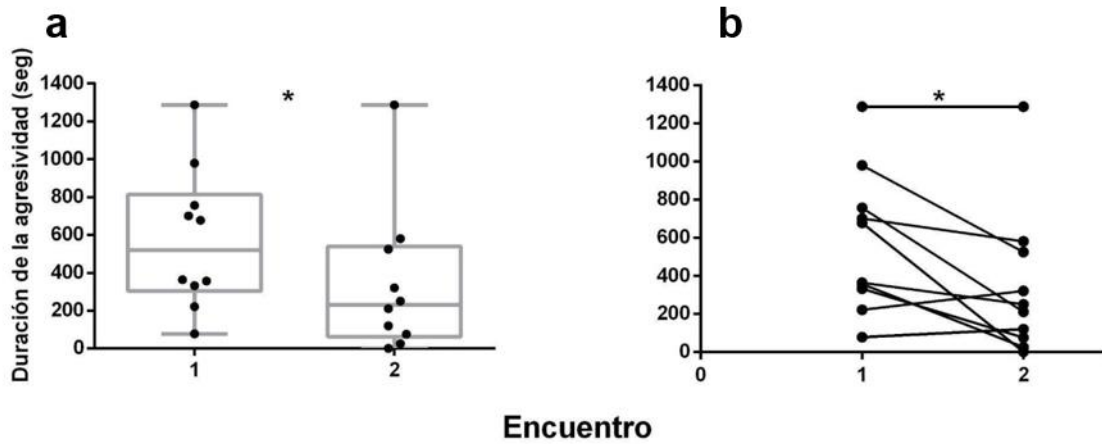


Figura 22. Tiempo total que los individuos pasan realizando despliegues agresivos, en encuentros sucesivos con un intervalo de 24 horas, para individuos tratados previamente con 15 min MK-801. a) *Boxplot* para la duración de los comportamientos agresivos en segundos, para los dos encuentros. La banda dentro de la caja representa la mediana, y los bigotes los máximos y mínimos. Los círculos representan el valor cuantificado para cada encuentro. El asterisco indica diferencias significativas (Encuentro 1: 520 seg, RI=404.1, N=10; Encuentro 2: 230 seg, RI=386.7; N=10; Se presenta la mediana y el Rango Inter cuartílico). b) Cada línea representa un encuentro entre los mismos oponentes

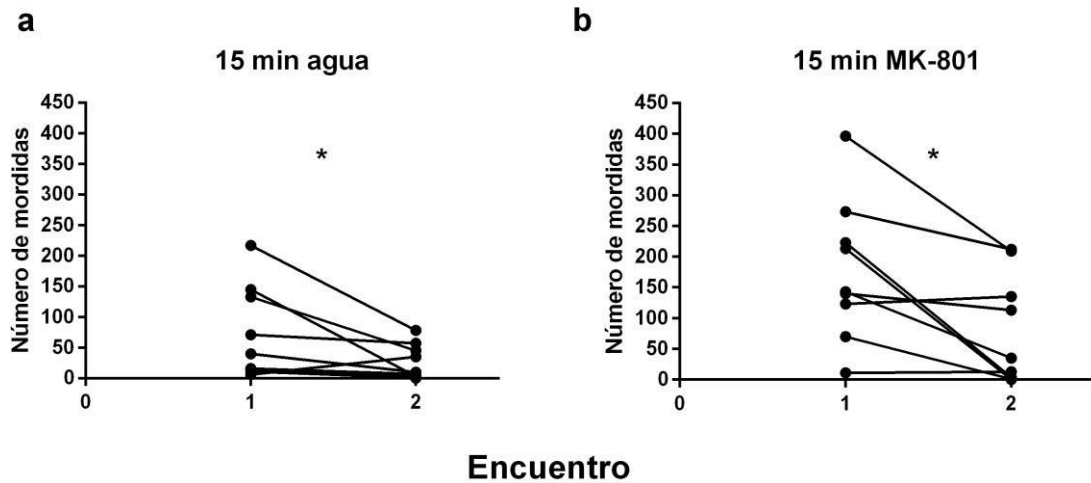


Figura 23. Número de mordidas en encuentros sucesivos con un intervalo de 24 horas, para individuos tratados previamente con 15 min: a) agua (Encuentro 1:28 mordidas, RI=195.2; Encuentro 2: 8.5 mordidas, RI=143.2; N=10), o b) MK-801 801 (Encuentro1:143 mordidas, RI=100; Encuentro 2: 35 mordidas, RI=131; N=10; Se presenta la mediana y el Rango Inter cuartílico). Cada línea representa un encuentro entre los mismos oponentes. El asterisco indica diferencias significativas

Teniendo en cuenta que no se observaron los efectos esperados con el tratamiento de 15 minutos MK-801 (mantenimiento de los niveles de agresividad del segundo día), aumentamos el tiempo de exposición, repitiendo la evaluación pero con un tratamiento de 60 minutos de agua o solución de MK-801.

#### *4.3.2.2 Tratamiento 60 minutos MK-801 con 24 horas de intervalo entre encuentros*

Como esperábamos, en el tratamiento de 60 minutos en agua inmediatamente después del primer encuentro, el segundo se resolvió con menores niveles de agresividad para el tiempo total de comportamientos agresivos (ICI=143.21 seg, ICS=294.06 seg, Z=-4.76, n=10, p-valor= $9.29 \times 10^{-7}$ ) (figura 24). Sin embargo al tratar a los individuos con la solución de MK-801 durante 60 minutos, no se encontraron diferencias en los niveles de agresividad entre el primer y segundo encuentro para el tiempo total de comportamientos agresivos (ICI= -168.46 seg, ICS=522.34 seg, Z=-0.84, n=10, p-valor= 0.1997) (figura 25). Al analizar el número de mordidas se encontraron diferencias para el tratamiento con agua (ICI=17.09 mordidas, ICS=115.78 mordidas, Z=-2.21, n=10, p-valor=0.013) (figura 26a), pero no se encontraron diferencias en el tratamiento con MK-801 (ICI= -38.71 mordidas, ICS=198.28 mordidas, Z=-1.10, n=10, p-valor=0.134) (figura 26b).

En todos los encuentros tratados con agua, el ganador del primer encuentro también ganó el segundo. Pero cuando fueron tratados con MK-801, en un encuentro se observó una reversión, es decir el ganador del primer encuentro perdió el segundo contra el mismo oponente.

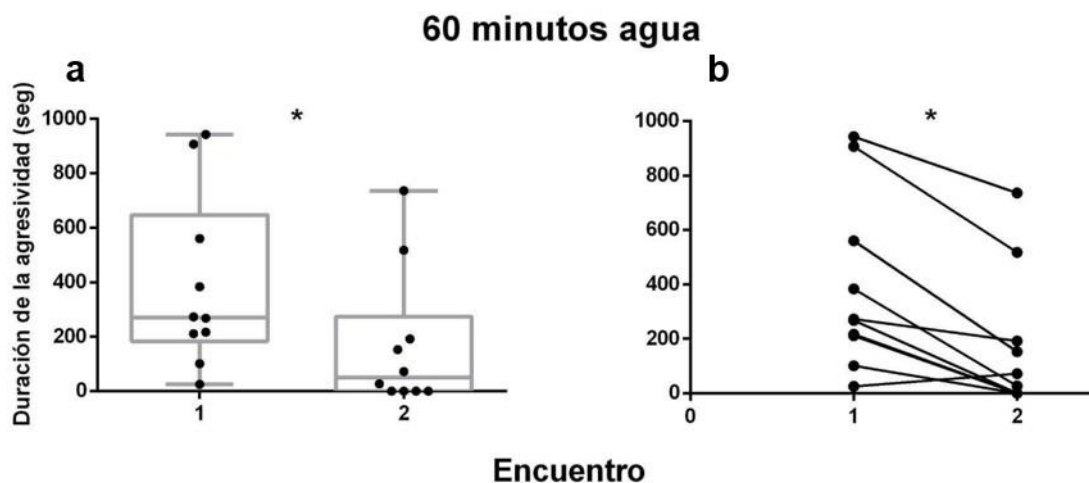


Figura 24. Tiempo total que los individuos pasan realizando despliegues agresivos, en encuentros sucesivos con un intervalo de 24 horas, para individuos tratados previamente con 60 min agua. a) *Boxplot* para la duración de los comportamientos agresivos en segundos, para los dos encuentros. La banda dentro de la caja representa la mediana, y los bigotes los máximos y mínimos. Los círculos representan el valor cuantificado para cada encuentro. El asterisco indica diferencias significativas (Encuentro 1: 270.5 seg, RI=303.5; Encuentro 2: 49.5 seg, RI=182.2; N=10; Se presenta la mediana y el Rango Inter-cuartílico). b) Cada línea representa un encuentro entre los mismos oponentes

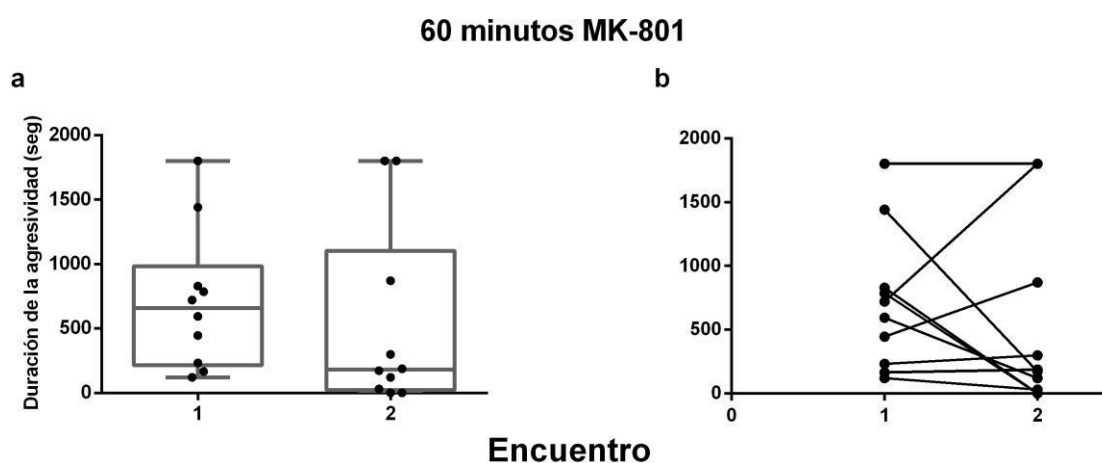


Figura 25. Tiempo total que los individuos pasan realizando despliegues agresivos, en encuentros sucesivos con un intervalo de 24 horas, para individuos tratados previamente con 60 min MK-801. a) *Boxplot* para la duración de los comportamientos agresivos en segundos, para los dos encuentros. La banda dentro de la caja representa la mediana, y los bigotes los máximos y mínimos. Los círculos representan el valor cuantificado para cada encuentro. No se encontraron diferencias significativas (Encuentro 1: 657 seg, RI=532.7; Encuentro 2: 180 seg, RI=675.5; N=10; Se presenta la mediana y el Rango Inter-cuartílico). b) Cada línea representa un encuentro entre los mismos oponentes



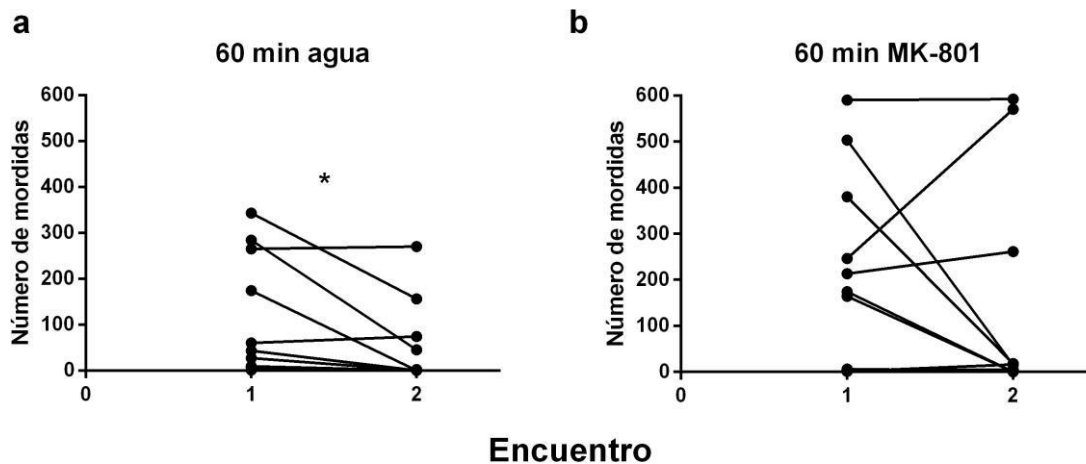


Figura 26. Número de mordidas en encuentros sucesivos con un intervalo de 24 horas, para individuos tratados previamente con 60 min: a) agua (Encuentro 1: 51.5 mordidas, RI=303.5; Encuentro 2: 1 mordidas, RI=182.2; N=10; Se presenta la mediana y el Rango Intercuartílico), o b) MK-801 (Encuentro 1: 193.5 mordidas, RI=532.7; Encuentro 2: 15.5 mordidas, RI=675.5; N=10; Se presenta la mediana y el Rango Intercuartílico). Cada línea representa un encuentro entre los mismos oponentes. El asterisco indica diferencias significativas

Es interesante notar que, en este tratamiento, en 7 de 17 experimentos los individuos al segundo día no presentaron comportamientos agresivos y mostraron un déficit social, por lo que dichos encuentros fueron descartados. Definimos al déficit social como la ausencia de interacción social como esta descrita en el etograma de Oliveira *et al* 2011. Este podría ser un posible efecto no específico de la droga, la cual además de funcionar como agente amnésico, estaría teniendo un efecto sobre los comportamientos sociales en algunos peces, posiblemente en aquellos más susceptibles al tratamiento. Trabajos previos sugieren que MK-801 podría disminuir las interacciones sociales en esta especie a corto plazo (Zimmermann *et al.*, 2016). Para evitar estos posibles efectos inespecíficos se realizó el mismo experimento, pero dejando un intervalo de 48 horas entre encuentros, dado que habíamos demostrado que se mantiene el efecto en la dinámica de los encuentros agonísticos (Sección 3.3.2) y consideramos que es un tiempo suficiente para que se disipe el efecto inespecífico.

#### *4.3.2.3 Efecto del tratamiento por 60 minutos con MK-801 en encuentros de 48 horas de intervalo*

Cuando las parejas peleaban y 48 horas después se volvían a enfrentar al mismo oponente, este segundo encuentro se resolvió con menores niveles de agresividad para el tiempo total de comportamientos agresivos (ICI=84.33 seg, ICS= 321.73 seg, Z=-2.81, n=10, p-valor=0.0024) (figura 27). Sin embargo, al tratar inmediatamente después del primer encuentro con MK-801, no se encontraron diferencias en los niveles de agresividad entre encuentros en el tiempo total de comportamientos agresivos (ICI= -166.99 seg, ICS=412.15 seg, Z=-0.69, n=10, p-valor=0.2431) (figura 28). Al analizar el número de mordidas se encontraron diferencias significativas para los individuos sin tratamiento (ICI=4.3 mordidas, ICS= 17.4 mordidas, Z=-2.71, n=10, p-valor=0.003) (figura 29a) pero no para los tratados con MK-801 (ICI=-41.7 mordidas, ICS=168.2 mordidas, Z=-0.99, n=10, p-valor=0.161) (figura 29b).

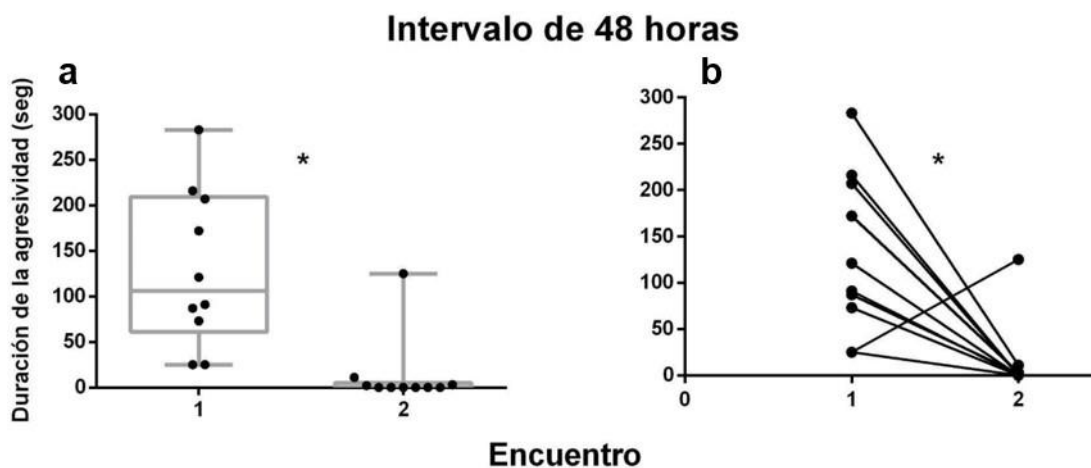


Figura 27. Tiempo total que los individuos pasan realizando despliegues agresivos, en encuentros sucesivos con un intervalo de 48 horas, para individuos sin tratamiento. a) *Boxplot* para la duración de los comportamientos agresivos en segundos, para los dos encuentros. La banda dentro de la caja representa la mediana, y los bigotes los máximos y mínimos. Los círculos representan el valor cuantificado para cada encuentro. El asterisco indica diferencias significativas (Encuentro 1: 106 seg, RI=121.7; Encuentro 2: 0 seg, RI=2.7; N=10; Se presenta la mediana y el Rango Intercuartílico). b) Cada línea representa un encuentro entre los mismos oponentes

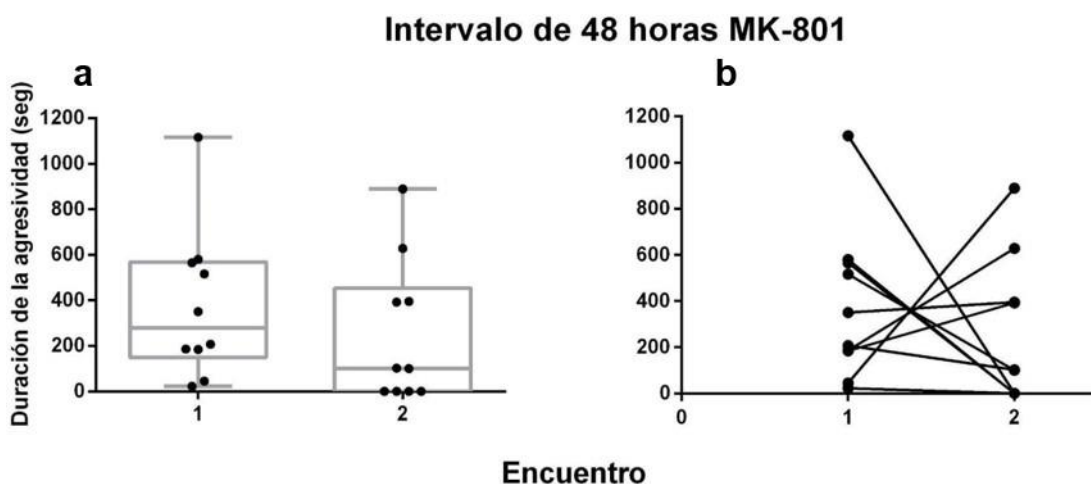


Figura 28. Tiempo total que los individuos pasan realizando despliegues agresivos, en encuentros sucesivos con un intervalo de 48 horas, para individuos tratados previamente con 60 MK-801. a) *Boxplot* para la duración de los comportamientos agresivos en segundos, para los dos encuentros. La banda dentro de la caja representa la mediana, y los bigotes los máximos y mínimos. Los círculos representan el valor cuantificado para cada encuentro. No se encontraron diferencias significativas 801 (Encuentro 1: 278.5 seg, RI=368.2; Encuentro 2: 101 seg, RI=394.2; N=10; Se presenta la mediana y el Rango Intercuartílico). b) Cada línea representa un encuentro entre los mismos oponentes

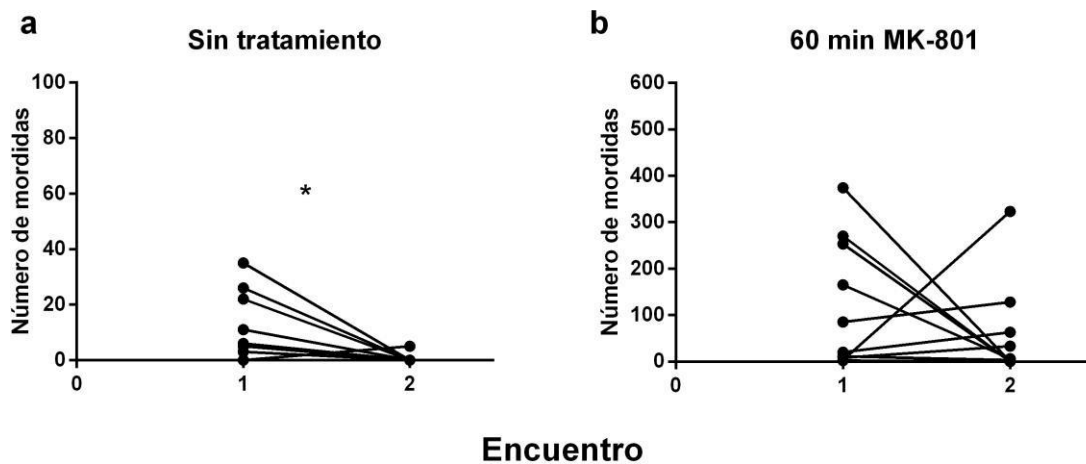


Figura 29. Número de mordidas en encuentros sucesivos con un intervalo de 48 horas, para individuos a) sin tratamiento (Encuentro 1: 6 mordidas, RI=121.7; Encuentro 2: 0 mordidas, RI=2.75; N=10) o b) MK-801 (Encuentro 1: 52.5 mordidas, RI=368.2; Encuentro 2: 4.5 mordidas, RI=394.2, N=10; Se presenta la mediana y el Rango Intercuartílico). Cada línea representa un encuentro entre los mismos oponentes. El asterisco indica diferencias significativas

En este caso todas las parejas de oponentes mostraron comportamientos agresivos en el segundo encuentro (o resolución instantánea), y no mostraron déficits sociales, manifestando el efecto de inhibir la formación de memoria de largo término, sin los efectos inespecíficos sobre los comportamientos.

Los mismos resultados se obtuvieron al analizar los datos utilizando un análisis no paramétrico, Wilcoxon signed rank test (material suplementario, sección 8.5)

## 4.4 Conclusión

Al realizar un tratamiento con MK-801 inmediatamente después del primer encuentro, esperábamos observar un efecto amnésico en el segundo día, evidenciado por el mantenimiento de los niveles de agresividad, es decir un tiempo total de comportamientos agresivos y un número de mordidas similar entre el primer y segundo encuentro, como se observó al presentarles un oponente novedoso (capítulo 2.3.3). Sin embargo, al realizar un tratamiento de 15 minutos con MK-801 no se vio un efecto sobre la formación de memoria, sino que se observó una resolución menos agresiva en el segundo conflicto, similar a realizar un tratamiento únicamente con agua. Al aumentar la exposición a 60 minutos si se observó un efecto, ya que en este caso el segundo encuentro frente al mismo oponente no se resuelve con menores niveles de agresividad como se venía observando sin tratamiento, sino que se observa el mismo efecto que al presentarle un oponente novedoso. Sin embargo, también provoca efectos inespecíficos comportamentales, observándose una disminución en las interacciones sociales y un nado aletargado durante el segundo encuentro. Estos efectos comportamentales se dejan de observar al realizar el mismo tratamiento, pero realizando el segundo encuentro a las 48 horas, tiempo para que desaparezca el efecto inespecífico permitiendo que los individuos recuperen su capacidad para la interacción social. Esto demostraría que la memoria relacionada a reconocer y recordar un oponente en particular y/o una pelea previa puede ser prevenida si se bloquean los receptores NMDA inmediatamente después del primer encuentro agonístico. En su conjunto podemos concluir que la activación de los receptores NMDA es condición necesaria para el mantenimiento de la memoria generada luego de la primera interacción entre los individuos de la día.

# **CAPÍTULO 5**

## **Patrones de activación cerebral**

## 5.1 Introducción

La anatomía del cerebro del pez cebra ha sido ampliamente estudiada, así como también los núcleos cerebrales que componen las distintas regiones de este. Siguiendo un eje anteroposterior podemos distinguir los bulbos olfatorios seguidos por el telencéfalo, el tectum óptico (el cual cubre dorsalmente al diencefalo, que incluye al hipotálamo y a la habénula) y el cuerpo cerebellar (Wulliman *et al.*, 2012) (figura 30).

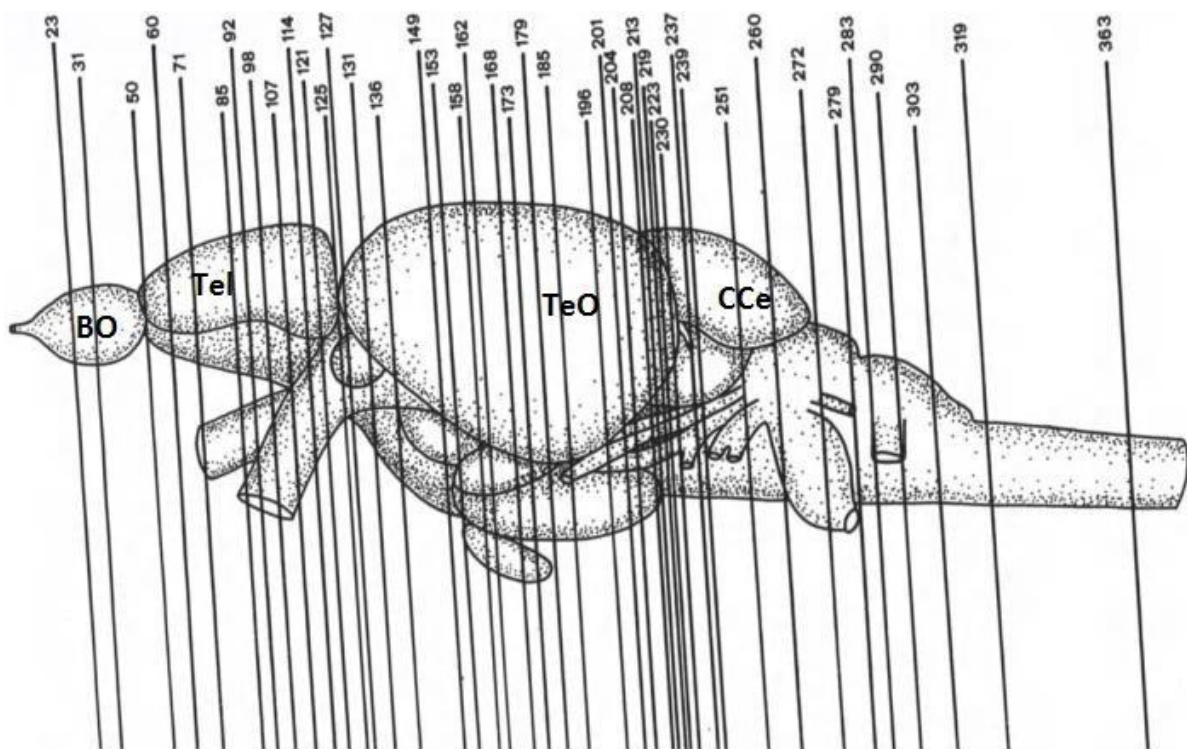


Figura 30. Vista lateral del cerebro de pez cebra donde se destacan los bulbos olfatorios (BO), el Telencéfalo (Tel), el Tectum Óptico (TeO) y el cuerpo cerebellar (CCe). Las líneas numeradas marcan los cortes expuestos en el atlas, algunos de los cuales mostraremos en otra imagen. Modificado de Wulliman *et al.*, 2012.

Evidencias previas en mamíferos demostraron que ciertas regiones cerebrales estarían involucradas en comportamientos y aprendizajes particulares. Por ejemplo, la amígdala basolateral (BlAmy) estaría involucrada en la agresividad, el aprendizaje emocional y la

memoria; el hipocampo (Hip) estaría involucrado en la memoria espacial, así como también en las memorias episódicas y la representación del ambiente y/o experiencias; el Septum lateral (LS) asociado al aprendizaje emocional, el reconocimiento y el comportamiento social; y el nucleus accumbens (NaCC) relacionado al aprendizaje emocional, la motivación y la agresión. En el telencéfalo de los peces podemos encontrar núcleos cerebrales homólogos a estas regiones como el Dm (homologo a BlAmy), el Dl (hip), Vv (LS) y Vd (NaCC, estriatum) (O'Connell, y Hofmann, 2011). Teniendo en cuenta estas evidencias, en esta tesis nos interesara evaluar distintas regiones del telencéfalo donde podemos distinguir un área ventral y un área dorsal, en las cuales se han descripto regiones involucradas en la memoria y la agresividad. Dichas regiones se pueden observar en la figura 31.



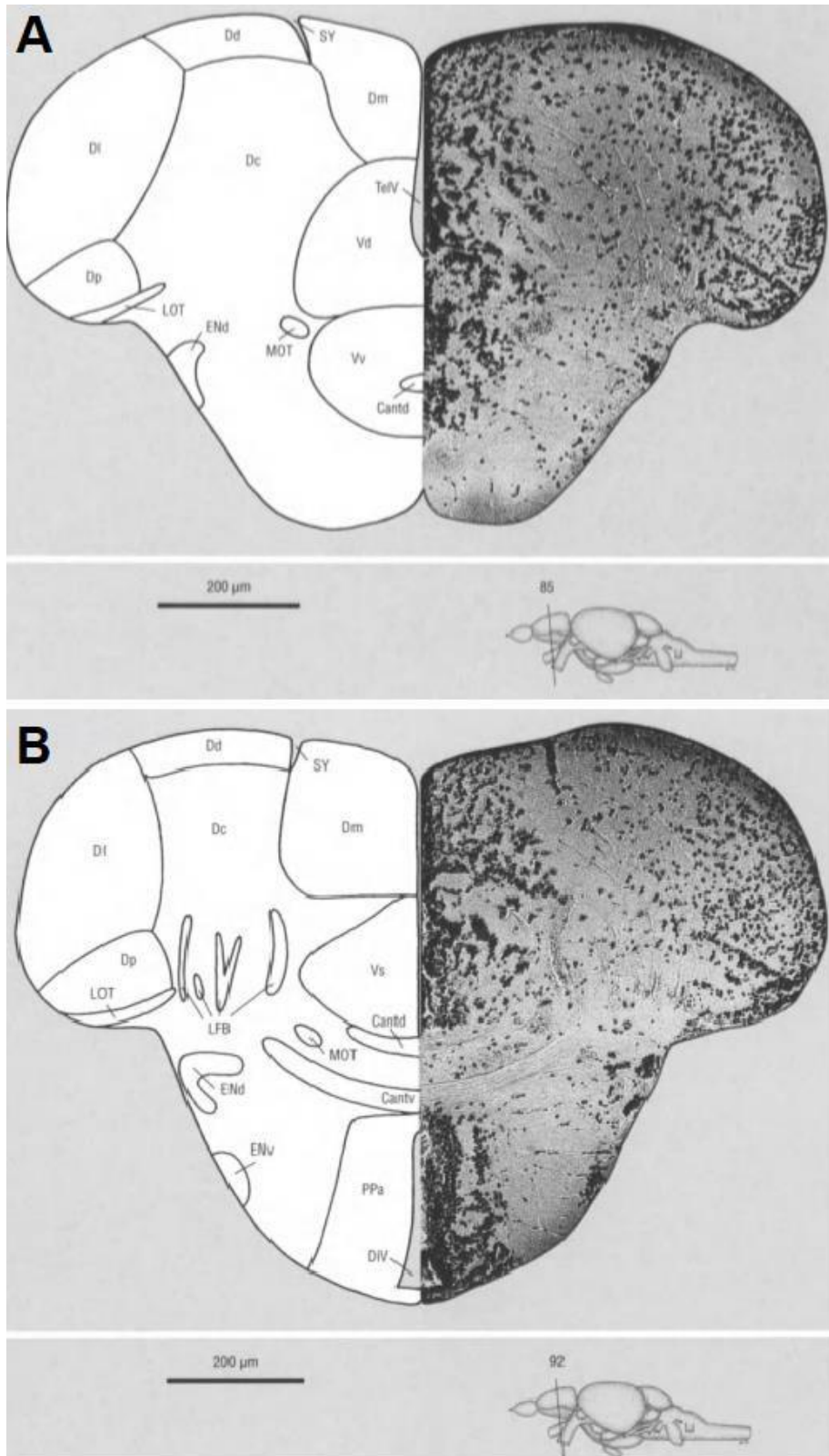


Figura 31. Cortes transversales del cerebro de pez cebra. Se muestran los cortes 85 y 92 de la región del telencéfalo. En los mismos se pueden ver los núcleos del área dorsal telencefálica Dm, Dc, Dl y Dv (medial, central, lateral y ventral), los núcleos del área ventral Vv, Vd, Vs y Vp (ventral, dorsal, supracomisural, postcomisural); así como también el PPa (núcleo parvocelular preóptico). Tomado de Wulliman *et al.*, 2012

Como hemos mencionado anteriormente, la evaluación de la expresión genética y de la conectividad anatómico funcional, junto con evidencias de desarrollo y experimentos comportamentales sugieren que las zonas mediales y laterales de la zona dorsal del telencéfalo (Dm y Dl) en peces, contienen estructuras homólogas a la amígdala y el hipocampo de mamíferos respectivamente (Von Trotha *et al* 2014). Von Trotha y colaboradores encontraron que en peces cebra inyectados con un psicoestimulante, d-anfetamina, los mayores cambios en la actividad neuronal (al compararlos con peces inyectados con solución salina) se daban en una región particular del telencéfalo, los núcleos Dm y Dl (figura 32). La activación neuronal fue observada a través de la cuantificación de proteínas C-fos. Si bien Dm y Dl se activaban en esta condición, solo Dm se volvían a activar en los comportamientos de búsqueda de droga luego de un condicionamiento (Von Trotha *et al* 2014). Estas regiones forman parte del sistema de recompensas mesolímbico, mientras que los núcleos Vv y Vd, relacionados a la agresión, formarían parte tanto de este sistema de recompensa, como de la red de decisión social, y serían homólogos al septum lateral y al núcleo accumbens respectivamente (O'Connell, y Hofmann, 2011).

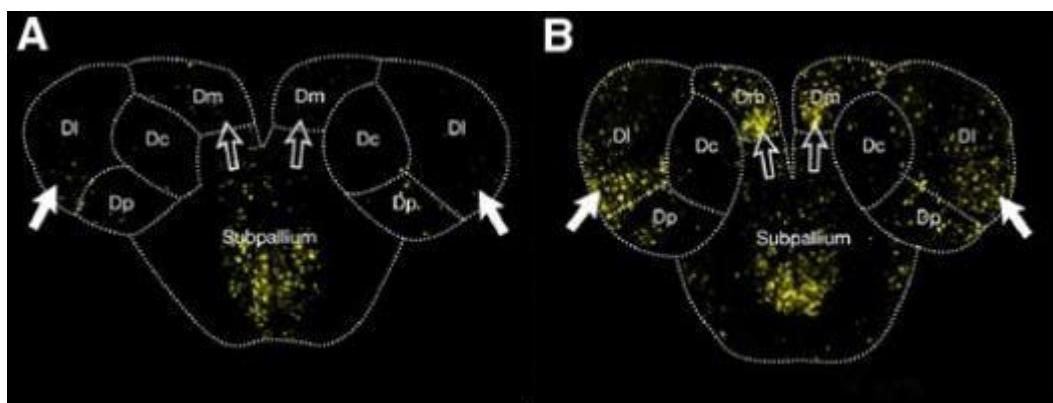


Figura 32. Expresión de C-fos en A) Peces inyectados con solución salina y B) Peces inyectados con d-anfetamina. Tomado de Von Trotha *et al* 2014.

En peces cebra expuestos a una pecera mitad iluminada y mitad oscura, en la cual por un comportamiento innato los peces suelen evitar la zona iluminada, Lau y colaboradores encontraron que aquellos peces que efectivamente presentaban este comportamiento de evitación de la luz mostraban una mayor expresión de proteína C-fos en los núcleos Dm y Vd que aquellos que no presentaban este comportamiento (Lau *et al.*, 2011). Por otro lado, en experimentos en los cuales se relacionaba un sabor particular con una sustancia aversiva en *goldfish*, lesiones en el Dm impedían la adquisición de esta aversión, pero no así lesiones en el Dl (Martin *et al.*, 2011). Estas evidencias sugieren que Dm estaría involucrada tanto en los comportamientos relacionados a las emociones negativas y los relacionados al miedo, como también a la recompensa y comportamientos de motivación, función similar a la amígdala de mamíferos (Von Trotha *et al.* 2014). En otro trabajo Lal y colaboradores encontraron que poblaciones neuronales de la región Dm estaban involucradas y eran necesarias para condicionamientos de miedo (Lal *et al.*, 2018). En cuanto a la red de decisión social, ya ha sido estudiado en pez cebra la importancia no solo de la actividad de cada núcleo, sino también la conectividad funcional entre ellos, es decir la correlación que existe en la activación de los distintos núcleos. Scaia y colaboradores encontraron que las interacciones agonísticas, tanto en machos como en hembras de pez cebra, aumentaban la actividad cerebral de la mayoría de las regiones que forman el SDMN, entre ellos los núcleos Vv, Vd, Dm y Dl. Estudiando la conectividad funcional observaron que los machos ganadores aumentaban la excitación general de esos núcleos y no mostraban cambios en la inhibición de los mismos, mientras que los machos perdedores mostraban un decrecimiento tanto en la excitación como en la inhibición del SDMN (Scaia *et al.*, 2022).

Teniendo en cuenta la bibliografía previa, creemos que la región del telencéfalo es una zona prometedora para evaluar cómo sus distintos núcleos están involucrados en memorias

asociadas a un encuentro agonístico, y el reconocimiento individual. Podemos plantear como **cuarto objetivo** evaluar cómo la activación diferencial de distintos núcleos telencefálicos están involucrados en memorias asociadas al recuerdo de un encuentro agonístico y el oponente previo, comparando su activación entre individuos que participaron en encuentros sucesivos contra el mismo oponente, tratados o no con MK-801 luego del primer encuentro.

## 5.2 Materiales y métodos

### 5.2.1 Tratamientos analizados

Para realizar la cuantificación de células inmunopositivas para C-fos se utilizaron los cerebros provenientes de individuos que: a) Fueron tratados con 60 minutos MK-801 luego del primer encuentro y se volvieron a exponer a un encuentro agonístico a las 48 horas. b) Fueron tratados con 60 minutos de agua luego del primer encuentro y se volvieron a exponer a un encuentro agonístico a las 24 horas. c) Se realizó el protocolo de encuentros sucesivos a las 24 horas, pero sin levantar la compuerta, es decir los individuos permanecieron aislados, con intercambio de señales químicas, pero sin contacto físico ni visual. Estos individuos fueron llevados a la zona de filmación durante 30 minutos, pero sin remover la barrera. Siguió aislados durante 24 horas, expuestos nuevamente a la zona de filmación por 30 minutos, sin levantar la compuerta. Por lo tanto fueron expuestos a las mismas condiciones que en los tratamientos, con intercambio químico entre individuos, pero no tuvieron contacto físico. En todos los casos, los individuos fueron sacrificados inmediatamente después de pasados los 30 minutos del segundo encuentro.

## 5.2.2 Inmunohistoquímica de C-fos

Inmediatamente después del último encuentro los individuos fueron sacrificados mediante un shock frío y corte cervical. El procesamiento histológico de los cerebros fue llevado a cabo según el protocolo de Scaia *et al* 2022. Brevemente, las cabezas fueron fijadas en formalina (formol 10% en PBS) durante 3 días. Se realizaron 2 lavados en PBS durante 30 minutos y se descalcificaron las muestras durante 2 días en EDTA. Luego de dos lavados en agua destilada se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol, 70%, 96%, 100%, alcohol/xilol, xilol y luego dos períodos de 1:30 horas en parafina I y II. Una vez incluidas fueron colocadas en tacos de madera para el procesamiento histológico, realizando cortes de 7 micrómetros utilizando un micrótomo (Microm HM 350) y portaobjetos gelatinizados 2x. Posteriormente se desparafinaron con dos pasajes de 15 minutos en xilol. Se los hidrató pasándolos por concentraciones decrecientes de alcohol 100%, 96%, 90% y 70% hasta lavarlos en PBS. Para comenzar el protocolo de inmunohistoquímica se realizó un bloqueo de peroxidasas endógenas dejando los portaobjetos 5 minutos en peróxido de hidrógeno 3%. Luego de un lavado en PBS, se realizó un bloqueo de sitios inespecíficos de proteínas mediante una incubación durante 1 hora a temperatura ambiente con leche (0% en grasa) 5%. Se realizó un nuevo lavado en PBS y luego se incubó a temperatura ambiente durante 90 minutos con el anticuerpo primario (Goat Anti C-fos Abcam (Ab156802) policlonal, 1/100 en PBS), para luego dejarlo toda la noche en heladera a 4°C. En el caso del control negativo, los cortes en vez de ser incubados con anticuerpo primario fueron incubados en el mismo volumen de PBS, siguiendo el mismo protocolo. Al segundo día se retiraron los portaobjetos de la heladera y se prolongó la incubación por 1 hora adicional a temperatura ambiente. Luego de lavar en PBS, los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario 1 hora a temperatura ambiente (Rabbit antigoat DAKO (E0466) 1/200 en PBS). Luego de un nuevo

lavado en PBS se los incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en Streptavidina HRP (Chemicon (SA202) 1/400 en PBS), se realizó un nuevo lavado en PBS y se procedió a realizar el revelado utilizando DAB (3,3'-Diaminobenzidina, (Cell marque 957D-20)). La reacción de DAB se cortó con agua destilada y luego se realizó una contra coloración suave con hematoxilina, pasajes en alcohol creciente 70%,90%, 96%, 100%, xilol y luego montaje en bálsamo de Canadá. Una vez terminado este protocolo se procedió a tomar fotografías de las muestras con una cámara (Axiocam 208 color) acoplada a un microscopio Zeiss Primo Star, para el posterior análisis de estas.

### 5.2.3 Análisis de imágenes

Para cada cerebro se seleccionaron 5 cortes transversales para cada región a evaluar, dejando un corte sin analizar entre cada uno, con el objetivo de evitar cuantificar más de una vez la misma neurona. De esta manera se cuantificaron 5 cortes transversales de cada región, para cada individuo. Las regiones de interés, Vv, Vd, Dm y Dl se determinaron siguiendo el atlas para esta especie (Wulliman *et al* 2012). El análisis de las imágenes y la cuantificación de la inmunomarca fueron llevados a cabo siguiendo un protocolo similar al establecido en Scaia *et al* (2022). En cada una de dichas regiones se delimitaron dos rectángulos de área  $1000 \mu\text{m}^2$  para cada corte, que fueron ubicados siguiendo el criterio de abarcar aquellas zonas dentro de cada área que presenten la mayor cantidad de células inmunopositivas (figura 33). Se cuantificaron la cantidad de células inmunopositivas para C-fos dentro de cada rectángulo, sumando el valor obtenido para todos los cortes, para finalmente obtener el número de células inmunopositivas para C-fos en un área de  $10000 \mu\text{m}^2$  para cada área cerebral. En todos los casos se cuantificó en un único hemisferio cerebral, aquel que presentó mayor cantidad de

células inmunopositivas para C-fos. Se cuantificó el área total de dicho hemisferio con el objetivo de normalizar la cantidad de células inmunopositivas para C-fos por área total del hemisferio cerebral para cada individuo. El análisis de las imágenes se llevó a cabo con el programa Zen 3.3 Blue edition. Las imágenes del hemisferio completo se tomaron con un aumento de 100x, y la de cada área particular a 400x.

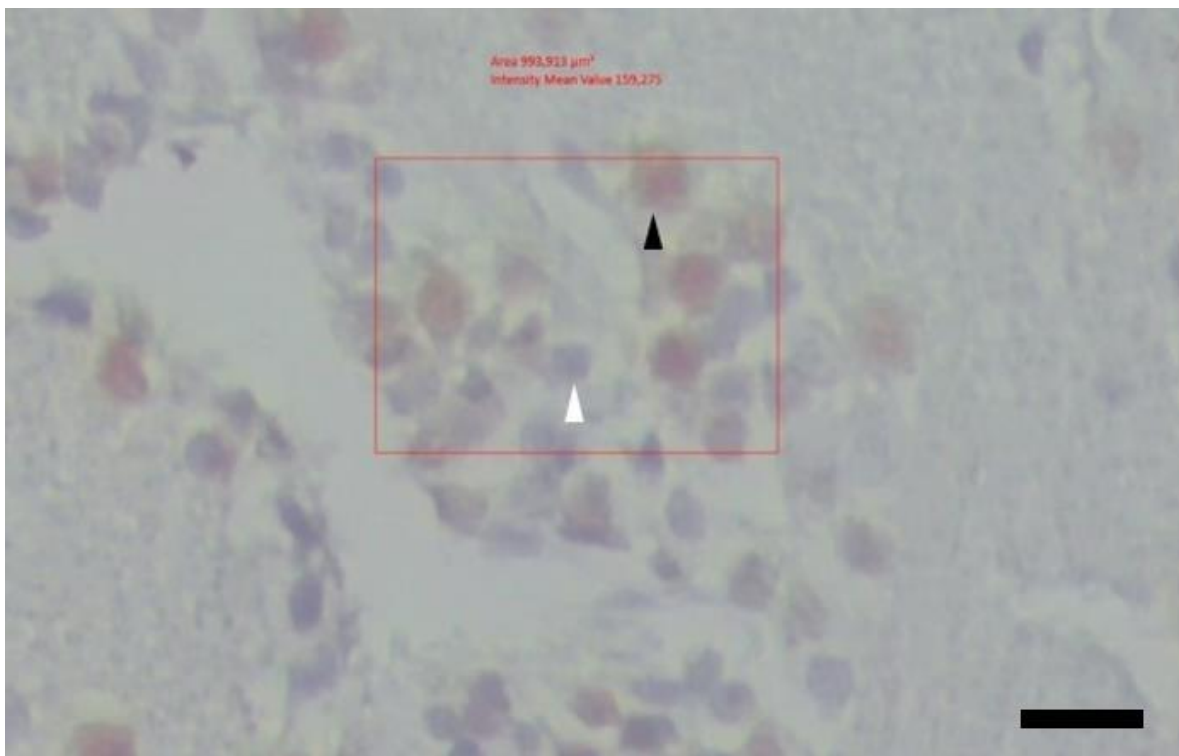


Figura 33. El rectángulo rojo representa una de las regiones de  $1000 \mu\text{m}^2$  en la cual se cuantifican la cantidad de células inmunopositivas para C-fos (triángulo negro), se pueden observar también los núcleos no marcados (triángulo blanco). Aumento 400x. La barra negra corresponde a  $10 \mu\text{m}$ .

#### 5.2.4 Análisis de datos

Como los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, se compararon la cantidad de células inmunopositivas para C-fos por región analizada (relativizado al área del hemisferio cerebral) entre cada tratamiento mediante un análisis de Kruskal-Wallis. En aquellos casos que se encontró un efecto del tratamiento se realizaron comparación de a pares entre tratamientos mediante un análisis de Mann-Whitney. Todos los datos de medianas refieren a la cantidad de células inmunopositivas para C-fos en una región de 10000  $\mu\text{m}^2$  dividido por el área del corte de cada hemisferio cerebral analizado. La significancia estadística se seteo en  $p < 0.05$ . Para comparar entre ganadores y perdedores se realizó un análisis no paramétrico para muestras pareadas de Wilcoxon. De manera complementaria se realizó un análisis de correlación de Spearman entre todos los núcleos para evaluar la co-activación entre ellos (Material suplementario 8.6)

### 5.3 Resultados

Para cada tratamiento se obtuvieron el número de células inmunopositivas para C-fos en 10000  $\mu\text{m}^2$  de la región analizada. Dicho resultado se dividió por el área total del corte del hemisferio en que se encontraba esa región. Junto con la realización de las inmunohistoquímicas para cada tratamiento se realizaron los controles negativos, en los cuales no se observó ningún tipo de marca. En la figura 34 se muestra a manera representativa las distintas regiones para cada tratamiento



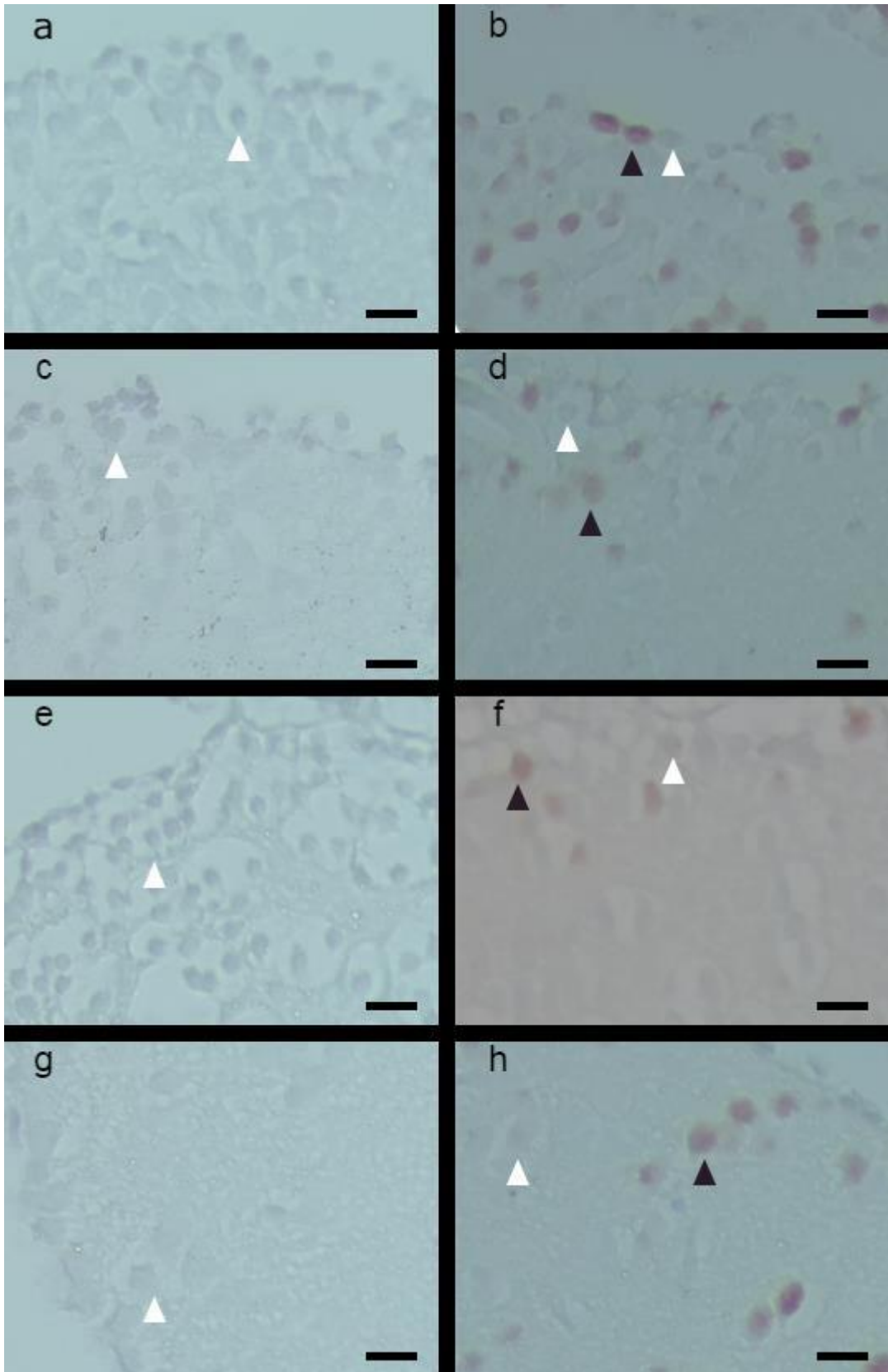


Figura 34. Región Vv para: a) control negativo, b) marca positiva para C-fos; Región Vd para: c) control negativo, d) marca positiva para C-fos. Región Dm para: e) control negativo, f) marca positiva para C-fos. Región Dl para: g) control negativo, h) marca positiva para C-fos. Los triángulos blancos señalan núcleos

celulares no marcados, los triángulos negros señalan núcleos celulares con marca positiva. Aumento 400x. La barra negra corresponde a 10  $\mu$ m.

### 5.3.5 Ganadores versus perdedores

Al comparar el número de células inmunoreactivas positivas para C-fos por área total (CIP), entre ganadores y perdedores para los individuos tratados con MK-801, no se encontraron diferencias para ninguno de los núcleos (Vv: Ganador 0.000257 CIP, RI 0.000027 CIP, n=4 ; perdedor 0.000244 CIP, RI 0.000020 CIP, n=5, v=6, p-valor=0.875; Vd: ganador 0.000228 CIP, RI 0.000012 CIP, n=4, perdedor 0.000204 CIP, RI 0.000039 CIP, n=5, v=7, p-valor=0.625; Dm: ganador 0.0000588 CIP, RI 0.0000251 CIP, n=4, perdedor 0.0000467 CIP, RI 0.0000347 CIP, n=5; v=7, p-valor=0.625; D1: ganador 0.000216 CIP, RI 0.000015 CIP, n=4, perdedor 0.000258 CIP, RI 0.00015 CIP, n=5, v=4; p-valor=0.875). Teniendo en cuenta estos resultados, para los siguientes análisis se utilizaron los datos sin discriminar entre ganadores y perdedores.

### 5.3.1 Núcleo ventral del área ventral telencefálica (Vv)

Al comparar el número de células inmunopositivas para C-fos por área total entre los tres tratamientos (MK-801, agua, Control) se encontraron diferencias significativas entre alguno de ellos (Kruskal-Wallis chi-squared = 8.4012,  $gl= 2$ ,  $p$ -valor = 0.01499). Se encontraron diferencias significativas entre el control y el tratamiento con agua (Control: mediana:0.000148 células inmunopositivas para C-fos/área total , RI: 0.000078 ,  $n=6$ ; Agua: mediana:0.000264 células inmunopositivas para C-fos/área total , RI: 0.000028 ,  $n=6$ ;  $p$ -valor=0.02597), al igual que entre el control y el tratamiento con MK-801 (MK-801: mediana:0.000250 células inmunopositivas para C-fos/área total , RI: 0.000031 ,  $n=9$ ;  $p$ -valor=0.0015). No se encontraron diferencias entre el tratamiento con agua y MK-801 ( $p$ -valor=0.5287) (figura 35).

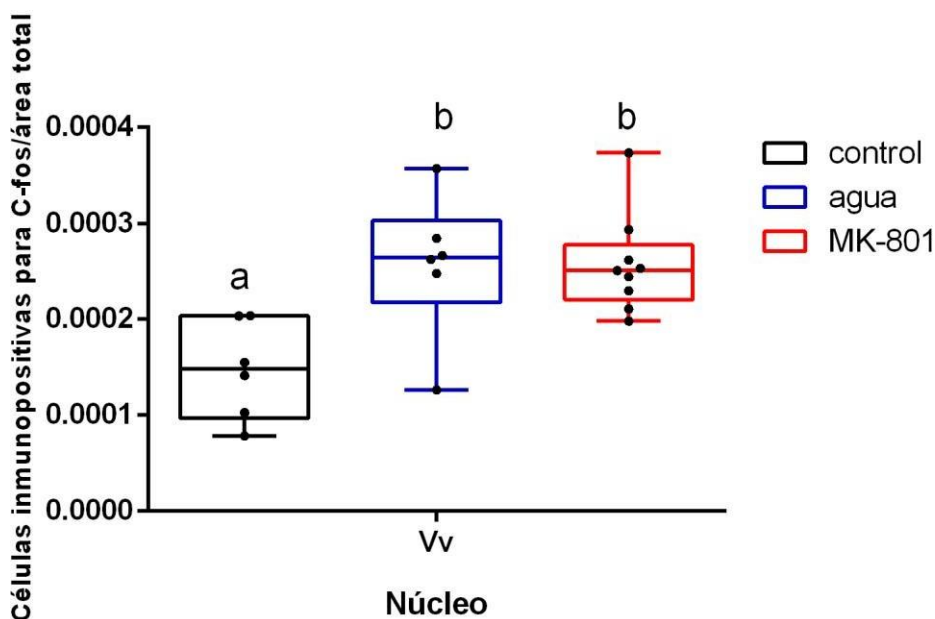


Figura 35. Boxplot para el número de células inmunopositivas para C-fos en el núcleo Vv/ el área total del hemisferio cerebral, para los tratamientos control, agua y MK-801. La banda dentro de la caja representa la mediana, y los bigotes los máximos y mínimos. Los círculos representan el valor para cada individuo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos.

### 5.3.2 Núcleo dorsal del área ventral telencefalica (Vd)

Al comparar el número de células inmunopositivas para C-fos por área total entre los tres tratamientos (MK-801, agua, Control) no se encontraron diferencias significativas entre alguno de ellos (Kruskal-Wallis chi-squared = 4.3925, gl = 2, p-valor = 0.1112) (Mediana: Control 0.000132 células inmunopositivas para C-fos/área total; Agua 0.000188 células inmunopositivas para C-fos/área total; MK-801 0.000215 células inmunopositivas para C-fos/área total) (figura 36).

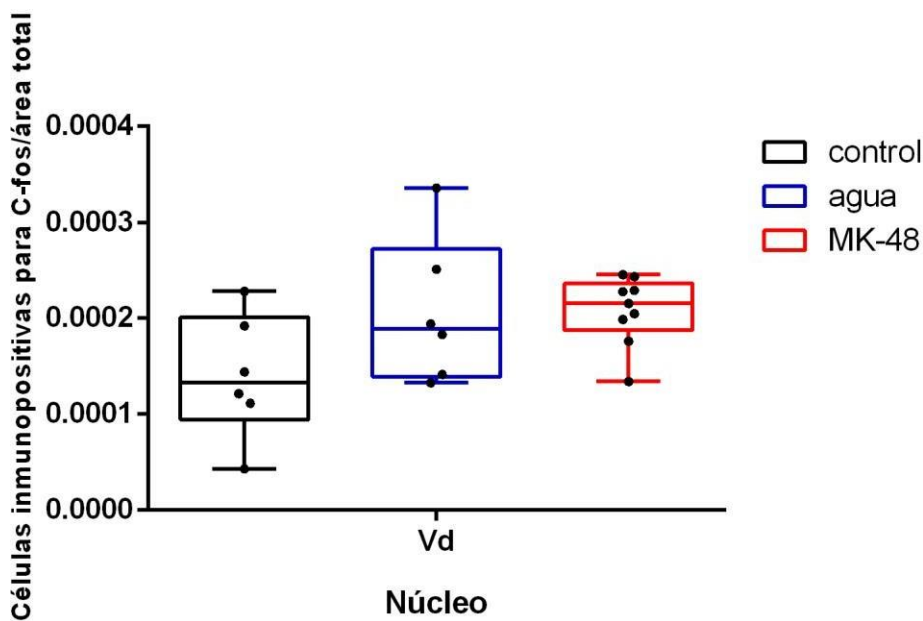


Figura 36. Boxplot para el número de células inmunopositivas para C-fos en el núcleo Vd/ el área total del hemisferio cerebral, para los tratamientos control, agua y MK-801. La banda dentro de la caja representa la mediana, y los bigotes los máximos y mínimos. Los círculos representan el valor para cada individuo. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

### 5.3.3 Núcleo medial del área dorsal telencefalica (Dm)

Al comparar el número de células inmunopositivas para C-fos por área total entre los tres tratamientos (MK-801, agua, Control) se encontraron diferencias significativas entre alguno de ellos (Kruskal-Wallis chi-squared = 6.039  $gl=2$ , p-valor = 0.04883). Se encontraron diferencias significativas entre el control y el tratamiento con agua (Control: mediana: 0.000012 células inmunopositivas para C-fos/área total , RI: 0.000025, n=6; Agua: mediana:0.000074 células inmunopositivas para C-fos/área total , RI: 0.000036, n=6; p-valor=0.01515), si bien entre el control y el tratamiento con MK-801 no se encontraron diferencias significativas, se observa una clara tendencia y un p-valor cercano al estipulado como significativo (MK-801: mediana:0.000057 células inmunopositivas para C-fos/área total , RI: 0.000023, n=9; p-valor=0.0663). No se encontraron diferencias entre el tratamiento con agua y MK-801 (p-valor=0.3277) (figura 37).

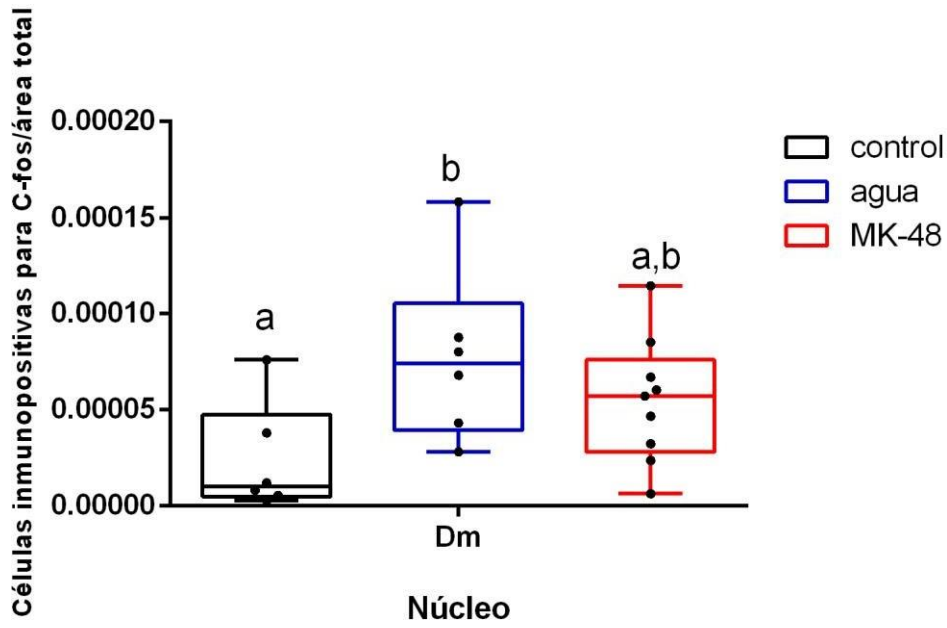


Figura 37. Boxplot para el número de células inmunopositivas para C-fos en el núcleo Dm/ el área total del hemisferio cerebral, para los tratamientos control, agua y MK-801. La banda dentro de la caja representa la mediana, y los bigotes los máximos y mínimos. Los círculos representan el valor para cada individuo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos.

### 5.3.4 Núcleo lateral del área dorsal telencefalica (DI)

Al comparar el número de células inmunopositivas para C-fos por área total entre los tres tratamientos (MK-801, agua, Control) se encontraron diferencias significativas entre alguno de ellos (Kruskal-Wallis chi-squared = 6.5541; gl=2, p-valor =0.03774). No se encontraron diferencias significativas entre el control y el tratamiento con agua (Control: mediana: 0.000146 células inmunopositivas para C-fos/área total, RI: 0.000076, n=6; Agua: mediana: 0.000132 células inmunopositivas para C-fos/área total, RI: 0.000037, n=6; p-valor >0.99). Se encontraron diferencias significativas entre el control y el tratamiento con MK-801 (MK-801: mediana: 0.000219 células inmunopositivas para C-fos/área total, RI: 0.000045, n=9; p-valor=0.02547). Se encontraron diferencias entre el tratamiento con agua y MK-801 (p-valor=0.0495) (figura 38).

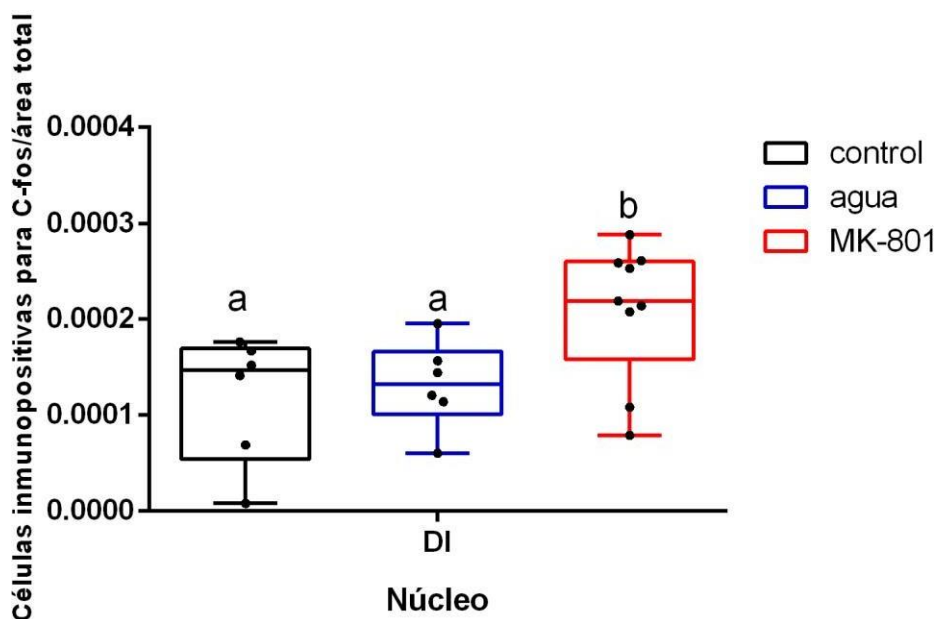


Figura 38. *Boxplot* para el número de células inmunopositivas para C-fos en el núcleo DI/ el área total del hemisferio cerebral, para los tratamientos control, agua y MK-801. La banda dentro de la caja representa la mediana, y los bigotes los máximos y mínimos. Los círculos representan el valor para cada individuo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Con el objetivo de evaluar no solo la activación individual de cada núcleo, sino también la relación que existe entre estos, se calculó la correlación entre el número de células inmunopositivas para C-fos sobre el área total del hemisferio cerebral entre todos los núcleos analizados (Vv, Vd, Dm, Dl), para los 3 tratamientos presentados. Los resultados se muestran en material suplementario 8.7.

## 5.4 Conclusión

Es importante destacar que los individuos se sacrificaron inmediatamente después de finalizados los 30 minutos desde el comienzo de la interacción (remoción de la barrera) del segundo encuentro, en los tratamientos Agua y MK-801, mientras que el grupo control es sacrificado luego de sufrir manipulaciones similares, pero sin el encuentro agonístico. De esta manera el efecto que estamos viendo sobre la activación neuronal es producto de esta interacción física inicial (o ninguna en el caso del control), es decir se estarían observando los cambios asociados a las primeras interacciones con un individuo, el cual puede ser reconocido y recordado, según si se formó o no una memoria del encuentro previo. En el caso de haber existido efecto amnésico (Tratamiento MK-801) consideramos que no estaríamos evaluando la evocación del primer encuentro, sino que estaríamos observando el efecto de la interacción novedosa entre dos individuos desconocidos. Teniendo en cuenta el tiempo necesario para la expresión de C-fos (Chaudhuri *et al.*, 2000), no estaríamos observando la activación correspondiente al encuentro agonístico y/o la resolución del segundo día (ver discusión final). Para la región ventral del telencéfalo, encontramos que en el núcleo ventral (Vv) los individuos que no tuvieron interacción social mostraron menor cantidad de células inmunopositivas para C-fos que los que sí tuvieron esta interacción, independientemente si



habían sido tratados el día anterior con MK-801 o con agua. Para el núcleo dorsal de la zona ventral (Vd), si bien no se encontraron diferencias significativas, pareciera haber una tendencia hacia el mismo resultado. Esto nos sugeriría que dichos núcleos, particularmente Vv, podrían estar involucrados en la interacción social, independientemente de si es con un individuo conocido o no. Esta interpretación surge debido a que se observan los mismos niveles de activación en los peces que habían sido tratados con un agente amnésico y que según los resultados comportamentales no estarían reconociendo al oponente, que en aquellos tratados con agua, los cuales si mostraron un reconocimiento evidenciado por los resultados comportamentales. En cuanto a los núcleos del área dorsal, el núcleo medial (Dm) presentó resultados similares en cuanto a una menor activación en el control, no encontrándose diferencias entre los peces previamente tratados con MK-801 y los tratados con agua, sin embargo en el núcleo lateral (Dl) se encontró una mayor cantidad de células inmunopositivas para C-fos en aquellos individuos que habían sido tratados con MK-801 el día previo, que en los expuestos a agua o a los controles. Entre estos últimos no se encontraron diferencias. Estos resultados sugerirían que el núcleo Dl podría estar involucrado en el reconocimiento novedoso de un individuo pero no así en la exposición repetida del mismo. Al analizar ganadores y perdedores por separado, no encontramos diferencias entre los mismos para ningún núcleo. Dicho análisis se realizó para el tratamiento con MK-801, ya que si bien se realizaron los análisis para el tratamiento con agua, la cantidad de datos no fue suficiente para tener un análisis concluyente. Esto nos estaría sugiriendo que no hay una diferencia en estos núcleos entre ganadores y perdedores previos, resultado esperado para el tratamiento con MK-801 en donde no habría un recuerdo del encuentro previo.

## **CAPÍTULO 6**

### **Agresividad en hembras y estado reproductivo**

## 6.1 Introducción

Se ha observado que las hembras de pez cebra muestran un tiempo de pelea menor que los machos, y, si bien presentan menores frecuencias de ataques directos, muestran una mayor frecuencia de despliegues antiparalelos (*displays*). A pesar de estas diferencias, muestran las mismas etapas del encuentro y comportamientos que los machos, presentando los *display* antiparalelos, círculos, mordidas y ataques, así como también las retiradas y el *freezing* (Scaia *et al.*, 2022).

Siendo una especie de fecundación externa, los machos persiguen rápidamente a las hembras, tocando sus flancos y describiendo figuras en forma de ocho, hasta que, si el cortejo es exitoso, las hembras liberan los huevos y los machos los fecundan. Estas hembras luego de la liberación están disponibles para hacerlo nuevamente entre 2 y 3 días más tarde. Una vez que los huevos son liberados y fecundados no hay cuidado parental, incluso, en condiciones de laboratorio, se observa depredación de las crías por parte de los padres (Spence *et al.*, 2008).

En trabajos previos del laboratorio se ha observado que se pueden determinar dos estados reproductivos en hembras de pez cebra: Hembras pre-puesta de huevos, son aquellas que presentan un vientre más abultado y un mayor índice gonadosomático, y hembras post-puesta de huevos, que presentan un vientre más aplanado y un menor índice gonadosomático. Se observó que las hembras pre-puesta se acercan más a un compartimento con un macho conespecífico, y pasan más tiempo nadando cercano a estos durante una interacción social, que las hembras post-puesta (Cavallino *et al.* 2019). Esto demuestra que no solo presentan diferencias en cuanto al índice gonadosomático, sino también pueden mostrar diferencias comportamentales según su estado reproductivo.

En otras especies, como por ejemplo el cíclido *Cichlasoma citrinellum*, se ha observado que el estado reproductivo puede modificar los niveles de agresividad, particularmente las hembras cercanas a la puesta mostraban mayores niveles de agresividad en una evaluación frente a un espejo (Holder *et al.*, 1991), de manera similar, en *Oreochromis mossambicus* las hembras con etapas más avanzadas del estado reproductivo mostraban mayores niveles de agresividad frente a otros individuos (Oliveira y Almada, 1998).

Teniendo en cuenta que las hembras presentan los mismos comportamientos agresivos que los machos, podemos plantear como **quinto objetivo** evaluar si en hembras se observa el mismo cambio comportamental debido a encuentros sucesivos observado en machos, teniendo en cuenta los distintos estados reproductivos.

## 6.2 Materiales y métodos

### 6.2.1 Individuos y mantenimiento

Se utilizaron 44 hembras adultas de peso=  $0.329 \pm 0.016$  g y longitud estándar=  $2.57 \pm 0.03$  cm (media $\pm$ sem). Las mismas fueron conseguidas en un acuario comercial. Un mes antes de arrancar los experimentos, los individuos fueron aclimatados en peceras de 20 litros, conteniendo machos y hembras (con una densidad de 1 pez por litro), temperatura de 25-26 c, pH= 7.5/7.8 y un fotoperiodo de 14 horas luz: 10 horas oscuridad (Avdesh *et al.*, 2012). Fueron alimentadas 2 veces al día, con alimento comercial marca Tetra.

### 6.2.2 Protocolo experimental

Siguiendo el mismo protocolo realizado en machos (Sección 2.2.2), se seleccionaron 2 hembras de tamaño y vientre similar y se las aisló en las peceras experimentales durante 24 horas. Se realizaron 2 encuentros de 30 minutos cada uno con un intervalo de 24 horas entre ellos. Todos los encuentros fueron llevados a cabo en el mismo rango horario (entre las 10:30 am y las 13 pm). Finalizado el segundo encuentro se sacrificaron a las hembras mediante un shock frío y corte cervical. Se pesó y midió a las hembras, y se realizó la disección del ovario para pesarlo y calcular un índice gonadosomático (Peso total/Peso del ovario). Al igual que en machos, se cuantificó el tiempo total de comportamientos agresivos y el resultado del encuentro.

### 6.2.3 Análisis estadístico

Como los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza (material suplementario, sección 8.4), se llevó a cabo un análisis bayesiano comparando el tiempo total de comportamientos agresivos entre encuentros sucesivos. Teniendo en cuenta que la misma pareja de oponentes se enfrentaba en el primer y segundo encuentro, se calculó la diferencia entre estos, para cada par de oponentes. Este índice se comparó contra una media hipotética de 0, es decir, sin diferencias entre primer y segundo encuentro. Se utilizó una *prior* no informativa. Se calcularon el intervalo de credibilidad superior (ICS) e inferior (ICI), como también el p-valor con  $\alpha = 0.05$ , en un testeo de una cola.

## 6.3 Resultados

Se llevaron a cabo 22 encuentros entre parejas de hembras, de los cuales en 11 no se observó un encuentro agonístico por lo que debieron descartarse. De esos 11, 7 correspondían a encuentros entre hembras pre-puesta y 4 a encuentros entre hembras post-puesta.

### 6.3.1 Variables morfológicas

Se calcularon las diferencias en la LE entre hembras participantes en una misma pelea (LE  $\Delta$   $0.09 \pm 0.01$  cm), la diferencia en el peso ( $\Delta$  peso  $0.065 \pm 0.016$  gr) y en el índice gonadosomático ( $\Delta$  IG  $3.49 \pm 0.43$ ), obteniéndose que las diferencias en las variables calculadas estaban dentro del rango que consideramos despreciable, como hemos

mencionado previamente. Teniendo en cuenta experimentos previos del laboratorio (Cavallino *et al.*, 2019) se realizó una primer discriminación entre estados reproductivos según la prominencia del vientre, la cual luego fue corroborada mediante el índice gonadosomatico (las pre-puestas presentan un mayor IG que las post-puesta).

### 6.3.2 Duración de la agresividad

Se encontraron diferencias significativas en la duración de los comportamientos agresivos en encuentros sucesivos entre hembras, sin discriminar por estado reproductivo, resolviéndose el segundo encuentro con menores niveles de agresividad (ICI= 54.38 seg, ICS= 270.03 seg,  $Z=-2.47$ ,  $n=11$ ,  $p\text{-valor}=0.0066$ ) (figura 41).

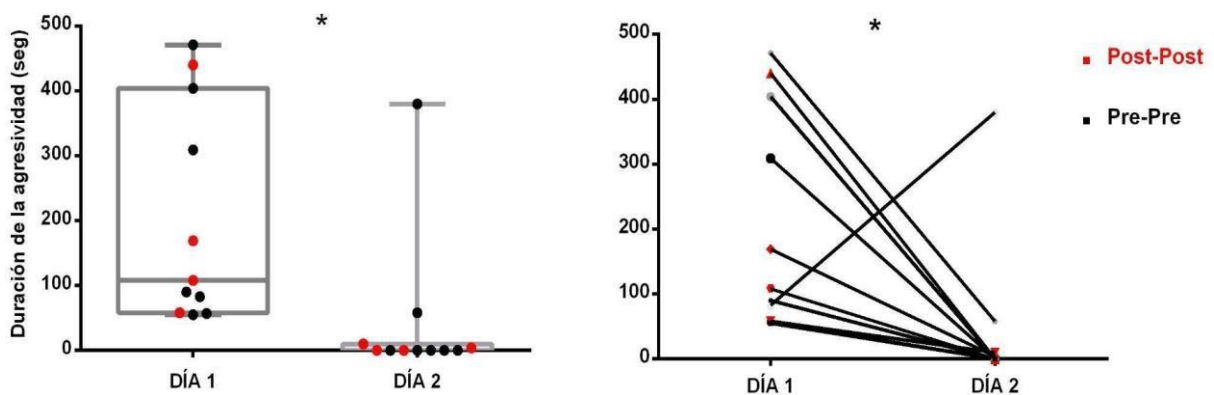


Figura 31. Tiempo total que las hembras pasan realizando despliegues agresivos, en encuentros sucesivos con un intervalo de 24 horas. a) *Boxplot* para la duración de los comportamientos agresivos en segundos, para los dos encuentros. La banda dentro de la caja representa la mediana, y los bigotes los máximos y mínimos. Los círculos representan el valor cuantificado para cada encuentro, siendo los rojos las parejas post-puestas y los negros las pre-puestas. El asterisco indica diferencias significativas (Encuentro 1: 108 seg, RI=286, N=11; Encuentro 2: 0 seg, RI=7; N=11; Se presenta la mediana y el Rango Intercuartílico). b) Cada línea representa un encuentro entre los mismos oponentes.

## 6.4 Conclusión

Al igual que lo observado en machos, cuando dos hembras pelean y se vuelven a enfrentar a las 24 horas, resuelven este segundo encuentro con el mismo resultado y con menores niveles de agresividad que el primer encuentro. En cuanto al estado reproductivo, la cantidad de datos de cada uno no fue suficiente para realizar un análisis estadístico confiable discriminando entre estados, sin embargo, no pareciera haber una diferencia entre hembras pre y post-puesta, ya que en ambos casos se observó el mismo efecto de disminución de la agresividad en el segundo encuentro. Sería necesario repetir los experimentos aumentando la cantidad de encuentros de cada estado reproductivo para poder realizar un análisis estadístico concluyente. Queda pendiente para futuros trabajos realizar los experimentos de cambio de oponente al segundo día, para comprobar que el efecto observado se deba al reconocimiento individual, al igual que lo observado en machos, como también realizar el tratamiento con MK-801.



## **7. Discusión final**

En esta tesis evaluamos como la experiencia previa de un encuentro agonístico podría afectar las dinámicas de encuentros sucesivos entre machos de pez cebra, *Danio rerio*, observando que a las 24 horas del primer encuentro los oponentes resuelven un segundo conflicto con menores niveles de agresividad únicamente cuando se enfrentan al mismo oponente. Más aún, si son enfrentados a un oponente novedoso se restauran los niveles de agresividad. El efecto de resolver un segundo conflicto con menores niveles de agresividad se mantiene al realizar intervalos de 48 y 72 horas entre encuentros, pero se deja de observar si inmediatamente después del primer encuentro se realiza un tratamiento con un antagonista de receptores de NMDA, MK-801. Este resultado farmacológico comportamental, permitiría plantear que se formaría una memoria del encuentro reconociendo al oponente y/o al resultado del enfrentamiento. Además, se observó una mayor activación neuronal en los individuos que tuvieron una interacción social, particularmente en los núcleos Vv y Dm, y se observó la misma tendencia en el núcleo Vd, mientras que en el núcleo Dl se observó una mayor activación neuronal cuando los peces habían sido tratados con MK-801 luego del primer encuentro. Estos resultados sugerirían que dicho núcleo podría estar involucrado en el aprendizaje y recuerdo de un individuo novedoso, pero no así cuando el estímulo es repetido. En hembras, al igual que en machos, se observó que resolvían el segundo encuentro con menores niveles de agresividad en peleas sucesivas contra el mismo oponente.

El efecto de la experiencia previa ha sido muy estudiado en otras especies, principalmente desde el punto de vista del efecto ganador/perdedor (Hsu *et al.* 2006). Este efecto se refiere a que individuos que ganaron una pelea previa tienen mayor probabilidad de ganar una segunda contra un oponente desconocido y sin experiencia, mientras que los perdedores tienen mayor

probabilidad de perder ese segundo encuentro. Este efecto se observó en la rata noruega (*Rattus norvegicus*) donde la mayoría de los ganadores previos ganaban el segundo encuentro contra un oponente *naive*, y todos los perdedores previos, perdían el segundo encuentro (Lehner *et al.* 2011). En el pez cebra, Oliveira y colaboradores observaron el mismo efecto, cuando el intervalo entre peleas era de 1 hora (Oliveira *et al.*, 2011), sin embargo, el efecto se perdía cuando el intervalo era de 24 horas (Chou *et al.* 2016). En este sentido, en esta tesis evaluamos cómo cambian los niveles de agresividad en la resolución del conflicto, y el mantenimiento o no del resultado, en encuentros sucesivos con un intervalo de 24 horas. El primer resultado interesante que podemos observar es que cuando los individuos pelean, y vuelven a pelear contra el mismo oponente, el resultado se mantiene en todos los casos, es decir los ganadores previos vuelven a ganar los encuentros sucesivos, y los perdedores a perderlo. En intervalos de 24 horas, según la bibliografía que hemos mencionado, podríamos descartar un efecto ganador/perdedor. Por lo tanto proponemos que el mantenimiento del resultado dependería de la experiencia previa, es decir, si recuerdan o no a su oponente, y el conflicto previo. Por otro lado, si un oponente gana un encuentro y luego se enfrenta nuevamente al mismo oponente, es posible que se repita el resultado debido a la capacidad o habilidad de pelea que posee cada individuo. También es importante remarcar que en nuestro caso los individuos se enfrentaron al mismo oponente, o si era un oponente novedoso, de todas formas ya había participado en un encuentro previo contra otro oponente, igualando de esta manera la historia previa de los contendientes, a diferencia de lo mencionado en bibliografía para el efecto ganador/perdedor en donde el segundo oponente no tenía experiencia previa. El segundo resultado para remarcar es que los encuentros sucesivos entre los mismos oponentes se resolvieron con menores niveles de agresividad, tanto en la duración total de comportamientos agresivos, como en el número de mordidas. En todos los casos analizados, todos los encuentros se resolvieron estableciéndose un ganador y perdedor,

encuentros donde no hubo resolución en el tiempo estipulado fueron descartados. Con estos resultados comprobamos que los machos de pez cebra resuelven un segundo y tercer encuentro (con 24 horas de intervalo) contra el mismo oponente con menores niveles de agresividad (contemplando duración de los comportamientos agresivos y el número de mordidas) manteniéndose el resultado en todos los casos. Estos resultados van en el mismo sentido que lo observado en la trucha multicolor (*Oncorhynchus mykiss*) en donde los niveles de agresividad entre individuos familiares son menores que entre oponentes novedosos (Johnsson 1997). Resultados similares se encontraron en machos de lagartija *Podarcis hispanica* (López and Martín 2001) y en machos de rata noruega (Lehner *et al.* 2011). En el pez betta, *Betta splendens*, los ganadores de un encuentro muestran mayores niveles de agresividad en un encuentro sucesivo, mientras que los perdedores disminuyen sus niveles de agresividad en el segundo encuentro (Karino y Someya 2007). Al ver nuestros resultados, nos surgieron algunas preguntas: ¿los individuos pueden recordar a un oponente en particular? ¿El efecto observado dependerá de haber tenido una pelea previa independientemente del oponente? Finalmente, ¿el efecto observado podría deberse a algún efecto de fatiga en los individuos que los lleve a resolver la siguiente pelea con menos agresividad?

Para responder estos interrogantes llevamos a cabo los encuentros donde al segundo día un individuo se enfrentó a un oponente novedoso de otro encuentro, siempre respetando un ganador con un perdedor previo. En este caso observamos que en el segundo encuentro no hubo una disminución de la agresividad en la resolución del conflicto, incluso en 4 de 20 encuentros el ganador del primer encuentro perdió el segundo contra el nuevo oponente. Como esperábamos, al repetir un tercer encuentro repitiendo la pareja del segundo, ahora si el conflicto se resolvía con menores niveles de agresividad. Esto demuestra, por un lado, que no hay un efecto de fatiga, ya que al cambiar el oponente los individuos estaban en condiciones

de mantener una pelea con altos niveles de agresividad y duración similares a los observados en el primer encuentro, y por otro lado que el efecto observado se debe a haber transitado una experiencia previa contra un oponente en particular y no solamente haber participado en un encuentro agonístico. Para ello los individuos deberían poder reconocer al oponente, recordarlo, y/o recordar la experiencia previa y cambiar su comportamiento en base a esta información. Nuestros resultados apoyan evidencia previa acerca del reconocimiento individual en pez cebra. Madeira y Oliveira (2017) encontraron que en un paradigma de discriminación social, peces expuestos a señales químicas y visuales de conespecíficos recordaban a los mismos, prefiriendo explorar al individuo novedoso por sobre el familiar cuando eran re expuestos 24 horas más tarde (Madeira y Oliveira 2017). Esta tesis apoya esta evidencia y suma nueva información acerca del reconocimiento y recuerdo de un individuo en un contexto de interacción agonística, así como también de una pelea previa entre ellos, y la duración de dicho recuerdo. Aún no se ha determinado la contribución específica de ambos tipos de claves, químicas y visuales, al reconocimiento individual. Con los experimentos realizados en esta tesis no podemos identificar si el reconocimiento de los individuos es a través de claves visuales, químicas o utilizando ambas, aunque creemos que posiblemente sea una combinación de, por lo menos, las claves químicas y visuales. En el trabajo de Madeira y Oliveira (2017), ambas claves son presentadas para evaluar el reconocimiento individual. En otros trabajos con pez cebra se observó que larvas que eran aisladas y expuestas a claves químicas de familiares en el día 6 post fecundación, a los 20 días preferían dichas claves asociadas a familiares al ser expuestas a una evaluación de elección de olores, pero esto no ocurría si eran expuestas en ese periodo de *imprinting* a olores de individuos no familiares (Gerlach *et al.*, 2008). Spence y Smith (2007) encontraron que individuos que eran criados con una población que presentaba ciertos patrones de coloración (ya sean iguales o no al individuo focal), preferían ese tipo de coloración al ser evaluados en un test de preferencia

visual en el cual no tenían intercambio de señales químicas. En este caso, solo utilizando las claves visuales los individuos se acercaban más al compartimento con el individuo cuyo patrón habían sido criados (Spence y Smith, 2007). Estas evidencias ponen de manifiesto que tanto las claves químicas, como las visuales tienen un papel importante en el reconocimiento de parentesco y el *imprinting* en juveniles. Teniendo en cuenta las evidencias presentadas por Hinz y colaboradores, en las cuales observaron que eran necesarias tanto las claves químicas como las visuales para que se dé el *imprinting* durante el desarrollo (Hinz *et al.*, 2013a), postulamos que ambas claves serían importantes para el reconocimiento individual, sin embargo, al no ser parte de los objetivos de esta tesis, el diseño de nuestros experimentos no permiten comprobarlo.

La cantidad de despliegues o la duración del conflicto no son la única medida que se puede evaluar en una interacción agonística. Podemos evaluar la latencia, es decir el tiempo que transcurre hasta el primer ataque. En este sentido en el grillo de campo, *Gryllus bimaculatus*, la experiencia previa modula la latencia en encuentros sucesivos, siendo que los ganadores presentan una menor latencia y los perdedores una supresión de los despliegues agresivos (Adamo y Hoy 1995), lo cual mostraría que los ganadores previos tienen una mayor motivación por empezar el conflicto, mientras que los perdedores estarían tratando de evitarlo. En ratones macho la latencia disminuye en encuentros sucesivos (Martínez *et al.* 1994) mientras que en el pez cebra, si bien se observó una tendencia a disminuir la latencia en encuentros sucesivos con intervalo de 1 hora, no se encontraron diferencias significativas (Oliveira *et al.*, 2011). En esta tesis no encontramos diferencias significativas en el tiempo de latencia, lo que podría demostrar que si bien cambia la agresividad del encuentro, no lo hace la motivación por el mismo. Es importante recalcar que podemos distinguir fácilmente el comienzo del encuentro ya que ambos individuos realizan despliegues comportamentales

fácilmente observables, sin embargo podría pasar que el ganador previo tenga una mayor motivación por comenzar el encuentro, pero la pelea no comience debido a que el perdedor previo lo evite. Se debería realizar otro tipo de análisis comportamental para poder evaluarlo, como por ejemplo observar, de ser posible, los comportamientos de cada individuo por separado y analizar el comportamiento de cada uno previo al primer despliegue agresivo.

Como hemos mencionado previamente los encuentros agonísticos pueden demandar un gran gasto energético además del riesgo de posibles lesiones. En ese sentido muchas especies tienen estrategias para resolver los conflictos con menores niveles de agresividad por ejemplo a través de la evaluación del oponente. Es interesante mencionar el caso de *Homarus americanus*, comúnmente conocida como langosta americana. Los machos de esta especie compiten por la dominancia, siendo los ganadores preferidos por las hembras. En encuentros contra un espejo, si se agregaba al agua el olor de un conoespecífico, los individuos desplegaban más comportamientos agresivos que si solo tenían las claves visuales del espejo. Por otro lado observaron que mientras mayor era la diferencia de tamaño entre oponentes, menor era la duración del conflicto, y que la agresividad aumentaba si a los individuos se les impedía ver u oler, es decir que al no poder recibir alguna de estas claves de su oponente, la duración de los conflictos era mayor. Finalmente observaron que si dos individuos del mismo tamaño peleaban y luego lo volvían a hacer al día siguiente, la agresividad disminuía al segundo día, excepto si previo a ese segundo encuentro los perdedores eran privados del sentido visual, algo similar a lo ocurrido si los privaban del sentido del olfato. Sin embargo la agresividad no se modificaba si al segundo día pintaban la cara del ganador, cambiando así las claves visuales del reconocimiento facial (Bruce *et al.* 2018). Con los experimentos que hemos planteado sumamos evidencia sobre cómo los animales pueden aprender de una experiencia previa y cambiar su comportamiento en encuentros sucesivos, demostrando,

particularmente en machos de pez cebra, que este efecto es específico del oponente y que se observa con intervalos de 24 horas, lo que nos estaría hablando de una formación de memoria de largo término. Esto nos llevó a preguntarnos si impedir la activación de los receptores de NMDA, involucrados en la formación de memoria de largo término, mediante un antagonista de los mismos, impediría el efecto observado en un segundo encuentro, como también explorar si con intervalos mayores a 24 horas entre enfrentamientos dicho efecto se seguía manteniendo, evaluando así la duración de esta memoria.

Las memorias asociadas a las interacciones sociales y al reconocimiento individual son muy importantes para el fitness de los individuos y varias especies muestran este tipo de memorias. En ratones las memorias asociadas al reconocimiento individual se observan 30 minutos, 24 horas, 3 días y 7 días luego de la primera interacción, lo que demuestra la larga duración de las mismas (Kogan *et al.*, 2000). Las ratas de laboratorio pueden reconocer y recordar un olor familiar (olor de individuos con los que estuvieron conviviendo) luego de 1 y 48 horas, pero no luego de 96 horas (Burman y Mendl, 2006). En otras especies, estas memorias pueden ser mucho más duraderas, como el caso de los cuervos que pueden responder de manera diferente a un llamado familiar que a uno no familiar, incluso 3 años más tarde de haberlo escuchado (Boeckle y Bugnyar, 2012) o como el caso de los delfines que pueden recordar y responder a un llamado familiar 15 años más tarde (Bruck *et al.*, 2013).

No solo puede ser beneficioso el poder recordar a un individuo en particular, sino también la interacción con ese individuo y cambiar el comportamiento subsiguiente de manera acorde. Por ejemplo, en *Drosophila melanogaster*, luego de establecida la jerarquía, las ganadoras se retiran menos y arremeten más, mientras que en las perdedoras pasa lo contrario, utilizando estrategias de menor intensidad en encuentros sucesivos (Yurkovic *et al.*, 2001). En el pez

Rivulín de manglar, *Rivulus marmoratus*, la experiencia de perder incrementa las probabilidades de retirarse inmediatamente en un segundo encuentro y disminuyen las probabilidades de iniciar un nuevo conflicto (Hsu y Wolf, 2001). Como hemos visto, el recordar esta experiencia previa y cambiar el comportamiento o las estrategias en encuentros posteriores puede ser beneficioso para los individuos previniendo posibles lesiones y disminuyendo el gasto energético. Además, se ha observado en machos de pez cebra que una vez establecida una relación de dominancia, esta se puede mantener hasta por 5 días, en un contexto de contacto continuo por parte de los individuos (Paull *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta estas evidencias esperamos que la memoria que hemos observado a las 24 horas sea una memoria robusta y de mayor duración. Para evaluarlo llevamos a cabo los mismos experimentos de encuentros sucesivos entre los mismos oponentes, pero aumentando el intervalo entre encuentros. Encontramos que el efecto de resolver un segundo encuentro con menores niveles de agresividad se observa con intervalos mayores a 24 horas, tanto de 48 como de 72 horas, lo que demuestra que efectivamente este tipo de memorias asociadas a interacciones sociales pueden ser de larga duración. Sin embargo, es necesario en estudios futuros evaluar intervalos mayores, para encontrar la duración máxima de este tipo de memorias, es decir aumentar el intervalo hasta que no se observe el efecto de disminución de la agresividad. Luego de un primer encuentro hay una formación y consolidación de una memoria relacionada a recordar a un oponente en particular, la cual luego puede ser evocada permitiendo modificar las estrategias comportamentales del segundo encuentro, sin embargo esta memoria puede decaer con el tiempo hasta extinguirse, por ello es importante analizar el tiempo máximo que puede pasar antes que esta memoria decaiga, lo cual además permitiría observar una restitución de los niveles de agresividad en un encuentro posterior, una vez que el oponente ya no sea recordado. En este sentido, en el pez paraíso se observó que los



oponentes podían recordar y cambiar su estrategia con intervalos de 24 horas entre encuentros, pero este efecto se perdía luego de 7 días (Miklósi *et al.*, 1992).

Con respecto a la formación de memoria, es bien conocido y se ha descrito profusamente el papel de los receptores de NMDA en la formación de memorias de largo término y como la administración de antagonistas de dicho receptor que impiden su activación tiene un efecto amnésico (Lutzu y Castillo, 2021). Una droga muy utilizada es el antagonista no competitivo de este tipo de receptores, MK-801, el cual se puede disolver en agua y ser incorporado por los peces. Blank y colaboradores (2009) encontraron que en un paradigma de evitación inhibitoria de un único ensayo, en donde se asocia un lado oscuro con un estímulo aversivo, shock eléctrico, y un lado blanco como un sitio seguro, los individuos de pez cebra aprenden a abstenerse de nadar del compartimento blanco al oscuro para evitar el shock eléctrico. Dicho aprendizaje fue recordado por 24 horas. Sin embargo, si inmediatamente después del entrenamiento eran expuestos durante 15 minutos a una solución 20  $\mu\text{M}$  de MK-801, no mostraban indicios de aprendizaje durante la evaluación, es decir que volvían a nadar hacia el sitio oscuro, demostrando como el tratamiento con esta droga inhibe la formación de memoria de largo término (Blank *et al.*, 2009). En otro experimento de aprendizaje asociativo, en donde los individuos aprendían a asociar un estímulo neutro con la presencia de un conespecífico en un laberinto, la exposición durante 30 minutos con la misma solución de MK-801 mostraba un efecto amnésico en los individuos tratados (Sison y Gerlai, 2011a). En esta tesis encontramos que un tratamiento de 15 minutos en solución 20  $\mu\text{M}$  de MK-801 no era suficiente para generar un efecto amnésico, bajo el paradigma utilizado. Observamos que al tratar 15 minutos con MK-801 y 15 minutos con agua, en ambos casos el segundo encuentro se resolvía con menores niveles de agresividad, por lo que este tiempo de tratamiento no tendría un efecto amnésico. Creemos que debido a las diferentes

características de nuestro paradigma, tanto de la experiencia como su evaluación, 15 minutos no sean suficientes para generar un efecto amnésico, como sí pasaba en otros trabajos que evaluaban otros tipos de aprendizaje. Al evaluar en experimentos piloto tiempos de 30 y 45 minutos y no obtener resultados preliminares prometedores, evaluamos un tiempo de 60 minutos. En este caso, cuando los peces fueron expuestos durante 60 minutos a agua luego del primer encuentro, resolvieron el segundo con menores niveles de agresividad, tal como veníamos observando en experimentos previos. Sin embargo, si el tratamiento se realizaba con la solución de MK-801 20  $\mu\text{M}$ , ahora el segundo encuentro se resolvía sin una disminución de la agresividad, efecto similar al de presentarles un oponente desconocido. Esto nos estaría mostrando que en estas condiciones de tratamiento, el MK-801 estaría teniendo un efecto amnésico sobre la formación de memoria asociada a interacciones sociales. A partir de esto surge una duda. ¿No podría ser que el efecto observado se deba a un efecto comportamental a largo de plazo de la droga y no al efecto sobre la formación de la memoria? Swain y colaboradores encontraron que exponer a peces cebra a 2 o 20  $\mu\text{M}$  de MK-801 por 60 minutos aumentaba el nado en círculos, pero la exposición a 20  $\mu\text{M}$  no aumentaba la actividad general de nado (Swain *et al.*, 2004). En otros reportes se encontró que al testear inmediatamente después de la exposición a 20  $\mu\text{M}$  de MK-801, los individuos mostraban hiperactividad, incrementando la velocidad promedio y la distancia recorrida (Seibt *et al.*, 2010). Además, se observó que tratamientos por 15 minutos con 5  $\mu\text{M}$  de MK-801 generaban que los individuos pasarán menos tiempo cerca de un espejo, y de un compartimento con conespecíficos, lo que estaría relacionado con un déficit social (Zimmermann *et al.*, 2016). Efectos similares se observaron al tratar a peces cebra durante 3 horas con una solución 4  $\mu\text{M}$  MK-801 durante 7 días (Perdikaris y Dermon, 2022). En esta tesis, cuando tratamos durante 60 minutos con la solución MK-801 y testeamos a las 24 horas, en 7 de 17 diadas observamos un déficit social al segundo día, en el cual los peces no

presentaron interacciones y mostraron un nado aletargado. Creemos que, si bien en 10 parejas de peces se observa interacción agonística y altos niveles de agresividad en el segundo día, en otros peces tal vez más sensibles al tratamiento, la droga tuvo un efecto sobre su comportamiento a largo término. Este efecto comportamental fue independiente del efecto sobre la formación de memoria, y solo se observó en un grupo de peces. De esta manera podemos ver que esta droga puede tener un efecto inespecífico comportamental, incluso 24 horas después del tratamiento. Para poder evaluar el efecto amnésico, sin riesgo de tener un efecto inespecífico comportamental, realizamos otra serie de experimentos en los cuales luego del tratamiento con MK-801 se dejó un intervalo de 48 horas hasta el segundo encuentro, tiempo que creemos suficiente para ver el efecto sobre la memoria, y que todos los peces se hayan recuperado del posible efecto inespecífico sobre el comportamiento (Mariana Feld, comunicación personal). En este set de experimentos, nuevamente observamos que el segundo encuentro se resolvía sin una disminución de la agresividad, el mismo efecto que cambiar el oponente o testear a las 24 horas luego del MK-801. En ningún caso se vio un déficit social, por lo que consideramos que las 48 horas fue un tiempo suficiente para atenuar efectos inespecíficos comportamentales, observándose el efecto de impedir la formación de memoria de largo término el primer día sobre las características del encuentro del siguiente. .

Un experimento que quedó pendiente es realizar el mismo protocolo pero tratando a los peces con MK-801 6 horas después del primer encuentro, es decir realizar el tratamiento por fuera de la ventana de consolidación de la memoria y así observar el efecto que tendría la droga sobre los comportamientos a las 48 horas, esperando una resolución similar en el segundo encuentro ya que la droga no interferiría con la formación de memoria. Creemos que teniendo en cuenta que la bibliografía apunta a un déficit social debido al MK-801 y que observamos ese mismo efecto en algunos de nuestros enfrentamientos, la no disminución en los niveles de agresividad del segundo encuentros no se debe a un efecto comportamental de MK-801 (ya

que su efecto apunta a disminuir las interacciones sociales, no a aumentarlas) sino más bien a que al inhibir la formación de memoria relacionada a recordar el oponente y la pelea previa, ahora los individuos se enfrentan en el segundo día como si no tuvieran experiencia previa entre sí. Es importante mencionar que se encontraron evidencias de que MK-801 no tendría un efecto sobre el sistema visual ni en pez cebra (Sison y Gerlai, 2011b) ni en otras especies (Ahlander *et al.*, 1999; Mutlu *et al.*, 2011), poniendo de manifiesto que no estaría comprometido este sistema al realizar el tratamiento de los individuos.

Los experimentos realizados para esta tesis en conjunto demuestran que los machos de pez cebra tienen la capacidad de reconocer y recordar a un oponente en particular y la pelea con él, para luego utilizar esta información en encuentros sucesivos y modificar los despliegues comportamentales de manera acorde a la evaluación realizada. Este recuerdo dura por lo menos 72 horas. Sugerimos que sería necesaria la formación de una memoria de largo término en la cual estaría involucrado el sistema glutamatérgico, más específicamente los receptores NMDA.

Una vez determinado el paradigma de memoria asociada a interacciones sociales en la especie, y el efecto sobre la misma de un antagonista de receptores de NMDA, buscamos evaluar la actividad cerebral en ciertos núcleos que se cree estarían asociados a la agresividad, el aprendizaje emocional y la memoria. Teles y colaboradores (2015), encontraron que al comparar expresión de mRNA de *c-fos* para los núcleos Dm, DI, Vv, Vs y POA, individuos aislados visualmente de un conoespecífico mostraban niveles más bajos de expresión en todos estos núcleos, que individuos expuestos a un encuentro agonístico o a interacción frente a un espejo. Siendo el área Vs la que presentó mayor respuesta frente a la interacción social, ya sea en un encuentro agonístico o en un encuentro frente al espejo (Teles *et al.*, 2015). Estas áreas forman parte del SDMN, siendo áreas interesantes para evaluar

cómo se relacionan con encuentros agonísticos. En ese trabajo observaron el efecto de la interacción agonística con todos los comportamientos agresivos involucrados sobre la activación cerebral.

Chaudhuri y colaboradores evaluaron los patrones temporales de expresión de la proteína *C-fos* en el neocórtex de rata, encontrando, mediante técnicas inmunohistoquímicas, que la expresión de dicha proteína se podía observar entre 30 minutos y 2 horas luego del estímulo, con un pico a los 90 minutos (Chaudhuri *et al.*, 2000). Estos resultados son consecuentes con evidencias previas que postulaban que el mensajero de *c-fos* se induce unos pocos minutos después del estímulo con picos a los 30 minutos, mientras que los niveles de proteína tendrían un pico entre 1 y 3 horas después del estímulo (Kovács, 1998). Teniendo en cuenta estas evidencias previas, muchos trabajos en pez cebra utilizan tiempos de 60 minutos para observar los picos de expresión de la proteína, aunque también se la puede observar a los 30 minutos (Von Trotha *et al.*, 2014; Chatterjee *et al.*, 2015). En la presente tesis, al sacrificar a los individuos inmediatamente después de la interacción de 30 minutos, no estaríamos viendo el efecto de la resolución de la pelea y los despliegues agresivos en sí, si no que observaríamos el efecto de los primeros momentos de la interacción, en los cuales se podrían activar ciertos núcleos relacionados a la interacción social entre individuos, como también aquellos relacionados a una evocación de la memoria formada el día anterior (individuos con experiencia previa contra ese oponente). Sin embargo, de presentarse el estímulo como novedoso (por ejemplo en individuos tratados con MK-801 el primer día), podríamos observar la activación relacionada a la formación de una memoria sobre dicho individuo en particular. Por este motivo decidimos analizar la expresión de proteína a los 30 minutos de la primer interacción del segundo encuentro, evitando así una confusión de efectos con la activación debido a la pelea y los despliegues agresivos en sí. Sin embargo, sería interesante

poder evaluar la expresión a tiempos mayores, por ejemplo a 60 minutos, abarcando el pico de expresión, como también a los 90 minutos, donde observaríamos el efecto del encuentro agonístico y la resolución, para poder compararlos con nuestros resultados. Esto podría permitirnos también determinar el tiempo óptimo para evaluar la expresión de C-fos en nuestro paradigma.

Para los núcleos ventrales del telencéfalo aquí evaluados hemos visto una mayor activación neuronal en los peces con interacción social (ya sea que hayan sido pretratados o no con MK-801 luego del encuentro previo) que en los peces control, sin interacción social, particularmente en el núcleo Vv, aunque el núcleo Vd pareciera mostrar la misma tendencia. Algo similar encontramos en el núcleo dorsal medial del telencéfalo (Dm), aunque la diferencia entre el control y los peces tratados con MK-801 el día anterior no es significativa, pareciera mantenerse la misma tendencia. Estos resultados sugerirían que estas zonas estarían involucradas en esa primera interacción social, independientemente de un reconocimiento o no del individuo. Al evaluar el núcleo dorsal lateral del telencéfalo (Dl) encontramos que presentaba una mayor activación solo en aquellos peces que habían sido tratados con MK-801 el primer día, no encontrándose diferencias entre los peces control y los que tuvieron interacción social sin el pretratamiento con MK-801. Como hemos mencionado, Teles y colaboradores encontraron diferencias en la activación de todos los núcleos analizados entre peces con y sin interacción social (Teles *et al.*, 2015), mientras que en nuestro trabajo no encontramos dichas diferencias en el núcleo Dl. Es importante recalcar por un lado, que en esta tesis cuantificamos proteína C-fos mediante técnicas inmunohistoquímicas, mientras que en el trabajo de Teles analizaron expresión génica mediante la cuantificación de ARN mensajero, lo cual no siempre correlaciona con los niveles de proteína debido a modificaciones post transcripcionales (Chatterjee *et al.*, 2015). Por otro lado, mientras en esta

tesis no evaluamos la interacción agresiva en sí, Teles y colaboradores observaron el efecto de la pelea entre individuos. Finalmente podría haber un efecto relacionado con la repetitividad de estímulos, como desarrollaremos a continuación.

Como hemos visto en los resultados comportamentales, el tratamiento con MK-801 luego del primer encuentro, generaba que en los encuentros sucesivos se mantengan los niveles de agresividad, algo similar a lo observado cuando al segundo día los individuos se enfrentaban a un oponente novedoso. De esta manera, en el tratamiento con MK-801, los individuos no habrían formado una memoria sobre el oponente del primer encuentro, y por lo tanto al segundo día estarían observando un oponente del cual no tienen recuerdo. Por otro lado, los individuos tratados con agua, al encontrarse al segundo día con el mismo oponente podrían evocar una memoria relacionada al reconocimiento individual. Estos resultados, junto con los resultados de activación neuronal nos sugerirían que el núcleo DI podría activarse frente a un estímulo novedoso (la presentación de un individuo del cual no tienen memoria) y estar involucrado en la formación de la memoria de largo término relacionada a recordar al individuo novedoso, pero no respondería de la misma manera durante la evocación de dicha memoria. Es importante señalar que la activación y respuesta a la que nos estamos refiriendo es mediante la expresión de C-fos, ya que como se ha observado en otros trabajos, frente al mismo estímulo no todos los genes de expresión temprana responden igual (Teles *et al.*, 2016).

En línea con nuestras suposiciones, en el gorrión común, Kimball y colaboradores observaron mediante inmunohistoquímica que individuos que eran expuestos durante varios días a una serie de objetos aumentaban la expresión de C-fos en el hipocampo caudal y el arcopallium medio ventral (homóloga a ciertas regiones de la amígdala de mamíferos), únicamente cuando al día siguiente se les presentaba un objeto novedoso, al cual no habían sido

expuestos previamente. Sin embargo, si les presentaban un objeto al cual ya habían sido expuestos no observaban dicho incremento. Esto estaría sugiriendo que estas regiones estarían involucradas en el reconocimiento de objetos novedosos, pero no se activarían, a través de C-fos, con la exposición reiterada a un objeto (Kimball *et al.*, 2022). Evidencia similar se encontró en machos de ratas albinas, en las cuales se observó que individuos sin exposición a un laberinto mostraban niveles bajos de expresión de C-fos, y de otro IEG, C-jun, mediante técnicas inmunohistoquímicas. Estos niveles de expresión aumentaban considerablemente si las ratas eran expuestas de manera novedosa a un laberinto, pero el aumento era menor cuando la exposición era repetida. Este efecto se observó en distintas regiones cerebrales entre ellas el hipocampo, la corteza somato sensorial y el cerebelo (Papa *et al.*, 1993). En cuanto al núcleo Vv, Fan y colaboradores evaluaron en peces guppies (*Poecillia reticulata*) la activación neuronal relacionada a un aprendizaje social mediante la cuantificación de Ps6 (Fan *et al.*, 2022). Esta es una proteína ribosomal, cuya fosforilación es un indicador de activación neuronal (Knight *et al.*, 2012). Por lo tanto, si bien en este caso no se trata de un IEG, esta proteína ha sido ampliamente utilizada para evaluar activación neuronal en diversos contextos etológicos para estudiar distintos aspectos del comportamiento social en peces (Akinrinade *et al.*, 2023, Nunes *et al.*, 2021). Fan y colaboradores encontraron una mayor inmunomarca de Ps6 en el área preóptica y el núcleo Vv durante la adquisición de un aprendizaje social relacionado a una amenaza (mediante una clave química de alarma de conoespecíficos), poniendo de manifiesto la importancia del núcleo Vv en este tipo de aprendizajes (Fan *et al.*, 2022).

Es interesante remarcar que algunos trabajos en peces postulan que el núcleo DI estaría asociado principalmente al aprendizaje espacial. En experimentos de evitación activa utilizando un condicionamiento entre una luz verde y un shock eléctrico se observó en



*goldfish* que individuos con lesiones en el Dm presentaban un déficit en el testeo de este condicionamiento, pero si la lesión era en el Dl los individuos no presentaban este déficit. Por el contrario en experimentos de aprendizaje espacial observaron lo contrario, las lesiones en el Dm no tenían efecto en el condicionamiento, pero si lo tenían las lesiones en el Dl. Estos resultados sugerirían que Dl estaría involucrado en el aprendizaje espacial, mientras que Dm lo estaría en el aprendizaje emocional (Portovella *et al.*, 2002). En esta tesis encontramos evidencia de que este núcleo podría estar involucrado en el aprendizaje social, particularmente en el reconocimiento de un individuo novedoso. Sería interesante poder evaluar la actividad de este núcleo en individuos a los que se les presentó un oponente distinto en el segundo encuentro. De esta manera podríamos comparar nuestros resultados con la activación en peces que tuvieron una experiencia previa, pero que se enfrentan a un desconocido al segundo día. Estos datos nos permitirían reforzar (o no) la influencia de Dl en el aprendizaje social.

Como ya se mencionó, Teles y colaboradores evaluaron en pez cebra posibles diferencias entre ganadores y perdedores cuantificando la expresión del mensajero de *c-fos*. No encontraron diferencias para las áreas Dm, Dl, Vv, Vs pero si en el área pre-óptica, POA, en donde los perdedores mostraron una mayor activación (Teles *et al.*, 2015). En esta tesis no encontramos diferencias entre ganadores y perdedores ni para el tratamiento con MK-801 ni para el tratamiento con agua. Sin embargo, es importante remarcar, por un lado que en nuestro caso estamos evaluando a los ganadores y perdedores de un encuentro previo y no inmediatamente después de ganar o perder el encuentro como en el trabajo mencionado. Por otro lado la cantidad de datos de cada estado en el tratamiento con agua no es el suficiente como para realizar un análisis estadístico concluyente. Sería importante contar con más datos de ganadores y perdedores tratados con agua para poder comparar si el hecho de haber

ganado o perdido un encuentro puede tener un efecto a largo término, según si recuerdan al oponente (tratados con agua) o no tienen recuerdo del mismo (tratados con MK-801).

En otro trabajo en pez cebra, mediante la cuantificación de Ps6, marcador de activación neuronal, a pesar de no encontrar diferencias al analizar áreas cerebrales puntuales entre ganadores y perdedores, si las encontraron al evaluar la conectividad funcional entre los distintos núcleos que conforman la SDMN, es decir al analizar los patrones de co-activación entre núcleos. En este caso encontraron patrones diferentes para ganadores y perdedores, siendo que los ganadores mostraron una mayor co-activación positiva de los núcleos, pero no mostraron cambios en la co-activación negativa, mientras que los perdedores mostraron un decrecimiento en la co-activación tanto negativa como positiva (Scaia *et al.*, 2022). Si bien en ese trabajo se utilizó otro marcador de actividad neuronal, pone de manifiesto no solo las posibles diferencias entre ganadores y perdedores, sino también la información complementaria que puede aportar el evaluar como los núcleos están relacionados. Es importante resaltar que en ese trabajo están observando la activación neuronal correspondiente al encuentro agonístico. En esta tesis como ya hemos mencionado estamos evaluando el reconocimiento inicial de los individuos. Las correlaciones presentadas en esta tesis (material suplementario 8.6) nos sirven para una evaluación exploratoria y cualitativa, presentando otra aproximación al análisis de actividad cerebral, sin embargo serían necesarios análisis estadísticos para determinar las diferencias o no entre tratamientos y poder sacar conclusiones robustas sobre estos resultados. Por otro lado, contamos con las inmunohistoquímicas de otras regiones cerebrales, particularmente PoA, Vs y Vc, y esperamos a futuro poder cuantificarlas para aumentar la cantidad de nodos y poder así evaluar la conectividad funcional entre la mayoría de los núcleos que conforman el SDMN.

Una vez evaluado este efecto en machos, nos preguntamos si podríamos encontrar diferencias en la resolución de los encuentros si los oponentes eran hembras. Sabemos por bibliografía que las hembras de pez cebra presentan los mismos despliegues agresivos que los machos, con dinámicas muy similares, aunque con algunas diferencias (Scaia *et al.*, 2022). Por trabajos previos en el laboratorio podemos distinguir dos estados reproductivos, pre y post-puesta de huevos, los cuales se podían identificar a simple vista para luego corroborarse mediante el índice gonadosomático, y que presentaban comportamientos distintos, particularmente una mayor atracción por un macho conespecífico por parte de las hembras prepuesta (Cavallino *et al.*, 2019). En este contexto, nos planteamos no solo si las hembras resolvían encuentros sucesivos contra el mismo oponente con menores niveles de agresividad, sino que si este efecto era diferente según el estado reproductivo de las mismas. Lo que observamos fue que al igual que en machos, las hembras resolvían el segundo encuentro con menores niveles de agresividad. Lamentablemente la cantidad de datos de cada estado reproductivo no fue la suficiente como para realizar un análisis estadístico confiable comparando ambos, pero cualitativamente no pareciera observarse un efecto del estado reproductivo. En futuros experimentos sería necesario aumentar la cantidad de peleas de cada estado reproductivo para comprobar que efectivamente no exista un efecto diferencial debido a este, así como también realizar los experimentos de cambio de oponente para comprobar que en hembras el efecto se deba a recordar al oponente en particular, como pasa en machos. Es importante mencionar que si bien en experimentos previos del laboratorio se llevaron a cabo una mayor cantidad de peleas para cada estado reproductivo (Tesis de licenciatura de Chara Salustri) las mismas fueron llevadas a cabo en un horario distinto (14-17 horas) y por lo tanto no pudieron ser incorporadas a este análisis.

## Conclusiones finales

Teniendo en cuenta los 5 objetivos planteados inicialmente podemos decir que:

- 1) Encontramos un efecto de la experiencia previa en machos de pez cebra, resolviendo encuentros sucesivos con menores niveles de agresividad únicamente al enfrentarse al mismo oponente, pero no contra un oponente novedoso.
- 2) Dicho efecto se observa incluso con intervalos entre encuentros de hasta 72 horas.
- 3) El tratamiento con un antagonista de los receptores NMDA (MK801) luego del primer encuentro inhibiría la formación de memoria de largo término, generando que no se observen los efectos comportamentales de la experiencia previa en el siguiente encuentro.
- 4) Existe una activación diferencial de los núcleos cerebrales analizados, según la presencia o no de interacción social (Núcleo Vv principalmente, y una tendencia en Vd y Dm), como también una mayor activación del núcleo DI en individuos que habían sido tratados con MK-801, lo que sugiere que DI estaría relacionado con el encuentro novedoso con un individuo, pero no así con la exposición repetida al mismo.
- 5) Las hembras presentan el mismo efecto comportamental de la experiencia previa en encuentros sucesivos que en machos, resolviendo el segundo con menores niveles de agresividad.

Con estos datos presentamos evidencia acerca de la formación de memoria de largo término asociada a interacciones sociales, la cual dependería de los receptores NMDA y tendría un correlato neuronal a nivel de distintos núcleos telencefálicos, particularmente en el núcleo dorsolateral (DI). Sumamos evidencia acerca del reconocimiento individual en la especie, como también de la modulación comportamental debido a la experiencia previa.

*Esta tesis está dedicada a la memoria de Matías Pandolfi, cuya pasión por el comportamiento animal y su rol como director fueron fundamentales no solo para la realización de esta tesis de doctorado, sino también para mi desarrollo como investigador, dejando una marca (que no olvidaremos) en todos los que tuvimos la suerte de compartir este camino con él. Gran parte de esta tesis se llevó a cabo bajo su dirección.*

## **8. Material suplementario**

### 8.1 Puesta a punto inmunohistoquímica

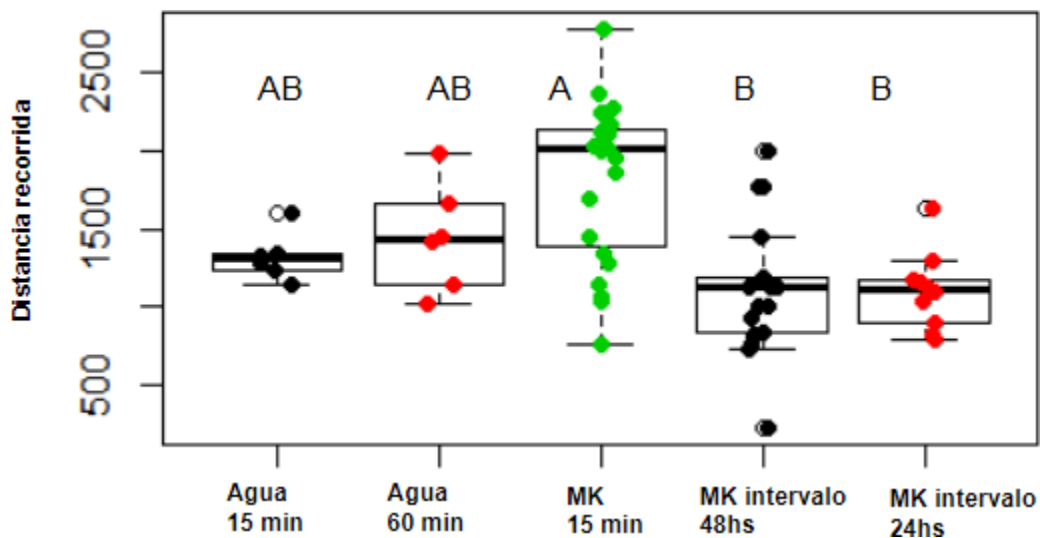
Para poner a punto la técnica de inmunohistoquímica para C-fos se probaron distintos protocolos hasta encontrar el adecuado para dicha técnica. Inicialmente se realizaron cortes en criostato, fijando las muestras con paraformaldehído, tratamiento con sacarosa, e inclusión en crioplast, para luego cortar en criostato a 16  $\mu\text{m}$ . Al no obtener buenos resultados en cuanto a la preservación del tejido y la inmunomarca, realizamos una serie de inmunohistoquímicas en paralelo con muestras fijadas con bouin o formalina 10% con y sin desenmascaramiento, y con distintas concentraciones de anticuerpo primario. Se seleccionó el protocolo detallado en el capítulo 5 ya que fue con el cual se obtuvieron los mejores resultados.

### 8.2 Ethovision

Con el objetivo de evaluar si los tratamientos con MK-801 tienen algún efecto sobre el comportamiento de los peces, cuando estos se encontraban aislados, se filmó a los individuos en su pecera de aislamiento visual, durante 5 minutos después de ser expuestos a la solución de MK-801 o agua, y durante 5 minutos al día siguiente, antes del segundo encuentro. En ambos casos, se analizó el momento en que los peces aún estaban separados por la barrera. Estos videos se analizaron mediante el software *Ethovision* (noldus), el cual permitió identificar a un individuo y seguirlo a lo largo de la pecera, cuantificando la velocidad máxima alcanzada, la distancia total recorrida y el porcentaje de tiempo que pasa en la mitad

superior o inferior del acuario. Se excluyen del análisis final aquellos casos en donde el tiempo que el ethovision no puede seguir al individuo focal (no lo reconoce en el video) es mayor a un 10% del tiempo total.

Se comparó la distancia total recorrida por cada individuo entre el intervalo inmediato después del tratamiento y el intervalo inmediato anterior al segundo encuentro. Se realizaron comparaciones no paramétricas de a pares para datos pareados (wilcoxon signed rank test). Con el objetivo de evaluar si los tratamientos con MK-801 generaban algún cambio en la actividad de nado de los individuos se comparó la distancia recorrida entre los tratamientos de: Agua 15 minutos, Agua 60 minutos, MK-801 durante 15 minutos, Mk-801 durante 60 minutos y 48 horas de intervalo, MK-801 durante 60 minutos y 24 horas de intervalo, para el primer día y para el segundo. A continuación se muestran los resultados de la comparación entre tratamientos en el día 1

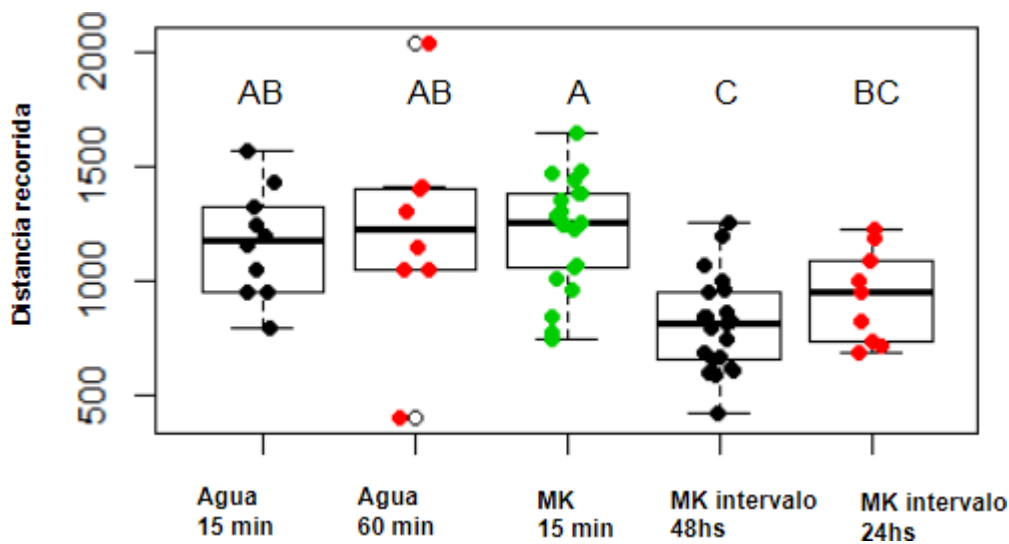


Distancia total recorrida en cm, para cada tratamiento del primer día. Letras distintas indican diferencias significativas.

Para el primer intervalo cuantificado, inmediatamente después del tratamiento del primer día, solo se observaron diferencias significativas entre el tratamiento MK-801 durante 15 minutos y el tratamiento MK-801 durante 60 minutos con intervalo de 48 horas (MK 15 min: 2017 cm, n=23; MK intervalo 48h: 1121 cm, n=17; p-valor=0.0011) y el tratamiento de 15 minutos MK-801 con el tratamiento 60 minutos MK-801 con intervalo de 24 horas (MK intervalo 24hs: 1113 cm, n=10; p-valor=0.004). Esperábamos que si el tratamiento con MK-801 tenía algún efecto inmediato sobre la movilidad de los individuos, esto se viera reflejado al comparar dichos tratamientos con los tratados con agua. Sin embargo, si bien encontramos que los peces expuestos a MK-801 durante 60 minutos mostraban una distancia recorrida menor que si se los exponía a la droga por 15 minutos, lo cual hablaría del efecto provocado por una exposición prolongada, no encontramos diferencias con los tratamientos con agua.

Para evaluar el posible efecto a largo plazo de los tratamientos, realizamos la misma comparación pero para el segundo día, inmediatamente antes del segundo encuentro. A continuación se muestran los resultados de la comparación entre tratamientos en el segundo día

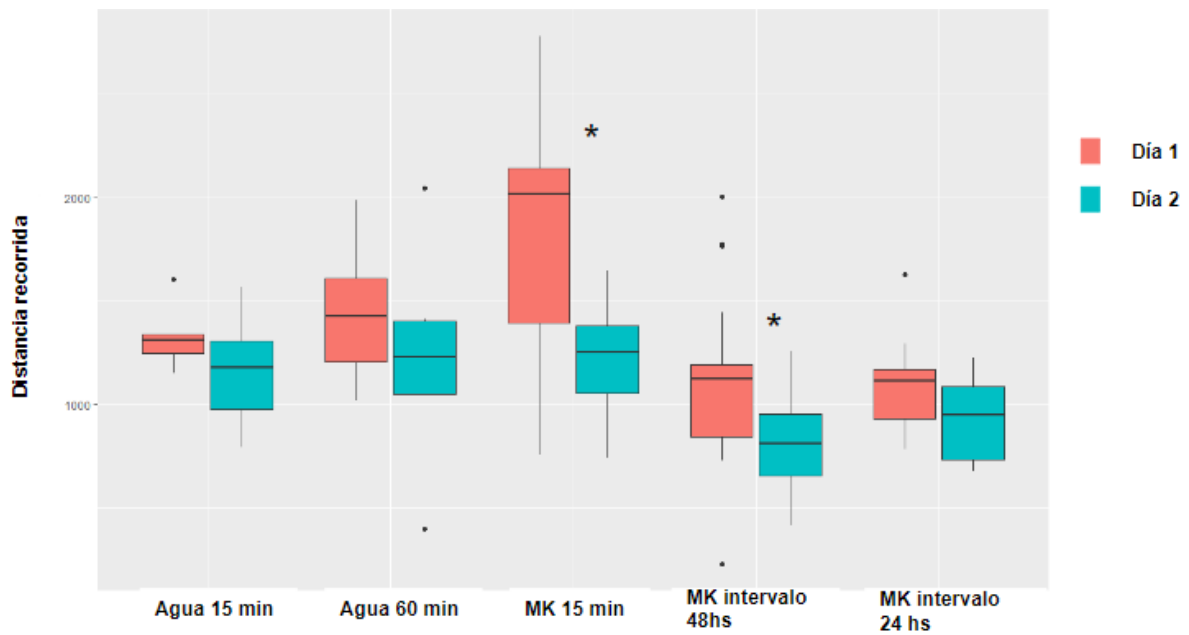




Distancia total recorrida en cm, para cada tratamiento del segundo día. Letras distintas indican diferencias significativas.

En el segundo día nuevamente encontramos diferencias significativas entre el tratamiento con MK-801 durante 15 minutos y el tratamiento por 60 minutos MK-801 con intervalo de 48 horas (MK 15 min: 1212 cm, n=21; MK intervalo 48 horas: 808 cm, n=21; p-valor=0.00003), y entre MK 15 minutos y el tratamiento por 60 minutos MK-801 con 24 horas de intervalo (MK intervalo 24hs: 932 cm, n=9). En este caso si se encontró una diferencia significativa entre el tratamiento con MK e intervalo de 48 horas al compararlo tanto con el tratamiento 15 minutos agua (Agua 15 min: 1167 cm, n=10; p-valor=0.009) y con el tratamiento 60 minutos agua (Agua 60 min: 1226 cm, n=8; p-valor=0.045).

Con el objetivo de evaluar si un posible efecto observado el primer día, se perdía luego de las 24 o 48 horas, se realizó la comparación entre los dos intervalos. Los resultados se muestran en la siguiente figura



Distancia total recorrida en cm, para cada tratamiento para el primer y segundo día. El asterisco indica diferencias significativas.

No se encontraron diferencias significativas para el tratamiento con agua por 15 minutos entre el primer y el segundo día (Día 1: mediana 1309 cm; Día 2: 1177 cm; p-valor=0.18; n=) ni con agua por 60 minutos (Día 1: mediana 1427 cm; Día 2: 1228 cm; p-valor=0.344; n=). Se encontró una diferencia significativa para el tratamiento con 15 minutos MK-801 (Día 1: mediana 2017 cm; Día 2: 1252 cm; p-valor=0.0001; n=) y para el tratamiento con 60 minutos MK-801 e intervalo de 48 horas (Día 1: mediana 1121; Día 2: mediana 811; p-valor=0.006; n=). Estos resultados eran esperados ya que posiblemente se observara un efecto inmediato de la droga sobre los comportamientos de nado (día 1), pero que dicho efecto se pierda a las 24 o 48 horas de haber sido expuesto a la droga. En cuanto al tratamiento durante 60 minutos con MK-801, no se encontraron diferencias entre el primer y segundo día, lo que podría estar demostrando que los efectos sobre el nado observados el primer día, se mantienen a las 24 horas, por lo menos en un contexto de aislamiento.

Se encontraron resultados similares para el resto de las variables analizadas (velocidad promedio, tiempo en la zona de arriba/debajo de la pecera).

### 8.3 Paquetes estadísticos utilizados

Para realizar el test de Friedman y las comparaciones de Dunn (capítulo 2) se utilizaron las funciones `friedman.test` y `dunn.test` respectivamente.

Los análisis no paramétricos de Wilcoxon se realizaron con las funciones `wilcox.test` y `wilcox_test` (para el cálculo del valor exacto) del paquete “coin” (capítulo 3, 4 y 5)

El análisis bayesiano se llevó a cabo mediante el siguiente script (capítulos 3, 4 y 6)

Distribución prior laxa

```
m = 0          # media
S = 1000       # desvío estandar
Prec = S^-2    # precisión o inversa de la varianza
```

Información de la muestra

```
M <- mean(VE)   # media
DE <- sd(VE)    # desvío estandar
V <- var(VE)    # varianza
n <- length(VE) # tamaño muestral
```

Distribución posterior

```
mp = (Prec/(n/V + Prec))* m + ((n/V)/(n/V + Prec))* M
dep = sqrt((1/(Prec + n/V)))
```

Intervalo de Credibilidad Bayesiano (ICB)

```
ICB = 1 # Se realizo un CDH unilateral

if(ICB == 1)
{Z <- qnorm(0.95, mean=0, sd=1)}
```

```

if(ICB == 2)
{Z <- qnorm(0.975, mean=0, sd=1)}

LI <- mp - (Z*dep)
LS <- mp + (Z*dep)

tablabayes<-data.frame(mp,dep,ICB,LI,LS)
tablabayes

##           mp      dep ICB      LI      LS
## 1 218.6393 45.85317   1 143.2176 294.0611

```

Diferencia con una media teórica o parámetro

```

MediaInformada = 0
DIFERENCIA <- (mp-MediaInformada)
ZBayes <- (MediaInformada - mp)/dep
Valor.p <- pnorm(abs(ZBayes), mean=0, sd=1, lower.tail = F)

tablabayes2<-data.frame(mp,"Media.teorica" =
MediaInformada,ZBayes,Valor.p)
tablabayes2

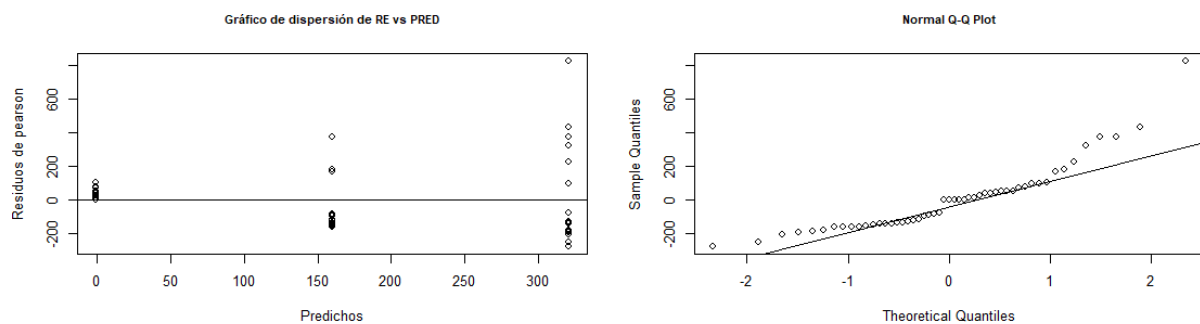
##           mp Media.teorica      ZBayes      Valor.p
## 1 218.6393              0 -4.768249 9.291707e-07

```

## 8.4 Supuestos

Los supuestos fueron probados a través de la prueba de Shapiro-Wilk y gráficamente qqplot (normalidad) y mediante el análisis gráfico de dispersión de residuos vs predichos (homogeneidad de varianza)

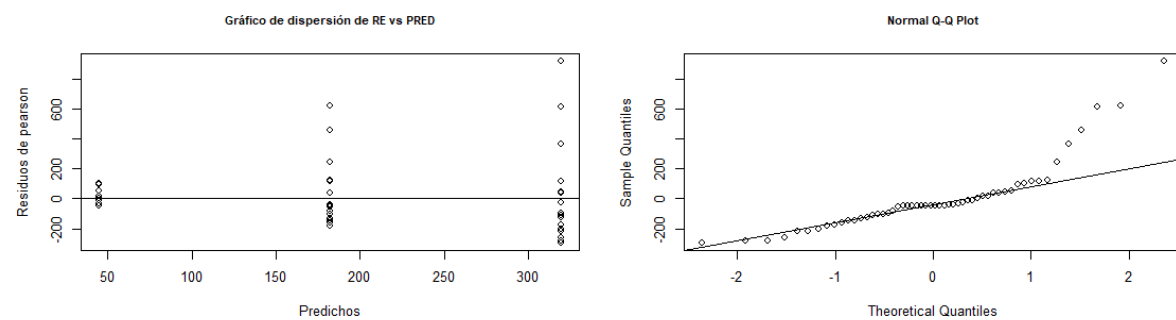
Supuestos Capítulo 2, sección 2.3.2



shapiro-wilk normality test

```
data: e  
w = 0.85389, p-value = 1.673e-05
```

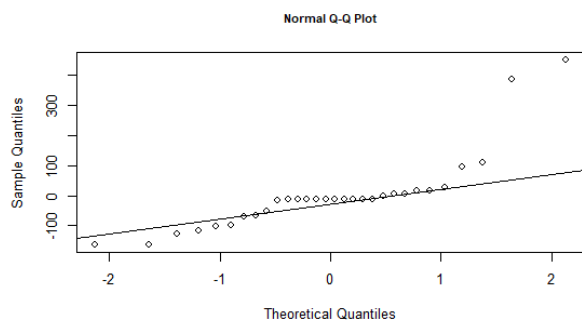
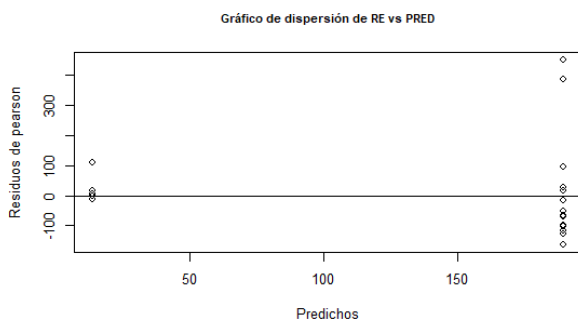
Supuestos Capítulo 2, sección 2.3.3



shapiro-wilk normality test

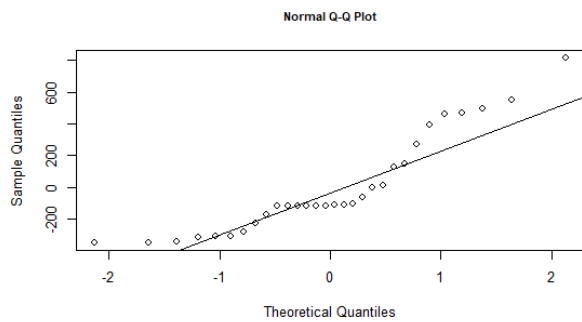
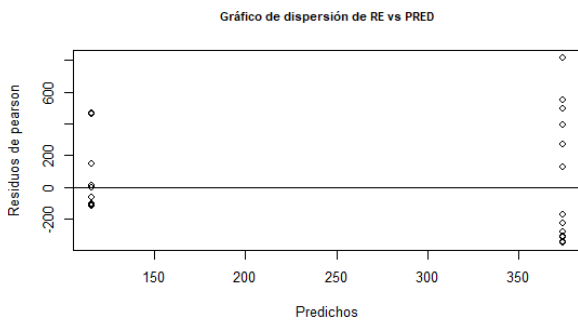
data: e  
w = 0.79567, p-value = 3.216e-07

Supuestos Capítulo 3 , sección 3.3.2



shapiro-wilk normality test

data: e  
w = 0.72633, p-value = 3.861e-06



shapiro-wilk normality test

data: e  
w = 0.87173, p-value = 0.001831

## Supuestos Capítulo 4, sección 4.3.2

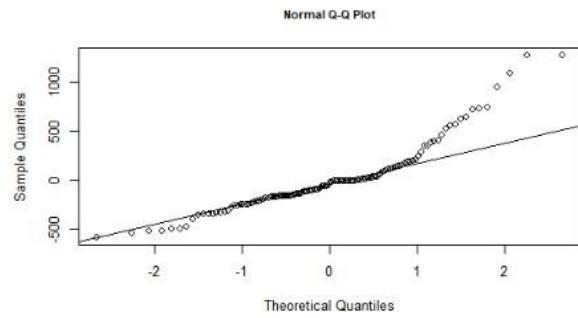
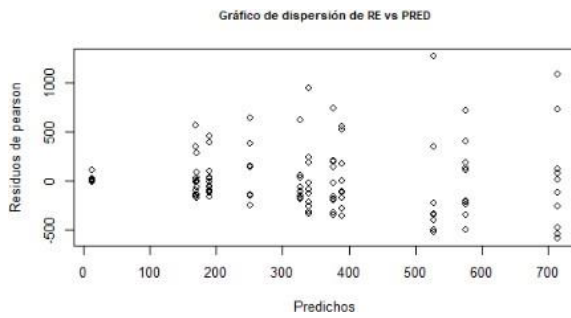
El supuesto de normalidad se probó mediante la función `shapiro.test` y gráficamente mediante `qqnorm`. La homogeneidad de varianza se puso a prueba gráficamente mediante el siguiente script.

```
setwd("C://Users//lcava//OneDrive//Escritorio//")
datos<-read_excel("tabla mk final.xlsx")
m1<-glst(tagre ~tratamiento*dia, correlation = corCompSymm(form =~ 1 |
cont), datos)

## Generalized least squares fit by REML
## Model: tagre ~ tratamiento * dia
## Data: datos
##      AIC      BIC    logLik
## 1624.936 1662.486 -798.4682
##
## Correlation Structure: Compound symmetry
## Formula: ~1 | cont
## Parameter estimate(s):
##      Rho
## 0.4162912
##
## ##
## Standardized residuals:
##      Min      Q1      Med      Q3      Max
## -1.6346370 -0.4994035 -0.1502069  0.2733352  3.5057466
##
## Residual standard error: 362.8328
## Degrees of freedom: 120 total; 108 residual

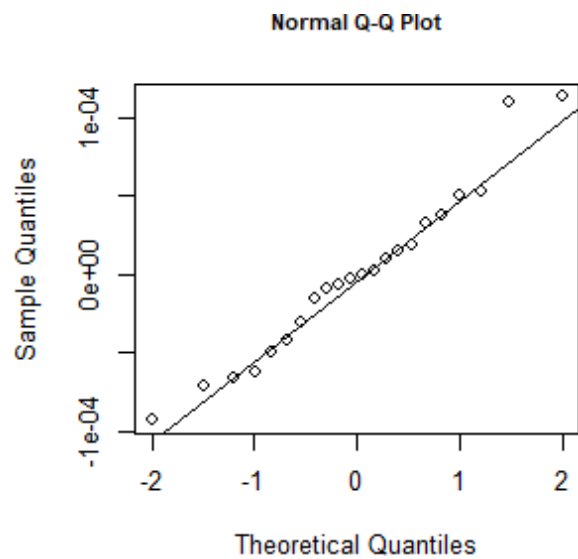
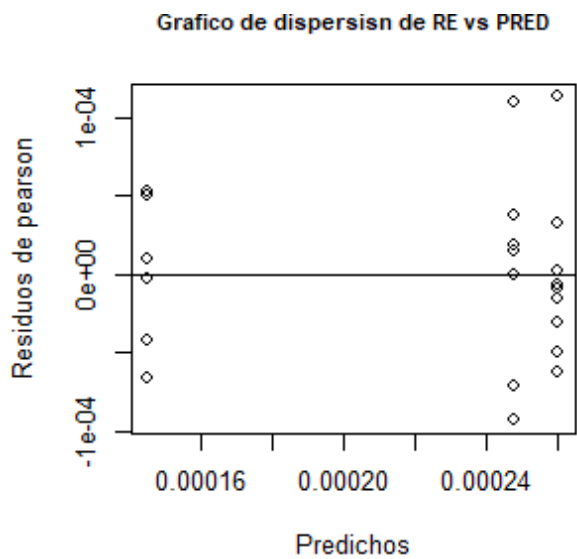
e<-resid(m1) # residuos de pearson
pre<-predict(m1) #predichos

par(mfrow = c(2, 2))
plot(pre, e, xlab="Predichos", ylab="Residuos de pearson",main="Grafico de
dispersin de RE vs PRED",cex.main=.8 )
abline(0,0)
qqnorm(e, cex.main=.8)
qqline(e)
par(mfrow = c(1, 1))
```



```
shapiro.test(e)
##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data: e
## W = 0.88325, p-value = 2.986e-08
```

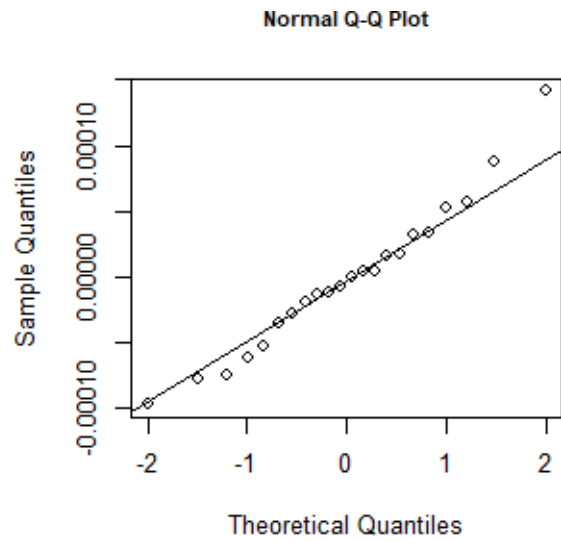
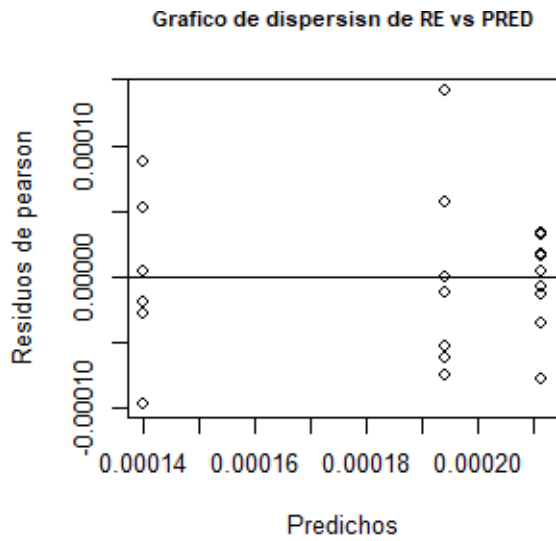
Supuestos Capítulo 5, sección 5.3.1



Shapiro-Wilk normality test data: W = 0.96616, p-value = 0.6225

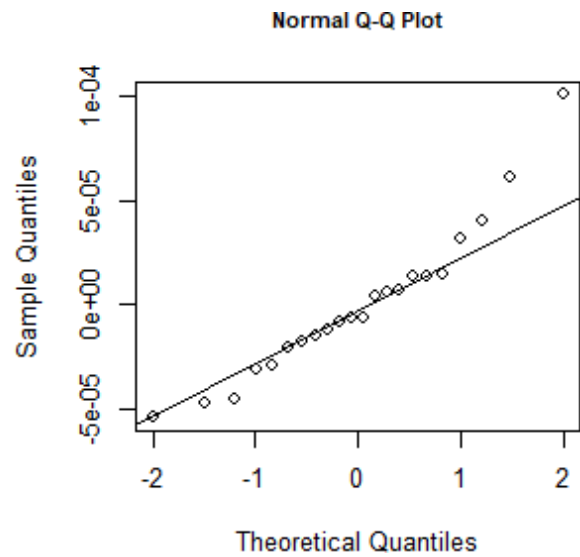
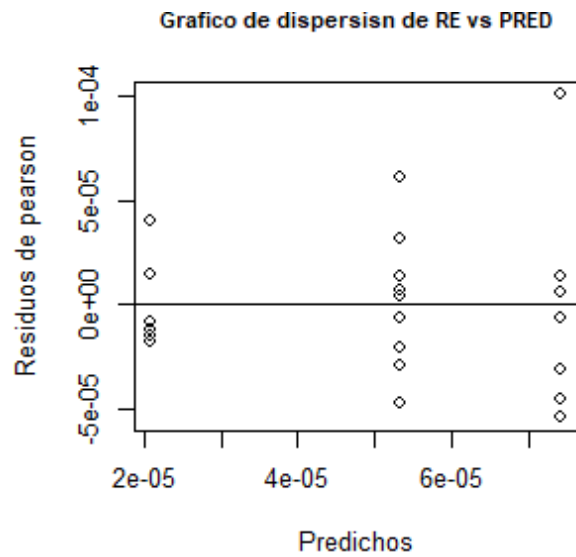


Supuestos Capítulo 5, sección 5.3.2



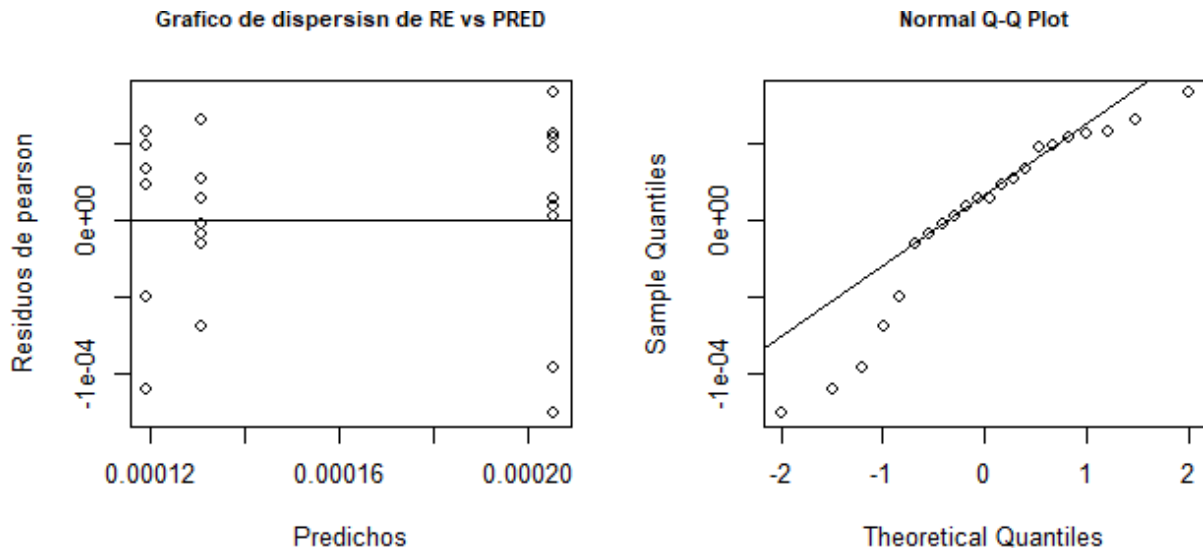
Shapiro-Wilk normality test data:  $W = 0.97256$ ,  $p\text{-value} = 0.7695$

Supuestos Capítulo 5, sección 5.3.3



Shapiro-Wilk normality test data:  $W = 0.9371$ ,  $p\text{-value} = 0.1724$

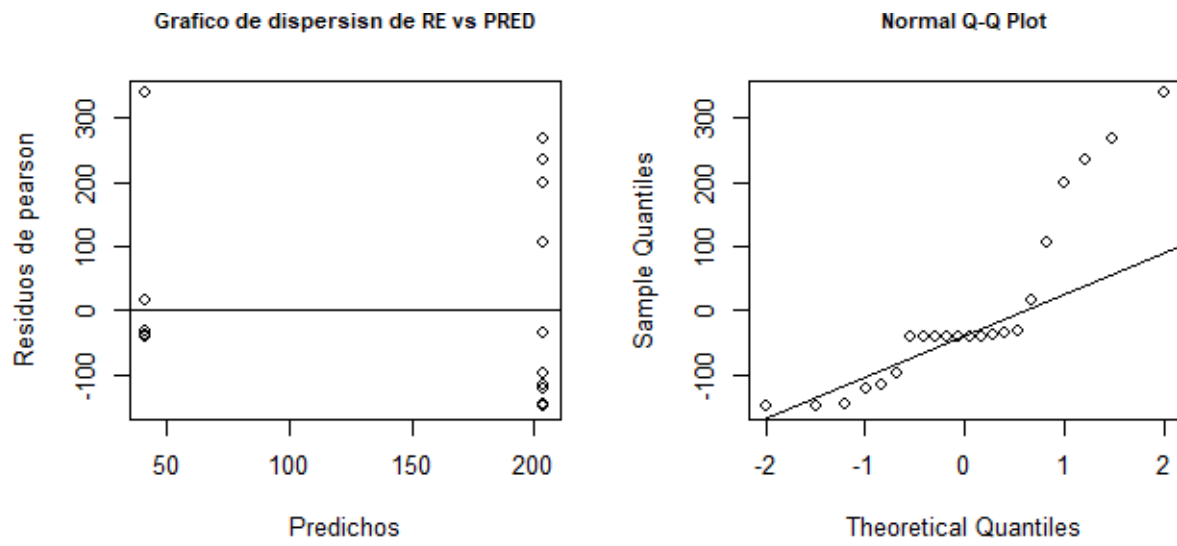
Supuestos Capítulo 5, sección 5.3.4



Shapiro-Wilk normality test data:  $W = 0.90599$ ,  $p\text{-value} = 0.03924$

Si bien en la mayoría de los núcleos se cumple el supuesto de normalidad, no es tan claro que se cumpla la homogeneidad de varianza. Teniendo en cuenta esto y la cantidad de datos utilizados para el análisis, se procedió a realizar un análisis no paramétrico. Sin embargo es importante mencionar que al realizar un GLM utilizando a los individuos como variable aleatoria, se obtuvieron resultados similares al análisis no paramétrico.

Supuestos Capítulo 6, sección 6.3.2



Shapiro-Wilk normality test data:  $W = 0.81402$ ,  $p\text{-value} = 0.0008362$

## 8.5 Análisis complementarios Wilcoxon

Tiempo de agresividad			Mordidas		
24 horas intervalo	15 min agua	15 min MK- 801	24 horas intervalo	15 min agua	15 min MK- 801
	0.003906	0.02439		0.03998	0.01953
24 horas intervalo	60 min agua	60 min MK- 801	24 horas intervalo	60 min agua	60 min MK- 801
	0.003906	0.2548		0.04883	0.4922
48 horas intervalo	Sin tratamiento	60 min MK- 801	48 horas intervalo	Sin tratamiento	60 min MK- 801
	0.01953	0.5566		0.001905	0.1074

## 8.6 Redes de conectividad funcional

Con el objetivo de evaluar la relación existente en la activación entre los distintos núcleos analizados (Vv, Vd, Dm y Dl), se calcularon las matrices de correlación de Spearman entre ellos para cada tratamiento: 1) individuos tratados con 60 minutos agua el primer día, 2) individuos control (aislamiento físico y visual, sin contacto), 3) individuos tratados por 60 minutos con MK-801 durante el primer día. En estos casos no se discrimino por ganador o perdedor previo.

	<b>Vv</b>	<b>Vd</b>	<b>Dm</b>	<b>Dl</b>
<b>Vv</b>		0.600	0.086	0.143
<b>Vd</b>	0.600		0.371	0.771
<b>Dm</b>	0.086	0.371		0.600
<b>Dl</b>	0.143	0.771	0.600	

Tabla1. Matriz de correlación de Spearman para el tratamiento agua.

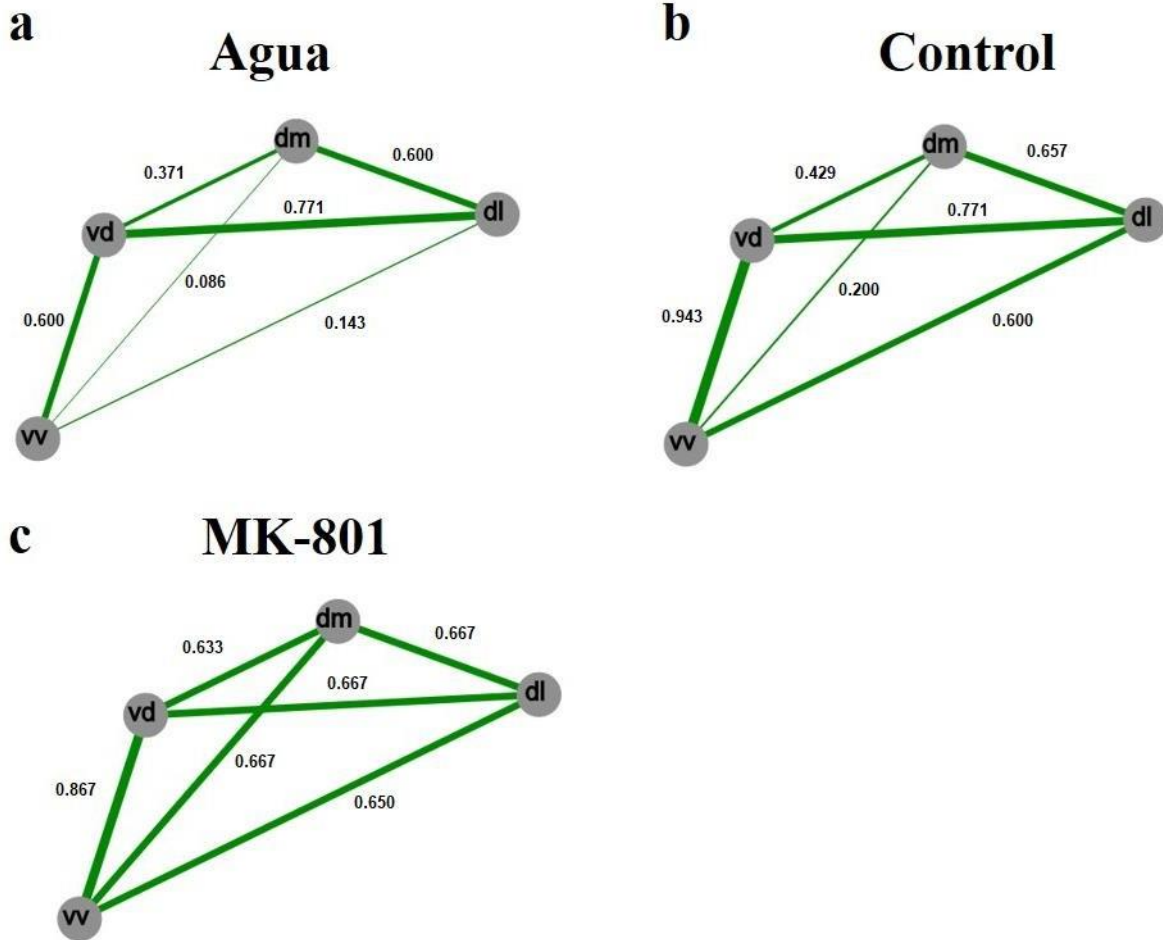
	<b>Vv</b>	<b>Vd</b>	<b>Dm</b>	<b>Dl</b>
<b>Vv</b>		0.943	0.200	0.600
<b>Vd</b>	0.943		0.429	0.771
<b>Dm</b>	0.200	0.429		0.657
<b>Dl</b>	0.600	0.771	0.657	

Tabla 2. Matriz de correlación de Spearman para el tratamiento control

	<b>Vv</b>	<b>Vd</b>	<b>Dm</b>	<b>DI</b>
<b>Vv</b>		0.867	0.667	0.650
<b>Vd</b>	0.867		0.633	0.667
<b>Dm</b>	0.667	0.633		0.667
<b>DI</b>	0.650	0.667	0.667	

Tabla 3. Matriz de correlación de Spearman para el tratamiento MK-801.

A partir de estas matrices de correlación, se construyeron a modo ilustrativo esquemas de redes en las cuales cada nodo representa el núcleo cerebral, las líneas verdes representan correlaciones positivas, mientras que las líneas rojas representan correlaciones negativas (ausente en estos resultados). Líneas más gruesas representan una mayor correlación entre los núcleos.



Redes de correlación entre los núcleos ventrales telencefálicos (Ventral y Dorsal, Vv y Vd respectivamente) y los dorsales (medio y lateral, Dm y Dl respectivamente) para los tratamientos: a) agua durante 60 minutos luego del primer encuentro. b) control, sin interacción social y c) MK-801 durante 60 minutos luego del primer encuentro. Las líneas verdes representan correlaciones positivas, mientras que las líneas rojas representan correlaciones negativas (ausente en estos resultados). Líneas más gruesas representan una mayor correlación entre los núcleos. Los números indican el coeficiente de correlación de Spearman para cada par de núcleos

Si bien estas correlaciones solo nos permiten hacer un análisis cualitativo, pareciera haber diferencias entre los 3 tratamientos. El tratamiento MK-801 muestra correlaciones positivas fuertes entre todos los núcleos, lo que indicaría altos niveles de co-activación entre ellos. Por otro lado, tanto el tratamiento control como el tratamiento agua parecen mostrar una correlación más débil entre el núcleo Vv y el Dm, lo que indicaría que, si bien sigue siendo una correlación positiva, la activación conjunta de estos núcleos no sería tan marcada como

en el tratamiento MK-801, por lo tanto no habría una co-activación fuerte entre ambos, sino que la actividad de cada área sería más independiente de la otra. En el caso del agua también pareciera haber una menor correlación entre el núcleo Vv y DI.

Con el objetivo de evaluar si el hecho de ser un perdedor o ganador previo podía tener un efecto sobre la conectividad funcional entre núcleos, se realizaron las matrices de correlación para ganadores y perdedores por separado. Este análisis se realizó únicamente para el grupo MK-801, pero no para el agua, debido al bajo número de muestras al separar en ganadores y perdedores en dicho tratamiento.

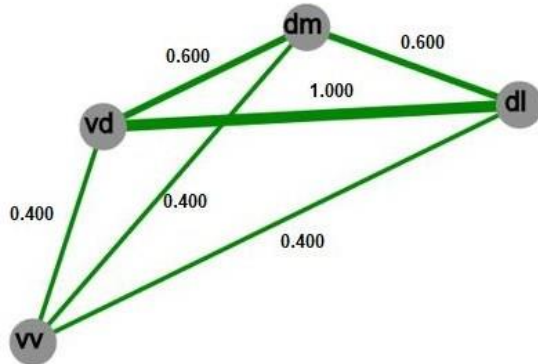
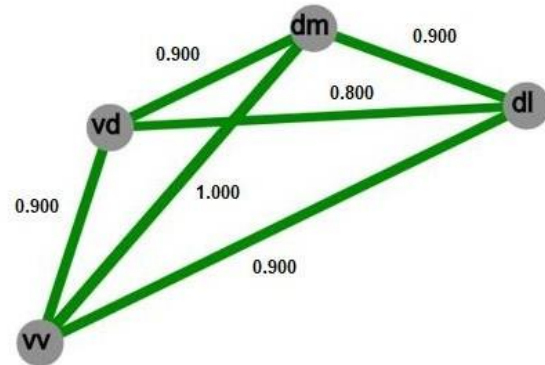
	<b>Vv</b>	<b>Vd</b>	<b>Dm</b>	<b>DI</b>
<b>Vv</b>		0.400	0.400	0.400
<b>Vd</b>	0.400		0.600	1.000
<b>Dm</b>	0.400	0.600		0.600
<b>DI</b>	0.400	1.000	0.600	

Matriz de correlación de Spearman para individuos ganadores en el tratamiento MK-801

	<b>Vv</b>	<b>Vd</b>	<b>Dm</b>	<b>DI</b>
<b>Vv</b>		0.900	1.000	0.900
<b>Vd</b>	0.900		0.900	0.800
<b>Dm</b>	1.000	0.900		0.900
<b>DI</b>	0.900	0.800	0.900	

Matriz de correlación de Spearman para individuos perdedores en el tratamiento MK-801



**a****Ganadores****b****Perdedores**

Redes de correlación entre los núcleos ventrales telencefálicos (Ventral y Dorsal, Vv y Vd respectivamente) y los dorsales (medio y lateral, Dm y Dl respectivamente) para a) ganadores del primer encuentro y b) perdedores del primer encuentro. En ambos casos son individuos tratados por 60 minutos con MK-801 luego del primer encuentro. Las líneas verdes representan correlaciones positivas. Líneas más gruesas representan una mayor correlación entre los núcleos. Los números indican el coeficiente de correlación de Spearman para cada par de núcleos

Nuevamente, si bien de manera cualitativa, pareciera haber diferencias entre ganadores y perdedores previos, presentando estos últimos una mayor co-activación de todos los núcleos analizados, mientras que para los ganadores el núcleo Vv pareciera no estar tan relacionado con el resto de los mismos.

Como conclusión de estos resultados podemos decir que en cuanto a la conectividad funcional (sin discriminar ganadores y perdedores) se observan correlaciones positivas entre las distintas áreas cerebrales analizadas, sugiriendo una co-activación de estas en los tres grupos experimentales. Sin embargo, este análisis también muestra evidencia que podría sugerir una conectividad diferencial entre estos. En este sentido, particularmente entre el núcleo Vv y el resto, la fuerza de esta asociación parecería ser más débil en los individuos que recibieron el pretratamiento de agua. Observamos en los peces tratados previamente con MK-801 una correlación positiva y fuerte entre todos los núcleos, mientras que en los peces

tratados con agua, la conexión entre Vv y los núcleos dorsales (tanto Dm como Dl) era más débil, esto podría sugerirnos que la conexión funcional entre estos podría estar relacionada con una interacción novedosa con un individuo desconocido. Por otra parte, si bien solo se realizó el análisis de conectividad en ganadores y perdedores para el grupo tratado con MK-801, al compararlas cualitativamente, podría sugerirse que en los individuos perdedores la conectividad entre Vv y las otras áreas cerebrales analizadas sería más débil, mientras que en el caso de los ganadores esta área parecería estar fuertemente conectada con el resto. Esto estaría sugiriendo que independientemente del recuerdo del oponente, la conexión de Vv con los otros núcleos sería diferente para individuos que ganaron o perdieron un encuentro 48 horas antes. Queda pendiente sumar más áreas analizadas, así como también aumentar la cantidad de datos de cada resultado (ganador/perdedor), para poder realizar análisis estadísticos que nos permitan comparar las matrices de correlación entre los 3 tratamientos, como también entre resultados de la contienda.

## 9. Bibliografía

Adamo SA, Hoy RR (1995) Agonistic behaviour in male and female field crickets, *Gryllus bimaculatus*, and how behavioural context influences its expression. *Anim Behav* 49(6):1491–1501

Åhlander, M., Misane, I., Schött, P. A., & Ögren, S. O. (1999). A behavioral analysis of the spatial learning deficit induced by the NMDA receptor antagonist MK-801 (dizocilpine) in the rat. *Neuropsychopharmacology*, 21(3), 414-426.

Aigner, T. G (1995). Pharmacology of memory: cholinergic—glutamatergic interactions. *Curr. Opin. Neurobiol*, 5(2), 155-160.

Akinrinade, I., Kareklas, K., Teles, M. C., Reis, T. K., Gliksberg, M., Petri, G., ... & Oliveira, R. F. (2023). Evolutionarily conserved role of oxytocin in social fear contagion in zebrafish. *Science*, 379(6638), 1232-1237.

Asok, A., Leroy, F., Rayman, J. B., & Kandel, E. R. (2019). Molecular mechanisms of the memory trace. *Trends in neurosciences*, 42(1), 14-22.

Avdesh A, Chen M, Martin-Iverson MT, Mondal A, Ong D, Rainey-Smith S et al (2012) Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an introduction. *JoVE* 69:e4196

Baker, M. R., & Wong, R. Y. (2019). Contextual fear learning and memory differ between stress coping styles in zebrafish. *Scientific reports*, 9(1), 9935.

Barnes, C. A. (1979). Memory deficits associated with senescence: A neurophysiological and behavioral study in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 93, 74–104.

Barnes, C. A., & McNaughton, B. L. (1985). An age comparison of the rates and acquisition and forgetting of spatial information in relation to long-term enhancement of hippocampal synapses. *Behavioral Neuroscience*, 99, 1040–1048.

Bartel, D. P., Sheng, M., Lau, L. F., & Greenberg, M. E. (1989). Growth factors and membrane depolarization activate distinct programs of early response gene expression: dissociation of fos and jun induction. *Genes & development*, 3(3), 304-313.

Bednarek, E., & Caroni, P. (2011).  $\beta$ -Adducin is required for stable assembly of new synapses and improved memory upon environmental enrichment. *Neuron*, 69(6), 1132-1146.

Been, L. E., Gibbons, A. B., & Meisel, R. L. (2019). Towards a neurobiology of female aggression. *Neuropharmacology*, 156, 107451.

Blank, M., Guerim, L. D., Cordeiro, R. F., & Vianna, M. R. A (2009). One-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. *Neurobiol. Learn. Mem*, 92(4), 529-534.

- Boeckle, M., & Bugnyar T (2012) . Long-term memory for affiliates in ravens. *Cur Biol*, 22(9), 801–806 CrossRefPubMedGoogle Scholar
- Bruce M, Doherty T, Kaplan J, Sutherland C, Atema J (2018) American lobsters, *Homarus americanus*, use vision for initial opponent evaluation and subsequent memory. *Bull Mar Sci* 94(3):517–532
- Bruck, J. N. Decades-long social memory in bottlenose dolphins (2013). *Proc. Royal Soc. B*, 280(1768), 20131726
- Burman, O. H. P., & Mendl, M. (2006). Long-term social memory in the laboratory rat (*Rattus norvegicus*). *Animal Welfare*, 15(4), 379-382.
- Carew, T. (2000). Behavioral neurobiology: the cellular organization of natural behavior.
- Cardoso, S. D., Teles, M. C., & Oliveira, R. F. (2015). Neurogenomic mechanisms of social plasticity. *Journal of Experimental Biology*, 218(1), 140-149.
- Caroni, P., Donato, F., & Muller, D. (2012). Structural plasticity upon learning: regulation and functions. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(7), 478-490.
- Castro, N., Ros, A. F., Becker, K., & Oliveira, R. F. (2006). Metabolic costs of aggressive behaviour in the Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *Aggressive Behavior: Official Journal of the International Society for Research on Aggression*, 32(5), 474-480.
- Castro, C. A., Silbert, L. H., McNaughton, B. L., & Barnes, C. A. (1989). Recovery of spatial learning deficits after decay of electrically induced synaptic enhancement in the hippocampus. *Nature*, 342, 545–548.
- Cavallino, L., Valchi, P., Morandini, L., & Pandolfi, M. (2019). Modulation of behavior in zebrafish, *Danio rerio*, according to female reproductive status and visual and chemical cues. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 52(1), 53-66.
- Chatterjee, D., Tran, S., Shams, S., & Gerlai, R. (2015). A simple method for immunohistochemical staining of zebrafish brain sections for c-fos protein expression. *Zebrafish*, 12(6), 414-420.
- Chaudhuri, A., Zangenehpour, S., Rahbar-Dehgan, F., & Ye, F. (2000). Molecular maps of neural activity and quiescence. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 60(3), 403-410.
- Chen, S., Chiu, C. N., McArthur, K. L., Fetcho, J. R., & Prober, D. A. (2016). TRP channel mediated neuronal activation and ablation in freely behaving zebrafish. *Nature methods*, 13(2), 147-150.
- Chou MY, Amo R, Kinoshita M, Cherng BW, Shimazaki H, Agetsuma M et al (2016) Social conflict resolution regulated by two dorsal habenular subregions in zebrafish. *Science* 352(6281):87–9
- Cingolani, L. A., & Goda, Y. (2008). Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(5), 344-356.
- Clutton-Brock, T. H., & Albon, S. D. (1979). The roaring of red deer and the evolution of honest advertisement. *Behaviour*, 69(3-4), 145-170.

- Cowan, N (2008). What are the differences between long-term, short-term, and working memory?. *Prog brain res*, 169, 323-338
- Dale, N., & Roberts, A. (1985). Dual-component amino-acid-mediated synaptic potentials: excitatory drive for swimming in *Xenopus* embryos. *The Journal of physiology*, 363(1), 35-59.
- Dringenberg, H. C. (2020). The history of long-term potentiation as a memory mechanism: Controversies, confirmation, and some lessons to remember. *Hippocampus*, 30(9), 987-1012.
- Dudai Y (2002). *Memory from A to Z, keywords, concepts and beyond*. Oxford UP, Oxford, UK.
- Dugatkin, L. A., & Reeve, H. K. (Eds.). (2000). *Game theory and animal behavior*. Oxford University Press on Demand.
- Enquist, M., & Leimar, O. (1990). The evolution of fatal fighting. *Animal Behaviour*, 39(1), 1-9.
- Enquist, M., Leimar, O., Ljungberg, T., Mallner, Y., & Segerdahl, N. (1990). A test of the sequential assessment game: fighting in the cichlid fish *Nannacara anomala*. *Animal Behaviour*, 40(1), 1-14.
- Fan, R., Reader, S. M., & Sakata, J. T. (2022). Alarm cues and alarmed conspecifics: neural activity during social learning from different cues in Trinidadian guppies. *Proceedings of the Royal Society B*, 289(1981), 20220829.
- Fernando, A. B., Murray, J. E., & Milton, A. L. (2013). The amygdala: securing pleasure and avoiding pain. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 7, 190.
- Freeman, F. M., & Rose, S. P. (1995). MK-801 blockade of Fos and Jun expression following passive avoidance training in the chick. *European Journal of Neuroscience*, 7(4), 563-569.
- Geinisman, Y., Berry, R. W., Disterhoft, J. F., Power, J. M., & Van der Zee, E. A. (2001). Associative learning elicits the formation of multiple-synapse boutons. *Journal of Neuroscience*, 21(15), 5568-5573.
- Georgiev, A. V., Klimczuk, A. C., Traficante, D. M., & Maestripieri, D. (2013). When violence pays: a cost-benefit analysis of aggressive behavior in animals and humans. *Evolutionary psychology*, 11(3), 147470491301100313.
- Gerlai, R. (2016). Learning and memory in zebrafish (*Danio rerio*). In *Methods in Cell Biology* (Vol. 134, pp. 551-586). Academic Press.
- Gerlach, G., Hodgins-Davis, A., Avolio, C., & Schunter, C. (2008). Kin recognition in zebrafish: a 24-hour window for olfactory imprinting. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1647), 2165-2170.
- Goelet, P., Castellucci, V. F., Schacher, S., & Kandel, E. R. (1986). The long and the short of long-term memory—a molecular framework. *Nature*, 322(6078), 419-422.
- Granato, M., & Nüsslein-Volhard, C. (1996). Fishing for genes controlling development. *Current opinion in genetics & development*, 6(4), 461-468.

- Guilford, T., & Dawkins, M. S. (1991). Receiver psychology and the evolution of animal signals. *Animal behaviour*, 42(1), 1-14.
- Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., ... & Kelsh, R. N. (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*, 123(1), 1-36.
- Haubrich, J., & Nader, K. (2018). Memory reconsolidation. *Behavioral neuroscience of learning and memory*, 151-176.
- Hebb, D. O. (2005). *The organization of behavior: A neuropsychological theory*. Psychology press.
- Hinz, C., Kobbenbring, S., Kress, S., Sigman, L., Müller, A., & Gerlach, G. (2013) a. Kin recognition in zebrafish, *Danio rerio*, is based on imprinting on olfactory and visual stimuli. *Animal Behaviour*, 85(5), 925-930.
- Hinz, F. I., Aizenberg, M., Tushev, G., & Schuman, E. M. (2013) b. Protein synthesis-dependent associative long-term memory in larval zebrafish. *Journal of Neuroscience*, 33(39), 15382-15387.
- Holder, J. L., Barlow, G. W., & Francis, R. C. (1991). Differences in aggressiveness in the Midas cichlid fish (*Cichlasoma citrinellum*) in relation to sex, reproductive state and the individual. *Ethology*, 88(4), 297-306.
- Hsu, Y., & Wolf, L. L. (2001). The winner and loser effect: what fighting behaviours are influenced?. *Anim Behav*, 61(4), 777-786
- Hudson, A. E. (2018). Genetic reporters of neuronal activity: c-Fos and G-CaMP6. In *Methods in enzymology* (Vol. 603, pp. 197-220). Academic Press.
- Jarome, T. J., & Helmstetter, F. J. (2014). Protein degradation and protein synthesis in long-term memory formation. *Front. Mol. Neurosci*, 7, 61
- Jayaram, K. C. (2010). *Freshwater fishes of the Indian region*. Narendra Pub. House
- Johnsson JI (1997) Individual recognition affects aggression and dominance relations in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Ethology* 103(4):267-282
- Karino K, Someya C (2007) The influence of sex, line, and fight experience on aggressiveness of the Siamese fighting fish in intrasexual competition. *Behav Process* 75(3):283-289
- Kimball, M. G., Gautreaux, E. B., Couvillion, K. E., Kelly, T. R., Stansberry, K. R., & Lattin, C. R. (2022). Novel objects alter immediate early gene expression globally for ZENK and regionally for C-Fos in neophobic and non-neophobic house sparrows. *Behavioural brain research*, 428, 113863.
- Knapska, E., Radwanska, K., Werka, T., & Kaczmarek, L. (2007). Functional internal complexity of amygdala: focus on gene activity mapping after behavioral training and drugs of abuse. *Physiological reviews*, 87(4), 1113-1173.

- Knight, Z. A., Tan, K., Birsoy, K., Schmidt, S., Garrison, J. L., Wysocki, R. W., ... & Friedman, J. M. (2012). Molecular profiling of activated neurons by phosphorylated ribosome capture. *Cell*, *151*(5), 1126-1137.
- Kogan, J. H., Frankland, P. W., & Silva, A. J. (2000). Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. *Hippocampus*, *10*(1), 47-56.
- Kovács, K. J. (1998). Invited review c-Fos as a transcription factor: a stressful (re) view from a functional map. *Neurochemistry international*, *33*(4), 287-297.
- Lal, P., Tanabe, H., Suster, M. L., Ailani, D., Kotani, Y., Muto, A., ... & Kawakami, K. (2018). Identification of a neuronal population in the telencephalon essential for fear conditioning in zebrafish. *BMC biology*, *16*, 1-18.
- Lamprecht, R., & LeDoux, J. (2004). Structural plasticity and memory. *Nature Reviews Neuroscience*, *5*(1), 45-54.
- Lau, B. Y., Mathur, P., Gould, G. G., & Guo, S. (2011). Identification of a brain center whose activity discriminates a choice behavior in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(6), 2581-2586.
- Lehner SR, Rutte C, Taborsky M (2011) Rats benefit from winner and loser effects. *Ethology* *117*(11):949–960
- Lynch, G., Larson, J., Kelso, S., Barrionuevo, G., & Schottler, F. (1983). Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature*, *305*(5936), 719-721.
- Lisman, J., Yasuda, R., & Raghavachari, S. (2012). Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nature reviews neuroscience*, *13*(3), 169-182.
- López P, Martín J (2001) Fighting rules and rival recognition reduce costs of aggression in male lizards, *Podarcis hispanica*. *Behav Eco Sociobiol* *49*(2–3):111–116
- Lutzu, S., & Castillo, P. E. (2021). Modulation of NMDA receptors by G-protein-coupled receptors: role in synaptic transmission, plasticity and beyond. *Neuroscience*, *456*, 27–42
- Lømo, T. (2003). The discovery of long-term potentiation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *358*(1432), 617-620.
- Madeira N, Oliveira RF (2017) Long-term social recognition memory in zebrafish. *Zebrafish* *14*(4):305–310
- Maldonado, Hector (2008). *La memoria animal: adquisicion, persistencia y olvido- 1ª ed-* Buenos Aires: Eudeba, Ciencia Joven 32.
- Martín, I., Gómez, A., Salas, C., Puerto, A., & Rodríguez, F. (2011). Dorsomedial pallidum lesions impair taste aversion learning in goldfish. *Neurobiology of Learning and Memory*, *96*(2), 297-305.
- Martinez M, Salvador A, Simón VM (1994) Behavioral changes over several successful agonistic encounters between male mice: effects of type of “standard opponent”. *Aggress Behav* *20*(6):441–451

- May, Z., Morrill, A., Holcombe, A., Johnston, T., Gallup, J., Fouad, K., ... & Hamilton, T. J. (2016). Object recognition memory in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 296, 199-210.
- McElligott, A. G., Mattiangeli, V., Mattiello, S., Verga, M., Reynolds, C. A., & Hayden, T. J. (1998). Fighting tactics of fallow bucks (*Dama, Cervidae*): reducing the risks of serious conflict. *Ethology*, 104(9), 789-803.
- McGaugh, J. L., & Izquierdo, I (2000). The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends Pharmacol. Sci* 21(6), 208-210
- McNamara, J. M., Green, R. F., & Olsson, O. (2006). Bayes' theorem and its applications in animal behaviour. *Oikos*, 112(2), 243-251.
- Medina, C., de la Fuente, V., tom Dieck, S., Nassim-Assir, B., Dalmay, T., Bartnik, I., ... & Romano, A. (2020). LIMK, Cofilin 1 and actin dynamics involvement in fear memory processing. *Neurobiology of Learning and Memory*, 173, 107275.
- Miklósi, Á., Haller, J., & Csányi, V (1992). Different duration of memory for conspecific and heterospecific fish in the paradise fish (*Macropodus opercularis* L.). *Ethol*, 90(1), 29-36.
- Milner, B., Squire, L. R., & Kandel, E. R. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*, 20(3), 445-468.
- Minatohara, K., Akiyoshi, M., & Okuno, H. (2016). Role of immediate-early genes in synaptic plasticity and neuronal ensembles underlying the memory trace. *Frontiers in molecular neuroscience*, 8, 78.
- Mizuno, A., Mizobuchi, T., Ishibashi, Y., & Matsuda, M. (1989). c-fos mRNA induction under vitamin B6 antagonist-induced seizure. *Neuroscience letters*, 98(3), 272-275.
- Morgan, J. I., & Curran, T. (1986). Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature*, 322(6079), 552-555.
- Morris, R. G., Anderson, E., Lynch, G. S., & Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*, 319, 774-776.
- Mourier, J., Brown, C., & Planes, S (2017). Learning and robustness to catch-and-release fishing in a shark social network. *Biol. Lett.*, 13(3), 20160824
- Mutlu, O., Ulak, G., Celikyurt, I. K., Akar, F. Y., Erden, F., & Tanyeri, P. (2011). Effects of olanzapine, sertindole and clozapine on MK-801 induced visual memory deficits in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 99(4), 557-565.
- Nabavi, S., Fox, R., Proulx, C. D., Lin, J. Y., Tsien, R. Y., & Malinow, R. (2014). Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature*, 511, 348-352.
- Nadel, L., Hupbach, A., Gomez, R., & Newman-Smith, K. (2012). Memory formation, consolidation and transformation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 36(7), 1640-1645.
- Newcomer, J. W., Farber, N. B., & Olney, J. W. (2022). NMDA receptor function, memory, and brain aging. *Dialogues in clinical neuroscience*.



- Nicoll, R. A. (2017). A brief history of long-term potentiation. *Neuron*, 93(2), 281-290.
- Nicoll, R. A., & Malenka, R. C (1999). Expression mechanisms underlying NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 868(1), 515-525
- Nicoll, R. A., Kauer, J. A., & Malenka, R. C. (1988). The current excitement in long term potentiation. *Neuron*, 1(2), 97-103.
- Nowak, L. P. P. A. A., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., & Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, 307(5950), 462-465.
- Nunes, A. R., Gliksberg, M., Varela, S. A., Teles, M., Wircer, E., Blechman, J., ... & Oliveira, R. F. (2021). Developmental effects of oxytocin neurons on social affiliation and processing of social information. *Journal of Neuroscience*, 41(42), 8742-8760.
- O'Connell, L. A., & Hofmann, H. A. (2011). The vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: a comparative synthesis. *Journal of Comparative Neurology*, 519(18), 3599-3639.
- Okuno, H. (2011). Regulation and function of immediate-early genes in the brain: beyond neuronal activity markers. *Neuroscience research*, 69(3), 175-186.
- Oliveira, R. F., & Almada, V. C. (1998). Maternal aggression during the mouthbrooding cycle in the cichlid fish, *Oreochromis mossambicus*. *Aggressive Behavior: Official Journal of the International Society for Research on Aggression*, 24(3), 187-196.
- Oliveira RF, Silva JF, Simoes JM (2011) Fighting zebrafish: characterization of aggressive behavior and winner–loser effects. *Zebrafish* 8(2):73–81
- Papa, M., Pellicano, M. P., Welzl, H., & Sadile, A. G. (1993). Distributed changes in c-Fos and c-Jun immunoreactivity in the rat brain associated with arousal and habituation to novelty. *Brain research bulletin*, 32(5), 509-515.
- Pauli GC, Filby AL, Giddins HG, Coe TS, Hamilton PB, Tyler CR. (2010). Dominance hierarchies in zebrafish (*Danio rerio*) and their relationship with reproductive success. *Zebrafish*. 7 (1):109–117.
- Perathoner, S., Cordero-Maldonado, M. L., & Crawford, A. D. (2016). Potential of zebrafish as a model for exploring the role of the amygdala in emotional memory and motivational behavior. *Journal of neuroscience research*, 94(6), 445-462.
- Perdikaris, P., & Dermon, C. R. (2022). Behavioral and neurochemical profile of MK-801 adult zebrafish model: Forebrain  $\beta$ 2-adrenoceptors contribute to social withdrawal and anxiety-like behavior.
- Pinho, J. S., Castilho, M., Sollari, J. S., & Oliveira, R. F. (2020). Innate chemical, but not visual, threat cues have been co-opted as unconditioned stimulus for social fear learning in zebrafish. *Genes, Brain and Behavior*, 19(8), e12688.
- Portavella, M., Vargas, J. P., Torres, B., & Salas, C. (2002). The effects of telencephalic pallial lesions on spatial, temporal, and emotional learning in goldfish. *Brain research bulletin*, 57(3-4), 397-399.

- Ramirez-Amaya, V., Vazdarjanova, A., Mikhael, D., Rosi, S., Worley, P. F., and Barnes, C. A. (2005). Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression: evidence for selective, network-specific reactivation. *J. Neurosci.* 25, 1761–1768.
- Reichert, M. S., & Quinn, J. L. (2017). Cognition in contests: mechanisms, ecology, and evolution. *Trends in ecology & evolution*, 32(10), 773-785.
- Rillich, J., & Stevenson, P. A. (2011). Winning fights induces hyperaggression via the action of the biogenic amine octopamine in crickets. *PLoS One*, 6(12), e28891.
- Rioult-Pedotti, M.-S., Friedman, D., & Donoghue, J. P. (1998). Strengthening of horizontal cortical connections following skill learning. *Nature Neuroscience*, 1, 230–234
- Roberts, T. F., Tschida, K. A., Klein, M. E., & Mooney, R. (2010). Rapid spine stabilization and synaptic enhancement at the onset of behavioural learning. *Nature*, 463(7283), 948-952.
- Rogan, M. T., Stäubli, U. V., & LeDoux, J. E. (1997). Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature*, 390, 604–607
- Rutte, C., Taborsky, M., & Brinkhof, M. W. (2006). What sets the odds of winning and losing?. *Trends in Ecology & Evolution*, 21(1), 16-21.
- Scaia, M. F., Morandini, L., Noguera, C. A., Ramallo, M. R., Somoza, G. M., & Pandolfi, M. (2018). Fighting cichlids: dynamic of intrasexual aggression in dyadic agonistic encounters. *Behavioural processes*, 147, 61-69.
- Scaia, M. F., Akinrinade, I., Petri, G., & Oliveira, R. F. (2022). Sex differences in aggression are paralleled by differential activation of the brain social decision-making network in zebrafish. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 16.
- Seibt, K. J., da Luz Oliveira, R., Zimmermann, F. F., Capiotti, K. M., Bogo, M. R., Ghisleni, G., & Bonan, C. D (2010). Antipsychotic drugs prevent the motor hyperactivity induced by psychotomimetic MK-801 in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav brain res*, 214(2), 417–422
- Sheng, M., & Greenberg, M. E. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, 4(4), 477-485.
- Shettleworth, S. J. (2001). Animal cognition and animal behaviour. *Animal behaviour*, 61(2), 277-286.
- Sison, M., & Gerlai, R (2011)a. Associative learning performance is impaired in zebrafish (*Danio rerio*) by the NMDA-R antagonist MK-801. *Neurobiol. Learn. Mem*, 96(2), 230-237.
- Sison, M., & Gerlai, R. (2011)b. Behavioral performance altering effects of MK-801 in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural brain research*, 220(2), 331-337.
- Smith, J. M. P. G. R., & Price, G. R. (1973). The logic of animal conflict. *Nature*, 246(5427), 15-18.
- Smith, J. M. (1986). Evolutionary game theory. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, 22(1-3), 43-49.

- Spence, R., & Smith, C. (2007). The role of early learning in determining shoaling preferences based on visual cues in the zebrafish, *Danio rerio*. *Ethology*, *113*(1), 62-67.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, *83*(1), 13-34.
- Swain, H. A., Sigstad, C., & Scalzo, F. M. (2004). Effects of dizocilpine (MK-801) on circling behavior, swimming activity, and place preference in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicol Teratol*, *26*(6), 725-729
- Teles, M. C., & Oliveira, R. F. (2016). Androgen response to social competition in a shoaling fish. *Hormones and behavior*, *78*, 8-12.
- Teles, M. C., Cardoso, S. D., & Oliveira, R. F. (2016). Social plasticity relies on different neuroplasticity mechanisms across the brain social decision-making network in zebrafish. *Frontiers in behavioral neuroscience*, *10*, 16.
- Teles, M. C., Almeida, O., Lopes, J. S., & Oliveira, R. F. (2015). Social interactions elicit rapid shifts in functional connectivity in the social decision-making network of zebrafish. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *282*(1816), 20151099.
- Thompson, R. F. (1986). The neurobiology of learning and memory. *Science*, *233*(4767), 941-947.
- Tischmeyer, W., & Grimm, R. (1999). Activation of immediate early genes and memory formation. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *55*, 564-574.
- Triki, Z., & Bshary, R. (2020). Long-term memory retention in a wild fish species *Labroides dimidiatus* eleven months after an aversive event. *Ethol*, *126*(3), 372-376
- Tronel, S., & Sara, S. J. (2002). Mapping of olfactory memory circuits: region-specific c-fos activation after odor-reward associative learning or after its retrieval. *Learning & Memory*, *9*(3), 105-111.
- Van Harreveld, A., & Fifkova, E. (1975). Swelling of dendritic spines in the fascia dentata after stimulation of the perforant fibers as a mechanism of post-tetanic potentiation. *Experimental neurology*, *49*(3), 736-749.
- von Trotha, J. W., Vernier, P., & Bally-Cuif, L. (2014). Emotions and motivated behavior converge on an amygdala-like structure in the zebrafish. *European Journal of Neuroscience*, *40*(9), 3302-3315.
- Watkins, J. C., & Jane, D. E. (2006). The glutamate story. *British journal of pharmacology*, *147*(S1), S100-S108.
- Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G., & Bear, M. F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*, *313*, 1093-1097.
- Wilson, Y., Nag, N., Davern, P., Oldfield, B. J., McKinley, M. J., Greferath, U., & Murphy, M. (2002). Visualization of functionally activated circuitry in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(5), 3252-3257.

- Wulliman, M. F., Rupp, B., & Reichert, H. (2012). *Neuroanatomy of the zebrafish brain: a topological atlas*. Birkhäuser.
- Xu, X., Scott-Scheiern, T., Kempker, L., & Simons, K. (2007). Active avoidance conditioning in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurobiology of learning and memory*, 87(1), 72-77.
- Yashina, K., Tejero-Cantero, Á., Herz, A., & Baier, H. (2019). Zebrafish exploit visual cues and geometric relationships to form a spatial memory. *IScience*, 19, 119-134.
- Yurkovic, A., Wang, O., Basu, A. C., & Kravitz, E. A (2006). Learning and memory associated with aggression in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 103(46), 17519–17524
- Zahavi, A. (1982). The pattern of vocal signals and the information they convey. *Behaviour*, 80(1-2), 1-8.
- Zimmermann, F. F., Gaspary, K. V., Siebel, A. M., & Bonan, C. D (2016). Oxytocin reversed MK-801-induced social interaction and aggression deficits in zebrafish. *Behav. Brain Res*, 311, 368–374