



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA

Laboratorio de Ecología de la Conducta

“La función comunicativa del bostezo en *Betta splendens*”

TESIS

Que para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

Presenta:

Alejandra Patricia Díaz Loyo

Director de Tesis:

Dr. Alejandro Moyaho Martínez

Puebla, Pue. Julio 2016

RESUMEN

La función biológica del bostezo, un comportamiento común en los vertebrados, aún se desconoce. Se sabe que en varias especies el bostezo se contagia y que también ocurre en situaciones sociales, por lo que existe la posibilidad de que los animales lo usen como una señal. En esencia son tres los mensajes que el bostezo podría comunicar: 1. capacidad fisiológica, 2. disminución de la tensión social, 3. amenaza.

En el estudio que presento puse a prueba predicciones derivadas de estas hipótesis utilizando al pez siamés *Betta splendens* cuyo bostezo ya ha sido descrito en contextos de enfrentamiento entre machos. Para poner a prueba las predicciones, registré el comportamiento agresivo de 60 peces expuestos a videoestímulos que proyectaban a un macho en 5 condiciones: 1. sólo movimiento del pez, 2. aperturas de la boca, 3. intentos de mordida, 4. bostezos, 5. bostezos e intentos de mordidas. También medí los niveles de 11-cetotestosterona y cortisol (el andrógeno y glucocorticoide principales respectivamente en peces) de una submuestra de 35 peces con el fin de reforzar las predicciones del estudio. Se conoce, por una parte, que los andrógenos participan en el desarrollo físico y muscular de los machos de muchas especies, lo que les da mejor resistencia física, una medida de la capacidad fisiológica. Los niveles de cortisol, por otra parte, pueden indicar el grado de tensión por el que pasan los individuos durante situaciones sociales. Además, ambos esteroides han sido asociados al bostezo en estudios previos.

Analicé los datos del comportamiento y de las mediciones de esteroides aplicando modelos lineales generales y generalizados. Los resultados de los análisis estadísticos no favorecieron a una hipótesis en particular, aunque en general parecen ofrecer más evidencia a favor de la hipótesis de la capacidad fisiológica. La frecuencia de bostezo se asoció positivamente con la capacidad fisiológica de los peces y su frecuencia de desplantes aumentó cuando vieron el videoestímulo de bostezo; Posiblemente disminuyeron sus desplantes para evitar entrar en conflicto con un pez que manifestaba mediante el bostezo su capacidad fisiológica. También como consecuencia, pudieron aumentar su concentración de 11-KT anticipando un conflicto.

Este es el primer estudio experimental que analiza si el bostezo cumple una función comunicativa. También es la primera vez que se mide la concentración de esteroides en peces durante el bostezo espontáneo. Estudios futuros podrían confirmar los resultados encontrados en el estudio y que presento aquí.

1. Introducción	1
1.1. Bostezo	1
1.1.1. Hipótesis fisiológicas	2
1.1.2. Mecanismos fisiológicos del bostezo	3
1.1.3. Hipótesis comunicativas	6
1.1.4. Contagio del bostezo	9
1.2. Señales y pistas	10
1.3. <i>Betta splendens</i>	11
1.3.1. Esteroides en los peces	12
2. Pregunta	14
2.1. Hipótesis y predicciones	14
2.2. Objetivo general	16
2.3. Objetivos particulares	16
3. Material y métodos	17
3.1. Peces de estudio	19
3.2. Diseño experimental	20
3.3. Descripción de las pautas de comportamiento	24
3.4. Obtención de los videos de comportamiento para preparar los videoestímulos	28
3.4.1. Arreglo experimental para obtener los videos de comportamiento	29
3.4.2. Grabación de los videos de comportamiento	30
3.4.3. Edición de los videoestímulos	31

3.5. Medición de la capacidad fisiológica	32
3.5.1. Procedimiento experimental	33
3.5.2. Observación de las pautas de comportamiento que constituyeron la capacidad fisiológica	35
3.6. Ensayos pre-experimental y experimental	36
3.6.1. Procedimiento	37
3.6.2. Extracción de los esteroides	41
3.6.3. Mediciones de los ensayos pre-experimental y experimental	43
3.7. Análisis instrumental de los esteroides	44
3.7.1. Recuperación de la muestra	45
3.7.2. Ensayo inmunoenzimático (EIA)	46
3.8. Análisis estadístico	47
4. Resultados	49
4.1. Características de los peces y el agua	49
4.2. Duración de los bostezos	49
4.3. Resultados del efecto de los niveles pre-experimentales de esteroides en los niveles experimentales	50
4.3.1. Análisis del efecto de las variables de predicción en los niveles de la 11-cetotestosterona experimental	51
4.3.2. Análisis del efecto de las variables de predicción en los niveles de cortisol experimental	55
4.4. Resultados del efecto de los tratamientos en el comportamiento de los peces	62

4.4.1.	Análisis del efecto de las variables de predicción en la frecuencia de entradas al área en sombra	63
4.4.2.	Análisis del efecto de las variables de predicción en la frecuencia de bostezos	66
4.4.3.	Análisis del efecto de las variables de predicción en la frecuencia de desplantes	67
4.5.	Resultados del efecto conjunto de esteroides y comportamiento	73
4.5.1.	Análisis estadístico de la relación entre capacidad fisiológica y 11-KT	74
4.5.2.	Análisis estadístico de la relación entre bostezo y la capacidad fisiológica	76
4.5.3.	Análisis del efecto de las variables de predicción en la frecuencia de entradas al área en sombra en función de la concentración de esteroides	77
4.5.4.	Análisis del efecto de las variables de predicción en la frecuencia de bostezos en función de la concentración de esteroides	82
4.5.5.	Análisis del efecto de las variables de predicción en la frecuencia de desplantes en función de la concentración de esteroides	82
4.6.	Resumen de los resultados	89
5.	Discusión	90
6.	Referencias	99
	Anexo	107

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Bostezo

La literatura disponible indica que prácticamente todos los vertebrados bostezan y al menos uno de ellos, el humano, lo hace desde la etapa intrauterina de sus individuos (Walusinski, 2010). El bostezo es un acto motor que consiste en una inspiración profunda, seguida por una larga expiración y algunas veces fuerte contracción simultánea de muchos músculos esqueléticos (Darwin, 1873). Varios vertebrados, como los humanos, chimpancés, roedores y posiblemente aves y caninos, pueden contagiar bostezo—un incremento en la probabilidad de que un individuo bostece cuando percibe a otro individuo bostezando (Provine, 1986; Platek, 2003; Joly-Mascheroni, 2008; Senju, 2010; Moyaho y col., 2014). A pesar de contar con esta información y con una descripción cada vez más detallada de los mecanismos inmediatos del bostezo—los estímulos internos y externos que lo producen—aún se ignora por qué los animales bostezan.

Las hipótesis que proponen una explicación de la función del bostezo pueden dividirse en dos grandes grupos: hipótesis fisiológicas y comunicativas. El objetivo de la tesis que aquí presento es saber si el bostezo en el pez siamés (*Betta splendens*) tiene una función comunicativa. En lo que sigue revisaré brevemente lo que conocemos del bostezo, la evidencia que existe a favor de la hipótesis comunicativa del bostezo, y describiré la manera en que puse a prueba las hipótesis del proyecto.

1.1.1. Hipótesis fisiológicas

Las hipótesis fisiológicas proponen que el bostezo sirve para producir o restaurar alguna condición fisiológica. Se han planteado varias hipótesis al respecto, aunque hasta el momento no se ha podido aprobar satisfactoriamente ninguna de ellas (Tabla 1.1). Entre éstas destaca la que sugiere que el bostezo sirve para oxigenar el cerebro o renovar el aire de los pulmones. Sin embargo, en estudios donde se usaron condiciones de mucho oxígeno o CO₂, no se encontró evidencia para apoyarla (Provine y col., 1987). También se ha propuesto que el bostezo sirve para regular la presión del oído interno (Laskiewicz, 1953), y aunque es cierto que los movimientos de los músculos faciales abren brevemente las trompas de Eustaquio, es poco probable que el bostezo tuviera esta función. En años recientes se ha investigado la hipótesis que prevé que el bostezo sirve para enfriar el cerebro (Gallup, 2013), pero la evidencia a favor es controversial (de Castro, 2009). Otra propuesta dice que el bostezo sirve para facilitar la transición del organismo de un estado a otro (e. g. sueño a vigilia, estrés a relajación, etc.). Así mismo, el bostezo ha sido asociado con momentos de aburrimiento, tedio o cansancio (Provine, 2005). Se sabe también que la frecuencia del bostezo se incrementa en anticipación a eventos importantes (Baenninger, 1987) o tras la exposición a estímulos novedosos o estresantes (Moyaho y col., 2002). En suma, estas hipótesis sostienen que el bostezo es una especie de actividad homeostática pero no describen el mecanismo por el cual ocurre. Este tipo de estudios, aunque interesantes, sólo ofrecen evidencia de tipo correlativa y son insuficientes para explicar la variedad de circunstancias en que ocurre el bostezo.

Tabla 1.1 Hipótesis fisiológicas del bostezo

Hipótesis	Promotor del bostezo		Consecuencia del bostezo		Evidencia global
	Esperado	Evidencia	Esperada	Evidencia	
Respiratoria Circulatoria	Hipoxia, Hipercapnia	Negativa	Incremento del oxígeno en sangre o en el cerebro	Faltante	Negativa
Despabilarse	Cansancio	Buena	Aumento de la actividad cerebral	Negativa	Negativa
Sueño y letargo	Cansancio	Buena	Cansancio	No concluyente	No concluyente
Termorregulación	Hipertermia del cerebro	No concluyente	Enfriamiento del cerebro	Faltante	No concluyente
Presión del oído medio	Cambio rápido en la presión del oído medio	Faltante	Igualar la presión del oído medio	Buena	No concluyente
Cambio de estado	-		Facilitar cambios de estado	Faltante	Faltante
Anticipación a eventos	Anticipación y espera	Buena	Mayor alerta	Faltante	No concluyente

Resumen de algunas de las hipótesis fisiológicas del bostezo, sus predicciones y evidencia encontrada. Información traducida y modificada de Guggisberg y col. 2010.

1.1.2. Mecanismos fisiológicos del bostezo

Neurotransmisores, neuropéptidos y neurohormonas participan en la regulación fisiológica del bostezo (Argiolas y col., 1998). Un promotor importante del bostezo es la acetilcolina (ACh), se ha descrito que la inyección al cerebro de fisostigmina (un inhibidor de la acetilcolinesterasa) o de pilocarpina (un agonista de los receptores de ACh) aumentan la frecuencia de bostezo en función de la dosis aplicada (Urbá-Holmgren y col., 1977; Ushijima y col., 1985). También se ha descrito que la adrenocortropina (ACTH) y la hormona estimulante de los α -melanocitos (α -MSH) aumentan la frecuencia de bostezo cuando se inyectan en el hipotálamo, particularmente en el núcleo paraventricular (PVN) (Argiolas y col., 2000), aunque la lesión del PVN no inhibe totalmente el bostezo inducido

por estas hormonas así que es probable que otras vías o núcleos estén involucrados (Argiolas y col., 1987). En cambio, la aplicación de atropina—un bloqueador colinérgico con efecto central—sí inhibe el bostezo evocado por ACTH y α -MSH (Ferrari y col., 1963), lo que sugiere que el bostezo inducido por ACTH y α -MSH implica la activación de neuronas colinérgicas (Figura 1.1).

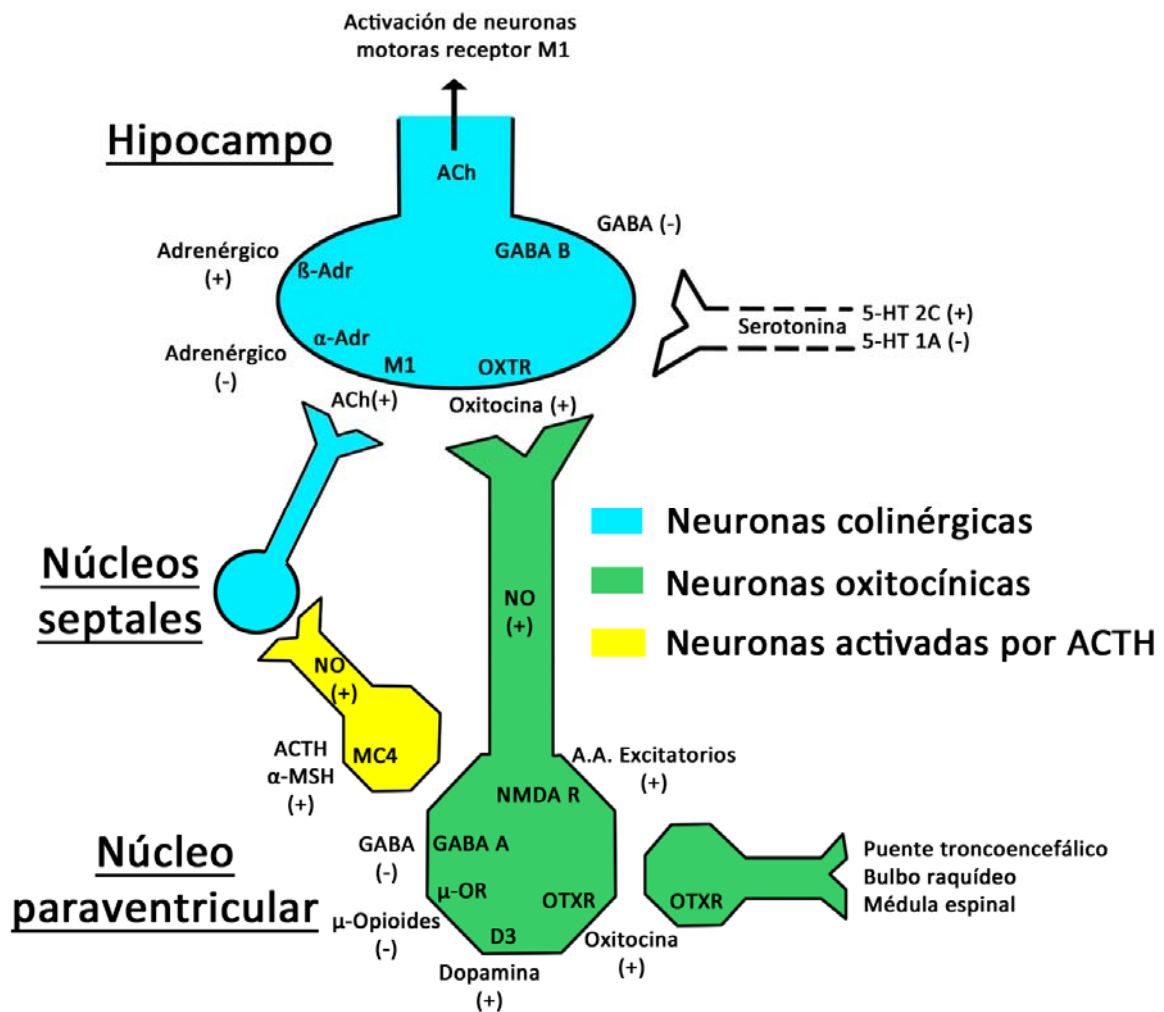


Figura 1.1 Representación esquemática de los neurotransmisores y receptores involucrados en la mediación del bostezo. Editado y traducido de Collins y Eguibar (2010).

La oxitocina también genera bostezos cuando se inyecta en el PVN o la región CA1 del hipocampo, no así cuando se inyecta en otros núcleos del hipotálamo (Melis y col., 1986). La inyección en el PVN de un antagonista a la oxitocina inhibe los bostezos generados por esta hormona, pero la lesión electrolítica del septum medial no inhibe el bostezo; este resultado sugiere que otra vía (independiente de la vía hipotálamo-CA1) puede estar involucrada en la generación del bostezo inducido por oxitocina (Melis y col., 1992).

En resumen, se han descrito al menos tres vías de mediación del bostezo, aunque casi todas parecen converger en las neuronas colinérgicas del hipocampo: **1.** Dos grupos separados de neuronas oxitocinérgicas que proyectan desde el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo, a la región CA1 del hipocampo, o al puente troncoencefálico, el bulbo raquídeo y la médula espinal; **2.** Neuronas activadas por la hormona adrenocorticotropina (ACTH) o la hormona estimulante de los α -melanocitos (α -MSH) que proyectan desde el PVN al hipocampo mediante la activación de neuronas colinérgicas septo-hipocampales; **3.** La activación directa de neuronas colinérgicas hipocampales o septo-hipocampales o del hipocampo; **4.** Una vía serotoninérgica-colinérgica cuya proyección aún se desconoce (Figura 1.1). La interacción entre las estructuras del cerebro y los neurotransmisores que inducen o inhiben el bostezo es compleja, y aun cuando se han obtenido avances importantes en los años recientes (Collins y Eguibar, 2010) todavía no se cuenta con una descripción definitiva de los mecanismos fisiológicos del bostezo.

1.1.3. Hipótesis comunicativas

Las hipótesis que plantean que el bostezo sirve para comunicar un mensaje entre conoespecíficos—individuos que pertenecen a la misma especie—se basan en el hecho de que éste ocurre frecuentemente en situaciones sociales (Guggisberg y col., 2010). Las hipótesis comunicativas del bostezo pueden ser resumirse en tres hipótesis generales (Tabla 1.2). Darwin ya había anticipado que el bostezo podía tener una función comunicativa; él describió que los babuinos desconocidos entre sí, al ser introducidos a un mismo encierro, se sentaban en extremos opuestos y bostezaban mutuamente (Darwin, 1873). Darwin concluyó que estos animales trataban de comunicar algo, probablemente el tamaño de sus colmillos. Leone y col. (2014) realizaron un estudio en geladas (*Theropithecus gelada*), una especie social de primates, e identificaron tres tipos de bostezo en función de su intensidad: 1. con los dientes cubiertos, 2. con los dientes descubiertos y 3. con las encías descubiertas; los dos primeros eran más frecuentes en hembras y durante momentos de relajación e interacción social, mientras que el último era más frecuente en machos dominantes durante el establecimiento y mantenimiento de jerarquías. Hadidian (1980) observó en los macacos negros crestados (*Macaca nigra*) que el macho dominante bostezaba antes y con mayor frecuencia que los machos subordinados. Estas investigaciones han sugerido que el bostezo podría servir para amenazar o amedrentar a otros individuos, generalmente de menor rango en una jerarquía de dominancia (Hadidian, 1980). Si es así, esto sugiere que el bostezo podría indicar alguna cualidad de los machos dominantes. En contraste con lo anterior, se ha propuesto que el bostezo podría interpretarse como una invitación a sincronizar las actividades inmediatas

de los individuos participantes (i.e., presentes), ya sea produciendo un estado de relajación o induciendo la sincronización de los ciclos circadianos de los miembros del grupo (Sauer y Sauer, 1967).

Tabla 1.2 Hipótesis comunicativas del bostezo

Hipótesis	Promotor del bostezo		Consecuencia del bostezo		Evidencia global
	Esperado	Evidencia	Esperada	Evidencia	
Agresión	Conflicto	Buena	Escalamiento de un conflicto	Faltante	No concluyente
Apaciguamiento	Tensión social	Buena	Disminución de la actividad	Faltante	No concluyente
Capacidad fisiológica	Conflicto	Buena	Evitar conflicto	Faltante	No concluyente

Resumen de las hipótesis comunicativas del bostezo, sus predicciones y evidencia encontrada.

En algunas especies como el pez siamés el bostezo es parte de los desplantes que estos animales hacen en situaciones de defensa de territorio o establecimiento de jerarquías de dominancia (Baenninger, 1987). Se podría esperar que el bostezo en esta especie contuviera información que desalentase a los adversarios a escalar una pelea. Muchas especies usan estructuras sobresalientes conspicuas (ornamentas, dentadura, plumaje, colores brillantes, etc.) o pautas de comportamiento (bramidos, despliegues elaborados, danzas, etc.) para indicar a otros individuos cualidades superiores en la adquisición de recursos de acceso limitado; el bostezo también podría tener esta función.

Moyaho y col. (2014) estudiaron el bostezo de una sublínea de Sprague-Dawley seleccionada por su alta frecuencia de bostezo (denominada HY o “high yawning”) y

encontraron que el bostezo se contagia en ratas desconocidas entre sí a través de pistas auditivas y olfativas; como los autores no encontraron indicios de la presencia de empatía, propusieron que el contagio era resultado de una función comunicativa. Ellos sugirieron que el bostezo comunica la capacidad fisiológica del individuo—la resistencia y fuerza mostradas durante peleas por recursos. La hipótesis se sustenta en el hecho de que el bostezo está asociado positivamente con los niveles de testosterona de los individuos (Holmgren y col, 1980; Graves y col, 2006). La testosterona también es el sustrato fisiológico de las erecciones del pene en mamíferos (Berendsen y col., 1986), y de la resistencia y fuerza mostradas por un individuo para defender un territorio, cortejar a una hembra o pelear con un adversario, por lo que la capacidad fisiológica está sustentada en la concentración de testosterona (Sinervo y col., 2000). Además, la testosterona es el andrógeno principal que participa en el comportamiento agresivo en los machos de muchas especies de vertebrados (Rose y col., 1971; Sinervo y col., 2000). La agresividad es propia de los machos dominantes quienes deben manifestarla para obtener y mantener recursos como el acceso a los alimentos y las hembras. Esta habilidad está vinculada a la capacidad fisiológica del individuo, pues un macho con mejor capacidad fisiológica posee una aptitud mejor para monopolizar recursos (Sinervo y col., 2000). En un conflicto—la disputa por un recurso limitado—los individuos dominantes se benefician intimidando a sus oponentes y haciéndolos retroceder, pues evitan una confrontación físicamente costosa. Para lograrlo, los individuos usan comportamientos llamados señales que indican su capacidad fisiológica. El bostezo podría ser una señal de este tipo, si este fuera el caso los individuos con mejor capacidad fisiológica bostezarían con mayor frecuencia.

1.1.4. Contagio del bostezo

Se conoce bien que el bostezo es contagioso entre humanos, ya sea por ver o escuchar a otra persona bostezar (Provine, 2005). Se ha dicho que el contagio requiere que los individuos posean lo que se conoce como empatía (Platek y col., 2003)—la capacidad de compartir afectiva y emotivamente la realidad de otros individuos—pues niños menores a cinco años, personas autistas o esquizofrénicas, quienes no parecen tener empatía, no lo presentan (Provine, 2005; Rundle y col., 2015). Sin embargo, la evidencia no es concluyente ya que al menos un estudio indica que los autistas sí podrían presentar contagio de bostezo (Usui y col., 2013). Es posible que la capacidad de empatizar no ocurra sólo entre individuos de la misma especie ya que existen estudios cuyos resultados sugieren la existencia de un posible contagio entre, por ejemplo, perros y humanos (Joly-Mascheroni y col., 2008), aunque los resultados aún son controversiales (Harr y col., 2009). Incluso, podría ser que la capacidad de empatía no fuera el único medio por el cual se presenta contagio, o bien que niveles básicos de empatía fueran suficientes para promoverlo (O'Hara y col., 2011; Moyaho y col., 2014). Se ha encontrado evidencia de contagio del bostezo en chimpancés (Amici y col., 2014), humanos (Platek y col., 2003), lobos (Romero y col., 2014), pericos australianos (Gallup y col., 2015) y una sublínea de ratas seleccionadas para bostezar frecuentemente (Moyaho y col., 2014). En este último estudio con ratas se obtuvo evidencia de que un mecanismo distinto de la empatía podría estar involucrado en el contagio del bostezo; éste sólo ocurrió entre individuos desconocidos por lo que los autores también propusieron que podría ser la

expresión de una función comunicativa, y propusieron que el bostezo puede comunicar la capacidad fisiológica.

1.2. Señales y pistas

Una señal se define como un acto o estructura de un individuo (emisor) que altera el comportamiento de otro organismo que la percibe (receptor). Una señal contiene información sobre las acciones futuras del emisor (i.e. intención de agredir, disponibilidad para apareamiento, etc.), y es eficaz porque la respuesta del receptor evolucionó conjuntamente con la señal (Maynard Smith y Harper, 2003). Una pista, por otra parte, es cualquier característica del mundo que puede ser utilizada por un animal como una guía para una acción futura (Hasson, 1994). Señales y pistas han evolucionado en dos formas esenciales: 1. Las pistas se ejecutan permanentemente, mientras que las señales se ajustan dependiendo de la circunstancia; 2. Después de que un animal produce una pista, ésta no conlleva un costo extra mientras que la señal generalmente implica costos adicionales cada vez que es emitida (Hauser, 1996). Las señales codifican información que puede indicar amenaza, sumisión, disponibilidad para la reproducción o condición fisiológica; antes de emitirlas los animales deben anticipar los riesgos de sufrir alguna lesión y sopesar los costos energéticos con los beneficios que pueden obtener. Las señales suelen ser comportamientos frecuentes en las especies y forman parte de su repertorio de acciones ante conflictos entre conespecíficos. Son especialmente importantes para el

establecimiento de jerarquías de dominancia, la obtención de territorio y resolución de conflictos antes de que escalen a una agresión franca.

1.3. Betta splendens

El pez siamés (*B. splendens*) es una especie de pez tropical originario de Asia – principalmente Tailandia, Vietnam y Cambodia– perteneciente a la familia gourami. Estos son peces de agua dulce, perciformes, con un órgano especializado llamado laberinto que usan para obtener oxígeno de la superficie del agua. Los peces siameses poseen un dimorfismo sexual marcado; las aletas del macho son más largas y coloridas que las de las hembras, que pueden ser más pequeñas y menos brillantes que los machos. Las variedades de pez siamés en acuario se han conseguido por selección para mostrar diferencias de color, longitud y forma de las aletas. Con esta variedad de caracteres se han hecho estudios genéticos (Wallbrunn, 1958), pero pocos son los resultados que han descrito la relación entre genotipo y comportamiento. La cría selectiva hizo del pez siamés una especie agresiva, dentro y entre especies, independientemente del sexo. Así, estos peces muestran comportamiento agonístico—desplantes que pueden variar de la intimidación a la agresión franca—muy frecuente caracterizado por una serie de pautas estereotipadas conspicuas ampliamente descritas (Simpson, 1968). Los individuos pueden agredirse intensamente hasta que uno es herido y dejado fuera de combate. Este rasgo ha hecho del pez siamés un modelo de estudio del comportamiento agonístico (Allen y col., 1997). Los peces siameses sólo bostezan en presencia de machos conespecíficos

(Baenninger, 1987), lo que refuerza el carácter social del bostezo aunque éste ha sido poco estudiado en esta especie; Simpson (1968) solamente dedica un párrafo al bostezo en la descripción extensa de comportamiento que hace del pez siamés, mientras que Baenninger (1987) analiza la frecuencia del bostezo sin tratar su significación biológica o motivo. Llama la atención que Baenninger haya encontrado que la frecuencia de bostezo seguía una distribución muy similar a la frecuencia de las mordidas, uno de los comportamientos agresivos reportados para el pez siamés (Simpson, 1968). Durante los encuentros agresivos los peces siameses sufren cambios fisiológicos que los preparan para el conflicto, manifestándose en sus concentraciones de esteroides (Dzieweczynski y col., 2006).

1.3.1. Esteroides en los peces

Los esteroides que producen los peces pueden encontrarse en el agua donde habitan; llegan ahí por difusión pasiva a través de las agallas y por lo tanto, no se requiere de un mecanismo activo o una señal química para que aquellos sean liberados. Una cantidad de esteroides se difunde al agua cuando la sangre pasa a través de las agallas, por lo que la cantidad de esteroides presente en el agua es proporcional a su concentración en el plasma (Scott, 2007). Se han hecho estudios en otras especies y observado que la concentración de esteroides medida en el agua sigue una cinética similar a su concentración en plasma, con un desfase atribuible a la velocidad de difusión del esteroide a través de las agallas (Scott, 2007). La medición de esteroides presentes en el

agua es preferible cuando la medición directa en el plasma es difícil de hacer en peces pequeños, o cuando implica la muerte de especies protegidas o valiosas. Este procedimiento no invasivo también se usa cuando se requiere hacer medidas sucesivas o cuando el procedimiento invasivo para la obtención de la muestra puede alterar la concentración de la hormona que se desea medir (Scott, 2008).

La 11-cetotestosterona (**11-KT** por sus siglas en inglés) es el andrógeno principal en peces. Cumple las mismas funciones que la testosterona en otras especies, pues es responsable de la maduración sexual en los machos, engrosamiento de los músculos, densificación de los huesos, comportamiento agresivo, defensa de territorio, entre otros (Borg, 1994).

El cortisol es un glucocorticoide producido por la glándula adrenal como respuesta al estrés. En los peces cumple las mismas funciones que en otras especies, como son incrementar el nivel de glucosa y glóbulos rojos en sangre, disminuir la actividad de sistemas que no son inmediatamente vitales, entre otros. En general, actúa preparando al cuerpo para actuar ante una situación de riesgo (Ellis y col., 2012).

En otras especies se ha encontrado una correlación entre el bostezo y el aumento de la concentración de cortisol (Thompson y col., 2012) y entre la concentración de andrógenos y la frecuencia de bostezo (Holmgren y col, 1980; Graves y col, 2006) por lo que es oportuno considerarlos en el estudio del bostezo del pez siamés durante encuentros agonistas.

2. PREGUNTA

El bostezo es un comportamiento que atrae la atención por su presencia en posiblemente todos los vertebrados y por la variedad de situaciones en las que ocurre. Se cuenta con información amplia de los mecanismos fisiológicos que producen el bostezo pero aun se desconoce su función biológica, aunque parece haber un consenso en que pueden ser dos las funciones: fisiológica y comunicativa. En varias especies el bostezo aparece en situaciones de conflicto o agresión entre individuos, por lo que es posible que cumpla una función en tales contextos. Los peces siameses son conocidos por su motivación a pelear frecuentemente, y su comportamiento agresivo ya se ha descrito ampliamente. Sin embargo, el bostezo no se ha incluido en su repertorio de comportamiento agresivo, aunque hay evidencia de que ocurre en situaciones de enfrentamiento. Es posible que el bostezo sea una señal que los peces siameses utilizan durante situaciones sociales que pueden conducir a enfrentamientos. Si así fuera, ¿cuál sería la función comunicativa del bostezo en *B. splendens*?

2.1. Hipótesis y predicciones

Con base en la revisión expuesta arriba, propongo las siguientes hipótesis para explicar la función comunicativa del bostezo.

Hipótesis 1: El bostezo en *B. splendens* es una señal que comunica la capacidad fisiológica.

Si la hipótesis fuera correcta, entonces esperaríamos que:

1. Un pez que perciba a otro pez bostezando más que él mismo se sentirá intimidado y evitará hacer desplantes agresivos.
2. Un pez intimidado por otro pez que bostece más mostrará niveles elevados de cortisol y disminuidos de 11-KT porque los desplantes habrán disminuido.

Hipótesis 2: El bostezo en *B. splendens* es una invitación a mantener la calma para evitar una confrontación dañina para los peces involucrados.

Si la hipótesis fuera correcta, entonces esperaríamos que:

1. Un pez que observe a otro pez bostezando más que él mismo se apaciguará y realizará menos desplantes agresivos.
2. Un pez que observe a otro pez bostezando más mostrará niveles bajos de cortisol y 11-KT.

Hipótesis 3: El bostezo en *B. splendens* es una advertencia que indica intención de agresividad.

Si la hipótesis fuera correcta, entonces esperaríamos que:

1. Un pez que observe a otro pez bostezando responderá con desplantes agresivos.
2. Un pez que observe a otro pez bostezando más mostrará niveles elevados de cortisol y 11-KT.

2.2. Objetivo general

Aportar evidencia de que el bostezo en machos de *B. splendens* cumple una función de comunicación durante encuentros agonísticos con otros machos de la misma especie.

2.3. Objetivos particulares

1. Poner a prueba algunas de las predicciones derivadas de las hipótesis comunicativas del bostezo.
2. Analizar el comportamiento de los peces en respuesta a los tratamientos (i.e. videoestímulos) que ponen a prueba las hipótesis.
3. Medir la producción de esteroides (11-KT y cortisol) en peces macho en respuesta a los tratamientos (i.e. videoestímulos) que ponen a prueba las hipótesis.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Para poner a prueba las predicciones que se desprenden de las hipótesis agrupé a los peces que usé (60 peces experimentales) en bloques; cada bloque consistió de 5 tratamientos (ver abajo) aplicados a 5 peces que sometí a tres ensayos: **1.** Ensayo para medir la capacidad fisiológica de cada pez; **2.** Ensayo pre-experimental para medir los niveles basales de esteroides (11-KT y cortisol); y **3.** Ensayo experimental para medir los mismos esteroides y las pautas de comportamiento de cada pez como respuesta a los videoestímulos. Realicé los tres ensayos de cada bloque en días sucesivos y cada bloque en una semana. Luego, una persona ajena a los objetivos y tratamientos del proyecto observó los videos y contó las pautas de comportamiento de interés de los peces durante el primer y tercer ensayo. Para complementar las mediciones de comportamiento, extraje muestras del agua donde estuvieron los peces durante el segundo y tercer ensayo y medí los esteroides referidos arriba. Medí los niveles de esteroides a una submuestra de 35 peces mediante ensayo inmunoenzimático (EIA) con kits disponibles comercialmente (Cayman Chemicals). Cada semana de experimentos repetí el procedimiento que describo a continuación (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Resumen del procedimiento experimental seguido para todas las series experimentales.

Día	Ensayo	Objetivo	Procedimiento	Información obtenida
1	Obtención de los videos de comportamiento (Sección 3.4)	Obtención de escenas de los comportamientos que mostré a los peces durante el ensayo experimental.	Videogrababa a cada pez estímulo (12 en total) durante 60-90 min. Videogrababa a los peces en reposo y viendo su reflejo. Editaba los videos para obtener 5 videoestímulos.	5 videoestímulos: 1. el pez en movimiento, 2. aperturas de la boca, 3. mordidas, 4. bostezos, 5. bostezos y mordidas.
2	Medición de la capacidad fisiológica (Sección 3.5)	Medir la capacidad fisiológica de cada pez usando un estímulo equivalente para todos los peces.	Ponía al pez experimental (60 en total) en una pecera limpia y esperaba 10 minutos de aclimatación. Después descubría un espejo y esperaba 5 minutos más. Videogrababa los 15 minutos de ensayo.	Aperturas del opérculo y respiraciones en la superficie (durante los 5 minutos frente al espejo).
3	Ensayo pre-experimental (Sección 3.6)	Conocer la cantidad de esteroides que cada pez produce en ausencia de los videoestímulos.	Ponía al pez experimental en una pecera con agua nueva y esperaba 10 minutos de aclimatación. Después descubría una pantalla que mostraba el video de una pecera vacía. Esperaba 20 minutos más (videogrababa los 30 minutos de ensayo). Trataba el agua donde estuvo el pez para extraer las muestras de esteroides.	Muestras de esteroides (11-KT y cortisol).
4	Ensayo experimental (Sección 3.6)	Presentar los videoestímulos a los peces y medir su respuesta (conductual y fisiológica) a cada videoestímulo.	Repetía el procedimiento del ensayo pre-experimental, excepto que cada pez veía uno de los videoestímulos en lugar de una pecera vacía. También videogrababa los 30 minutos de ensayo.	Frecuencia de aperturas del opérculo, mordidas, entradas a la sombra y bostezos. Muestras de esteroides.
5	Medición de los esteroides (Sección 3.7)	Cuantificar la cantidad de esteroides que cada pez produjo como respuesta a los videoestímulos mostrados.	Descongelaba, extraía, secaba y resuspendía las muestras de los dos ensayos anteriores. Las muestras eran cuantificadas por ensayo inmunoenzimático (EIA).	Concentraciones de los esteroides en los ensayos pre-experimental y experimental para 35 de los 60 peces experimentales.

3.1. Peces de estudio

Adquirí peces macho siameses (*B. splendens*) en 10 acuarios locales. Decidí usar al pez siamés porque el bostezo ya está descrito en su repertorio de comportamiento (Simpson, 1968) y se ha reportado que ocurre frecuentemente durante encuentros agonísticos (Baenninger, 1987); estos peces muestran comportamiento agresivo frecuente, ya sea ante su reflejo (Abrahams y col., 2005) o a videos de otros machos de pez siamés (Allen y col., 1997), lo cual me permitió estudiar su reacción ante los estímulos que les presenté. En otros estudios se ha medido la concentración de esteroides del pez siamés en el agua (Dzieweczynski y col., 2006) y decidí obtener la misma medición. Todos los machos eran azules de 3.57 ± 0.03 cm (promedio \pm desviación estándar del promedio) de longitud estándar y 1.30 ± 0.04 g de peso corporal. Cada pez fue alojado en peceras de 20 x 17 x 14 cm (largo x ancho x altura) ó 20 x 17 x 17 cm y cada una contuvo 2.8 L de agua de garrafón con 10 gotas de una sustancia llamada *Stress Coat* (proveedor: Api) para mantener al pez comfortable. Usé 200 g de grava como sustrato para cada pecera y una piedra difusora conectada a una bomba para airear el agua. Las peceras tuvieron separaciones opacas de papel Kraft para evitar que los peces se relacionaran y sus pautas agonísticas menguaran. Cada pecera estuvo cubierta con una lámina de acrílico para evitar que los peces saltaran y que el nivel del agua disminuyera por evaporación. Los peces eran alimentados 2 veces al día con alimento comercial para peces siameses (TetraMin; 46% proteína, 7% grasa) y mantenidos bajo un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (las luces se encendían a las 7:00 am). Usé a cada macho en una sola prueba para evitar que la habituación a las condiciones del experimento modificara los resultados.

La extensión que hay de la boca al pedúnculo caudal (i.e., longitud estándar) de cada pez fue medida usando una red para empujar al pez suavemente a una de las paredes de la pecera y hacer la medición con una regla común. Agrupé a los peces de tal forma que todos los de un grupo (i.e., bloque) fueran lo más parecidos en longitud estándar. También estimé el peso corporal de los peces poniendo a cada uno en un recipiente de plástico con agua que pesaba antes y después de añadir al pez; tomé la diferencia entre ambas medidas como una estimación del peso del pez.

3.2. Diseño experimental

Empleé un diseño de bloques aleatorizados, teniendo a la semana como criterio de bloquización; usé este criterio para remover el posible efecto del tiempo transcurrido entre series experimentales. El experimento consistió en la aplicación de cinco tratamientos (ver más abajo) replicados 12 veces (uno por cada bloque). Para cada bloque contaba con 10 peces, seleccionaba a los peces estímulo y experimentales de la siguiente manera: **1.** Removía del grupo al pez más pequeño y al más grande (en longitud estándar), si había más de un pez con la misma medida los elegía aleatoriamente; **2.** De los 8 peces restantes, elegía 1 aleatoriamente para ser el pez estímulo; **3.** De los 7 peces restantes, elegía aleatoriamente a 5 como peces experimentales; **4.** Los 2 peces restantes permanecían como reserva, en caso de que algún pez se enfermara antes de iniciar las series experimentales. Por lo tanto, para cada bloque empleé seis peces: cinco peces

experimentales y uno cuyo comportamiento videograbé para obtener la serie de estímulos que presenté a los peces del bloque siguiente (Figura 3.1).

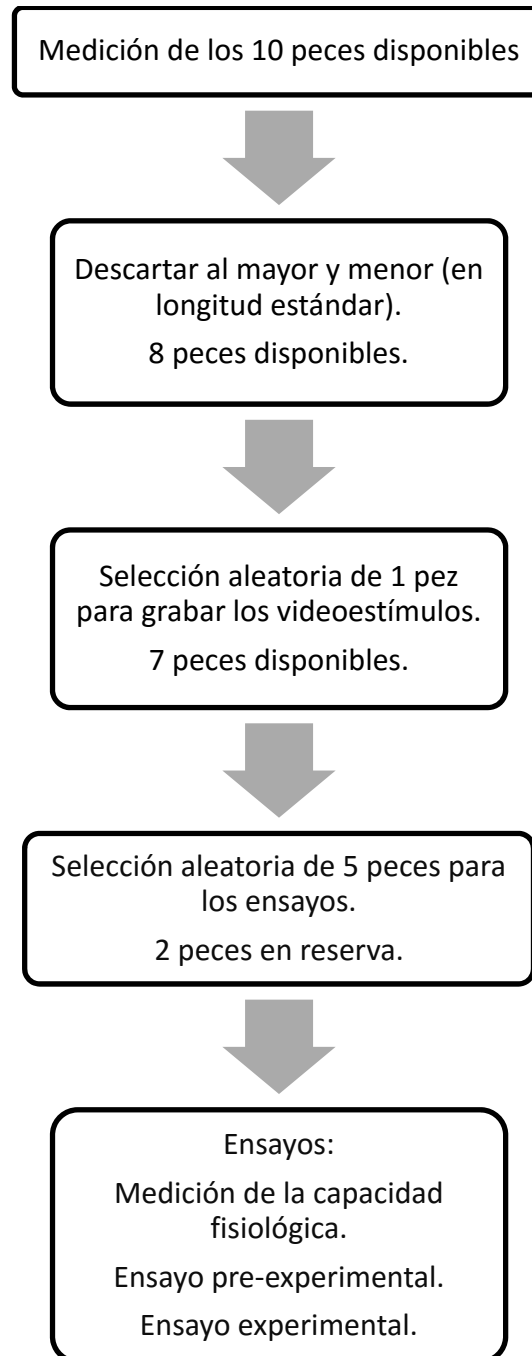


Figura 3.1 Diagrama de bloques que ilustra la asignación de los peces a cada tratamiento. Seguí el mismo procedimiento para los 12 bloques experimentales. Los 5 peces pasaban por los 5 ensayos en días sucesivos.

Al inicio de cada serie de ensayos videogrababa al pez estímulo para obtener los videos que más tarde presentaría a los peces experimentales. Los videos mostraban a los peces experimentales combinaciones de bostezos francos, aperturas de la boca sin intención agresiva, intentos de mordida y peces en movimiento, en cinco condiciones experimentales: **1.** El pez en movimiento sin mostrar pautas de desplante, **2.** Sólo aperturas de la boca, **3.** Intentos de mordida, **4.** Bostezos, y **5.** Bostezos y mordidas. Cada video mostraba la misma cantidad de estímulos, excepto el primer tratamiento. Entre estímulo y estímulo presentaba escenas del pez sólo en movimiento, el movimiento sirvió para retener la atención de los peces experimentales. Cada ensayo experimental fue videograbado y consistía en poner un pez macho—pez experimental—en una pecera de 20 x 17 x 17 cm (largo x ancho x alto) frente a un monitor que proyectaba uno de los cinco videoestímulos preparados. La pecera contenía 3 L de agua nueva, entre prueba y prueba limpiaba las peceras con jabón y etanol para remover cualquier esteroide o rastro químico. La pecera experimental estuvo aislada visualmente del exterior mediante una cortina.

Los 60 peces fueron asignados a los tratamientos de manera aleatoria e independiente de bloque a bloque, y el orden en que éstos se pusieron a prueba también fue aleatorio (Tabla 3.2). Cuando ponía al pez en la pecera de prueba le dejaba 10 minutos para que se acostumbrara al ambiente nuevo. Posteriormente mostraba el videoestímulo al pez experimental y videogrababa su comportamiento.

Además de las mediciones de comportamiento, medí dos esteroides (11-KT y cortisol) en muestras del agua en la que estuvieron los peces durante las pruebas de

comportamiento. Elegí aleatoriamente 7 bloques (una submuestra de 35 peces) y medí ambos esteroides antes (ensayo pre-experimental) y después de que los videoestímulos fueran presentados a los peces (ensayo experimental); hice estas mediciones para reforzar la información obtenida de las pruebas de comportamiento y facilitar la discriminación entre las hipótesis. A continuación describo los métodos y materiales que usé.

Tabla 3.2. Aleatorización de la aplicación del orden de los tratamientos para cada bloque.

Bloque	PM	AB	IM	B	BIM
1	2	4	5	3	1
2	3	5	4	2	1
3	1	5	3	4	2
4	4	2	3	5	1
5	5	2	3	4	1
6	5	4	2	1	3
7	2	1	4	5	3
8	1	4	2	3	5
9	1	4	2	3	5
10	4	2	3	5	1
11	2	3	4	1	5
12	2	1	5	4	3

Las letras se refieren a cada uno de los cinco tratamientos: PM, pez en movimiento; AB, aperturas de la boca; IM, intentos de mordidas; B, bostezos; BIM, bostezos e intentos de mordidas. Los números se refieren al orden de aplicación de los tratamientos. Todas las aleatorizaciones se hicieron en R.

Dos tipos de variables caracterizan al estudio experimental:

1. Variables independientes: una variable independiente (tratamiento) con 5 niveles (1. Pez en movimiento, 2. Aperturas de la boca, 3. Intentos de mordidas, 4. Bostezos y 5. Bostezos e intentos de mordidas).
2. Variables dependientes: las pautas de comportamiento como respuesta al tratamiento, los niveles de 11-KT y cortisol (niveles pre-experimentales y experimentales).
3. Covariables: longitud estándar, peso corporal, capacidad fisiológica.

3.3. Descripción de las pautas de comportamiento

Una observadora voluntaria, ajena a los objetivos del experimento, contó las pautas de desplante de los peces siameses usando la descripción hecha por Simpson (1968) y del bostezo por Baenninger (1987).

Apertura del opérculo. Se define como un aumento repentino de la distancia entre el extremo distal del opérculo y el cuerpo, sin importar la posición inicial del opérculo. Este comportamiento ocurre cuando el pez está orientado hacia un rival. Durante la apertura del opérculo la membrana branquiostegal suele estar expuesta, pero Simpson no distinguió niveles de exposición de la misma (Figura 3.2a).

Intento de mordida. Se define como una apertura y cierre repentinos de la boca del pez, acompañada de una aproximación súbita hacia un rival (Figura 3.2b).

Apertura de la boca. Consiste en la apertura y cierre de la boca para empujar agua hacia las agallas, generalmente de forma rítmica y repetitiva. Los movimientos de apertura y cierre de la boca tienen la misma duración; ésta no es una pauta que comunique algo al rival, por lo que el pez no tiene una orientación determinada (Figura 3.3a).

Bostezo. Se define como una apertura lenta de la boca, la retención de la posición abierta durante algunos instantes, y finalmente un cierre repentino. En los peces siameses, el bostezo está acompañado de una proyección frontal de las estructuras de la boca, y ocasionalmente de la expulsión de aire por las agallas (Figura 3.3b).

Respiraciones superficiales. Los miembros de la familia Gourami como el pez siamés poseen un órgano especializado llamado laberinto, capaz de absorber O_2 en fase gaseosa. Los peces periódicamente suben a la superficie a tomar bocanadas de aire que impulsan hacia el laberinto y posteriormente expulsan como burbujas por las agallas. El pez siamés obtiene la mayor parte del oxígeno que requiere por este medio y no por las agallas, por lo que requiere subir a la superficie aproximadamente cada uno o dos minutos. La frecuencia puede reducirse durante la noche o aumentar si el pez está bajo una exigencia fisiológica mayor (ejercicio, estrés, etc.) (Figura 3.4).

Entradas al área en sombra. En el arreglo experimental el pez podía elegir enfrentar al rival (el video del pez estímulo) o escapar, refugiándose en un área sombreada al otro extremo de la proyección del pez estímulo. Cada vez que el cuerpo del pez cruzaba por completo al área en sombra se contaba como una entrada y ésta concluía cuando todo el cuerpo del pez salía de la sombra.

Capacidad fisiológica. Definí la capacidad fisiológica como la aptitud de los animales para obtener y monopolizar recursos, ya sean alimento, territorio o parejas. Para medir la capacidad fisiológica usaba el número de aperturas del opérculo, que como se reportó anteriormente (Abrahams y col., 2005) es un indicador franco de la capacidad fisiológica del pez siamés en contextos de interacción agonística. La frecuencia con la que el pez puede abrir el opérculo depende de sus niveles de oxígeno en sangre, por lo que también consideré el número de respiraciones superficiales que el pez realizaba en el mismo lapso de tiempo.

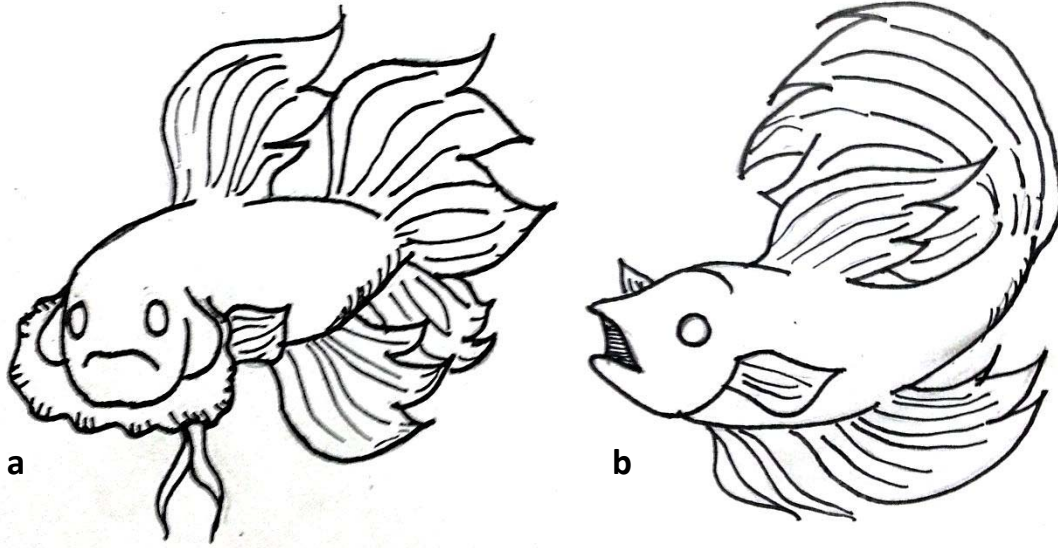


Figura 3.2 Ilustraciones del comportamiento del pez siamés, **(a)** apertura del opérculo, **(b)** intento de mordida.

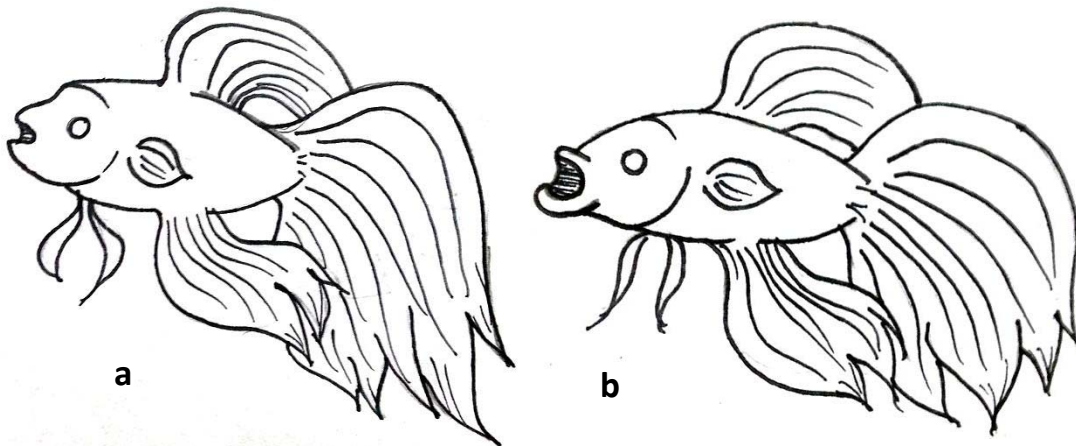


Figura 3.3 Ilustraciones del comportamiento del pez siamés, **(a)** apertura de la boca, **(b)** bostezo.

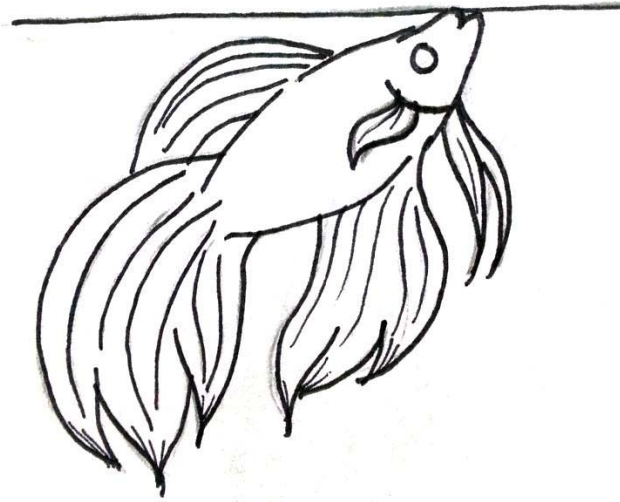


Figura 3.4 Ilustración de un pez siamés realizando una respiración en la superficie del agua.

3.4. Obtención de los videos de comportamiento para preparar los videoestímulos

La primera parte de cada semana experimental consistió en obtener los videos que presenté a los 5 peces experimentales del bloque. Todos los peces experimentales de un bloque veían videos de un solo pez estímulo para asegurar que sus respuestas a los peces estímulo sólo fueran ocasionadas por los tratamientos asignados con los videos. El pez estímulo fue distinto para cada bloque con el fin de tener réplicas independientes de los experimentos.

3.4.1. Arreglo experimental para obtener los videos de comportamiento

El arreglo experimental consistió en una cámara de observación conformada por un andamio de metal de 90 x 90 x 160 cm (largo x ancho x altura), cubierto por una cortina doble de tela negra opaca. La cámara de observación permitió aislar visualmente el interior y atenuar el ruido proveniente del exterior. Dentro de la cámara de observación coloqué una mesa de madera de 90 x 100 x 85 cm en cuyo centro puse una capa de espuma de poliuretano de 1 cm de grosor y sobre ésta una capa de cartón corrugado; este arreglo sirvió para disminuir las vibraciones causadas por movimientos externos. En cada ensayo llenaba una pecera experimental de 20 x 17 x 17 cm con 3 L de agua nueva y la colocaba dentro de la cámara de observación, sobre el cartón. La pecera estaba iluminada por una lámpara de leds "AI HYDRA" (Aqua Illumination) de intensidad variable. Los valores de iluminación (en porcentaje) para cada led fueron: CW 90 (blanco), V 0 (violeta), DR 60 (rojo), G 78 (verde), DB 10 (azul oscuro), RY 10 (azul) y UV 0 (ultravioleta). La lámpara descansaba sobre una estructura construida en el andamio metálico a una distancia de 67 cm de la superficie del agua. Videofilmaba a los peces desde una de las paredes, la de 17 x 17 cm, con la videocámara descansando sobre la mesa a 25 cm de la pecera. Para evitar que la presencia de la videocámara distrajera al pez, colocaba un trozo de cartón con un agujero en el centro, del tamaño de la lente, frente a la videocámara. Para mejorar el contraste del pez con el fondo, colocaba una hoja de tamaño carta de papel blanco en la pared contraria a la videocámara.

3.4.2. Grabación de los videos de comportamiento

Videograbé el comportamiento de los peces con una cámara de video (Samsung Digital-Cam SDC34) y simultáneamente digitalizaba las imágenes con una tarjeta digitalizadora (“TV Capture” Mpeg Usb TV Station); este procedimiento permitió transmitir la señal a una computadora para grabarla mientras observaba la pecera en tiempo real. Los archivos digitales obtenidos se guardaron en formato MP4 sin compresión y una resolución de 640 x 480, sin audio. Videogrababa al pez estímulo durante 110 minutos en total, divididos de la siguiente manera: 10 minutos de aclimatación, 30 minutos en reposo (sin ningún estímulo adicional), 10 minutos observando su reflejo en un espejo y 60 minutos después de haber observado su reflejo. El espejo—uno común de una sola vía de 17 x 17 cm o uno de 2 vías de 17 x 17 cm montado en una cámara de Gessel—servía para motivar al pez a hacer desplantes agonísticos a su imagen y frente a la videocámara. Así logré obtener escenas de las pautas de comportamiento que luego presentaría a los peces experimentales, quienes las verían como si el pez en la pantalla estuviera orientado hacia ellos. Observaba la digitalización en vivo para asegurarme de que el pez bostezara al menos una vez; el bostezo tenía que ser una pauta distinguible fácilmente de otras, ocurrir en el lado de la videocámara, cerca del centro de la toma y que la boca del pez fuera visible completamente durante toda la duración del bostezo. Además, que el pez no girara su cuerpo antes de concluir el bostezo y que en ningún momento estuviera cubierto por sus aletas. En dos ocasiones los peces no bostezaron dentro del tiempo de videograbación, así que elegía aleatoriamente a otro pez

del mismo bloque para repetir el procedimiento. En total obtuve aproximadamente 20 horas de videograbaciones de los 12 peces estímulo.

3.4.3. Edición de los videoestímulos

Todas las ediciones de las videograbaciones las hacía con el software Windows Live Movie Maker (Microsoft Corporation) para Windows 7. Con este software podía extraer las escenas de los comportamientos que me interesaban: el pez dando una vuelta completa por la pecera sin realizar ninguna pauta de desplante, abriendo la boca, bostezando y mordiendo. Además podía manipular las escenas individualmente y acomodarlas en la secuencia apropiada. Revisaba las videograbaciones de cada pez estímulo una a una, y extraía escenas de los comportamientos de interés. De las videograbaciones del pez en reposo obtenía las escenas de éste dando vueltas por la pecera y de las aperturas de su boca. De las videograbaciones del pez viendo su reflejo en el espejo obtenía las escenas de las mordidas y los bostezos. Procuraba que en todas las videograbaciones de un bloque, los episodios de bostezo, mordida y apertura de la boca que usaba como estímulos ocurrieran en la misma dirección y aproximadamente en la misma zona de la pecera. Edité las escenas para obtener los 5 videoestímulos que correspondían a los 5 tratamientos que usé en cada bloque. En cada videoestímulo presenté 10 repeticiones de la misma pauta en momentos determinados aleatoriamente; en el caso de las videograbaciones de movimiento del pez no se presentaba ninguna otra pauta, y en las videograbaciones de los bostezos y las mordidas se presentaban 5

repeticiones de cada pauta. Entre estímulos presentaba al pez dando vueltas por la pecera, para retener la atención del pez experimental. Cada videoestímulo tuvo una duración de 20 minutos y en total preparé 60 videoestímulos, 5 para cada uno de los 12 bloques experimentales. Para los primeros dos bloques usé videoestímulos de peces que provenían del mismo bloque. Luego, para evitar algún posible efecto de experiencias compartidas entre el pez experimental y el pez estímulo, a partir del tercer bloque usé videoestímulos de peces que pertenecían al bloque anterior, por lo tanto el pez estímulo y los experimentales eran desconocidos. Al final de la edición de las videograbaciones el software hacía el procesamiento del material editado (“rendering”) y éste se guardaba en archivos con formato WMV (Windows Media Video).

3.5. Medición de la capacidad fisiológica

Decidí medir la capacidad fisiológica de los peces experimentales ya que una de las hipótesis propone que el bostezo tiene la función de comunicarla. La medición de la capacidad fisiológica constituía el primer ensayo al que sometía a los peces de cada bloque, y realizaba esta medición el mismo día para todos los peces de un bloque. El ensayo duraba 15 minutos en total: 10 minutos de aclimatación y 5 minutos en los que el pez podía ver su reflejo en un espejo y realizar desplantes sin otra distracción. La observadora analizó los videos y contó las aperturas del opérculo y respiraciones superficiales, y con estas mediciones calculé la capacidad fisiológica.

3.5.1. Procedimiento experimental

La cámara de observación, la lámpara, la mesa, la espuma, el cartón y la pecera se dispusieron igual a como describí para la grabación de los videoestímulos (Sección 3.4.1). También usé la misma videocámara y tarjeta digitalizadora, conectadas directamente a la computadora para facilitar la videograbación y visualización simultáneas. Videogrababa al pez desde arriba de la pecera con la ayuda de un tripié para ver las aperturas del opérculo con facilidad (Figura 3.5). Tres paredes de la pecera estaban cubiertas por el exterior con cartón corrugado, y la cuarta tenía un espejo (17 x 17 cm) inicialmente cubierto con papel Kraft. Elegí estos materiales para imitar el sustrato natural del hábitat del pez y evitar que se distrajera con estímulos visuales del exterior. Cada ensayo experimental consistía en colocar a cada pez en la pecera experimental con agua nueva y dejarlo ahí por 10 minutos para que se aclimatara, sin presentarle ningún estímulo. Transcurrido el tiempo de aclimatación, removía el papel Kraft (con una pestaña accesible desde el exterior, por lo que no tenía que abrir la cortina o entrar a la cámara de observación) para descubrir el espejo y permitir al pez ver su reflejo durante 5 minutos. Videogrababa a cada pez durante 17 minutos (10 minutos de aclimatación, 5 minutos de ensayo y 2 minutos extra de margen de error) y en total obtuve 60 videograbaciones.

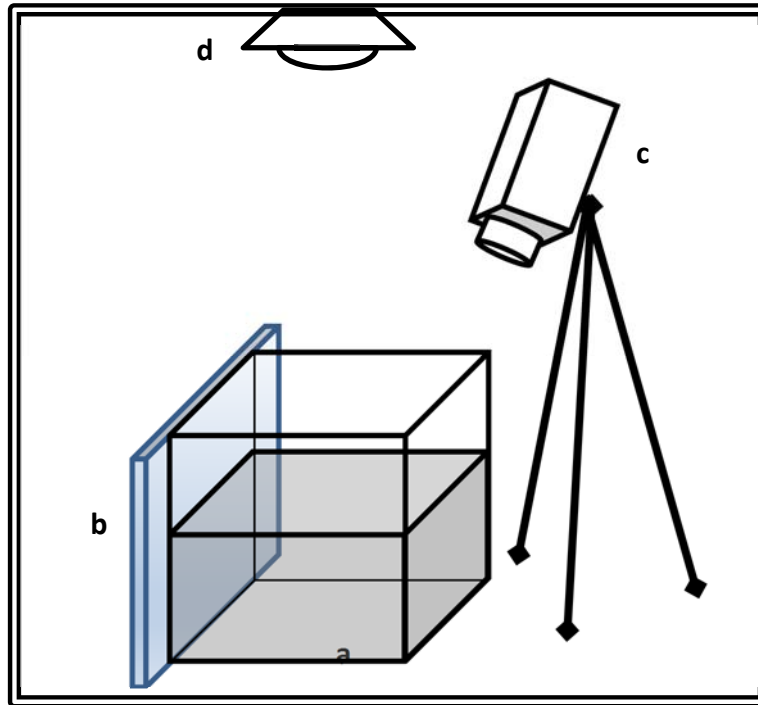


Figura 3.5 Arreglo experimental para la medición de la capacidad fisiológica. **(a)** Pecera experimental; **(b)** Espejo (inicialmente cubierto con papel Kraft); **(c)** Videocámara y tripié para videograbar al pez desde la parte superior de la pecera; **(d)** Lámpara que iluminó la pecera.

Al concluir la prueba regresaba a cada pez a su pecera de alojamiento. Lavaba y llenaba la pecera experimental con agua nueva para la siguiente prueba, hasta completar las pruebas de los 5 peces del bloque. El orden en que los peces fueron puestos a prueba fue aleatorio. Procuré que durante el resto del día los peces no estuvieran expuestos a ningún estímulo o factor estresante adicional (e.g. aseo de la pecera), para que regresaran a su condición habitual y fueran puestos a prueba al día siguiente.

3.5.2. Observación de las pautas que constituyeron la capacidad

fisiológica

Entrené a una observadora ajena a los objetivos del proyecto para identificar las aperturas del opérculo y respiraciones superficiales. En cada videograbación la observadora identificaba la primera vez que el pez abría el opérculo tras ver su reflejo, y a partir de ese momento comenzaban los 5 minutos de la observación. Dentro de ese lapso de tiempo contaba la frecuencia con la que el pez abría el opérculo y realizaba respiraciones superficiales. La observadora sólo contaba las aperturas del opérculo cuando la extensión de éste era completa (Figura 3.6). La observadora consideraba que una nueva apertura ocurría si el pez antes cerraba el opérculo parcial o totalmente; el pez no siempre cerraba el opérculo totalmente tras haberlo exhibido, ni su extensión era simétrica todas las veces. La observadora analizaba las videograbaciones en Windows Live Movie Maker y era libre de adelantarlas, regresarlas u observarlas en cámara lenta, según necesitara. Registraba la ocurrencia de los comportamientos señalados en hojas de papel con un formato *exprofeso* y analizaba los 5 videos de un bloque en un mismo día.



Figura 3.6. La imagen presenta a un individuo de *B. splendens* realizando una apertura del opérculo.

3.6. Ensayos pre-experimental y experimental

Anticipé que debido a la variación natural entre individuos y sus diferencias fisiológicas, cada pez produciría cantidades diferentes de esteroides aun en ausencia de estímulos. Para evitar que este efecto pudiera confundirse con el efecto del tratamiento, en el ensayo experimental reproducía el ensayo pre-experimental de tal forma que lo único diferente fuera la presencia del pez estímulo. Para cada bloque realizaba ambos ensayos en días sucesivos, cada día extraía muestras de esteroides para ser medidas posteriormente mediante EIA. También ponía a prueba a cada pez a la misma hora en ambos días para evitar algún efecto de los ciclos circadianos en los niveles de esteroides. Para cada ensayo colocaba al pez en la pecera experimental dentro de la cámara de observación, dejaba 10 minutos para aclimatación y después descubría una pantalla que mostraba videos distintos según el ensayo en turno: para el ensayo pre-experimental la imagen de una pecera vacía; para el ensayo experimental uno de los cinco videoestímulos

preparados previamente (Sección 3.4). Pasados 20 minutos más (30 minutos totales) regresaba al pez a su pecera de alojamiento y extraía los esteroides presentes en el agua de la pecera experimental; las muestras eran congeladas y almacenadas hasta su medición. Posteriormente, la persona voluntaria observaba las videograbaciones del ensayo experimental y contaba los comportamientos que el pez mostraba (descritos en la Sección 3.3). Usé la información de la frecuencia de las pautas de comportamiento y el cambio en los niveles de esteroides entre ambos ensayos para analizar la respuesta de cada pez ante los videoestímulos mostrados.

3.6.1 Procedimiento

Al inicio de cada ensayo medía el pH de las peceras de alojamiento de los 5 peces experimentales. Usé un potenciómetro portátil (Hanna Instruments) que calibraba inmediatamente antes con buffers de pH 7 y 10 (LaMotte). Promediaba el pH medido en las 5 peceras (pH promedio). En una tina de plástico vertía 15 L de agua nueva de garrafón e igualaba el pH con el pH promedio, si era necesario lo ajustaba con Ca_2CO_3 (Medina). En ensayos previos encontré que en el rango de pH esperado (7.0 - 7.4) la adición de Ca_2CO_3 al agua producía un aumento constante de pH (i.e. 0.07 g de Ca_2CO_3 aumentaba 0.1 unidades el pH de 15 L de agua). Mezclaba el Ca_2CO_3 en el agua con un agitador mecánico modificado (Agitador A4 Aquatic Eco Systems) durante 30 segundos y volvía a medir el pH para confirmar que éste alcanzara el valor deseado. Usaba los 15 L de agua para los 5 ensayos iniciales del día (i.e. 3 L por ensayo). El arreglo experimental incluyó la mesa y

cámara de observación descritas anteriormente (Sección 3.4.1); sobre la mesa colocaba una pantalla de rayos catódicos (Siemens, MCM-21T2) ajustada a 30% de brillo y 10% de contraste; en ensayos previos encontré que estos valores eran los adecuados para que el pez prestara atención a los videos y distinguiera al pez estímulo. Frente a la pantalla colocaba una plataforma de madera de 20 cm de alto que me permitía elevar y centrar la pecera frente a la pantalla. Sobre la plataforma colocaba espuma de poliuretano y cartón corrugado (ver sección 3.4.1). Cubría toda la superficie frontal de la pantalla con papel Kraft, exceptuando el área donde colocaba la pecera. Al inicio de cada ensayo tapaba la pantalla con un pedazo de papel Kraft con una pestaña para poder removerlo desde el exterior de la cámara de observación. Iluminaba la cámara de observación con la lámpara descrita más arriba (AI HYDRA) y los valores de iluminación (en porcentaje) de cada led que usé fueron: CW 15, V 0, DR 1, G 1, DB 1, RY 1, UV 0; en ensayos previos encontré que estos valores eran los adecuados para que el pez observara los videoestímulos y que el pez experimental fuera visible en los videos. Usaba una lámina de acrílico opaco mate para cubrir la pared de la pecera opuesta a la pantalla pues en ensayos previos encontré que la pantalla reflejaba parte de la imagen en la pared opuesta, así que decidí cubrirla con el acrílico para evitar que la imagen reflejada pudiera distraer al pez. También colocaba un pedazo de cartón de 7 x 21 cm para crear un área en sombra dentro de la pecera (a forma de refugio). Videgrababa a los peces usando la misma videocámara y arreglo como describí anteriormente. Colocaba la videocámara de forma oblicua (45° de inclinación) a la pantalla para videgrabar al pez directamente y también su reflejo en la interfase que se formaba entre el vidrio y el agua—el reflejo era visible solamente desde el

exterior de la pecera. Los peces siameses suelen moverse vigorosamente y pueden ocultar su cuerpo con sus aletas (no intencionalmente). Videgrabar el reflejo también permitió observar al pez, incluso cuando éste se ocultaba de la videocámara y así aumentar la probabilidad de observar los comportamientos de interés. En el lado opuesto colocaba un cartón idéntico al que cubría el frente de la videocámara y aleatorizaba el lado desde el cual videgrababa a cada pez. Cubría todas las superficies restantes con cartón corrugado para simular el ambiente natural del hábitat del pez (Figuras 3.7 y 3.8).

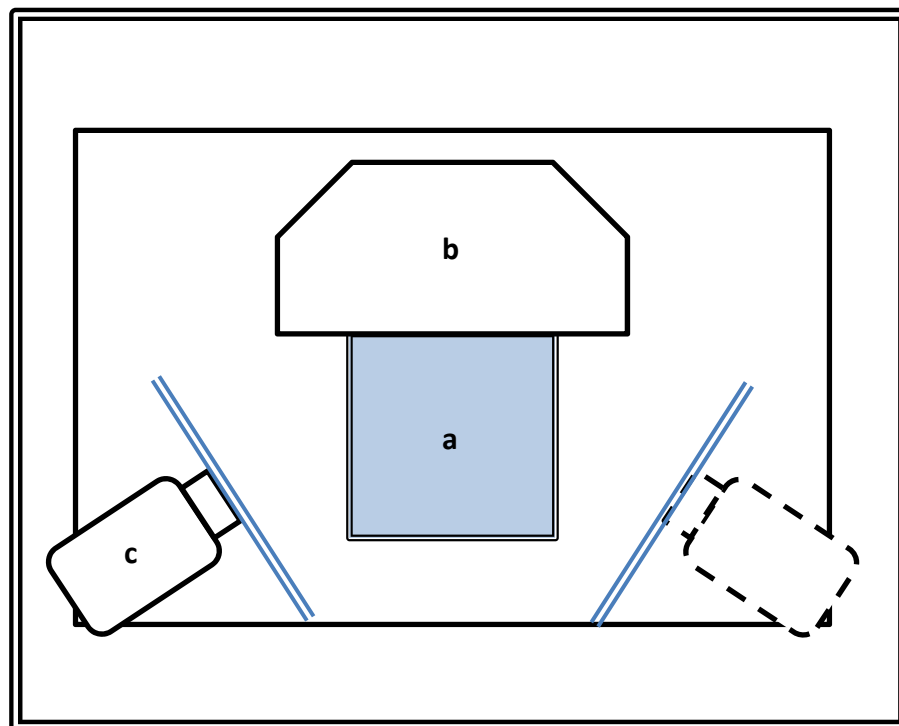


Figura 3.7. Vista superior del arreglo experimental para los ensayos. Usaba el mismo arreglo para los ensayos pre-experimental y experimental. **(a)** Pecera experimental; **(b)** Pantalla para proyectar los videoestímulos; **(c)** Videocámara cubierta con cartón de color neutro. Aleatorizaba la posición de la videocámara en cada ensayo.

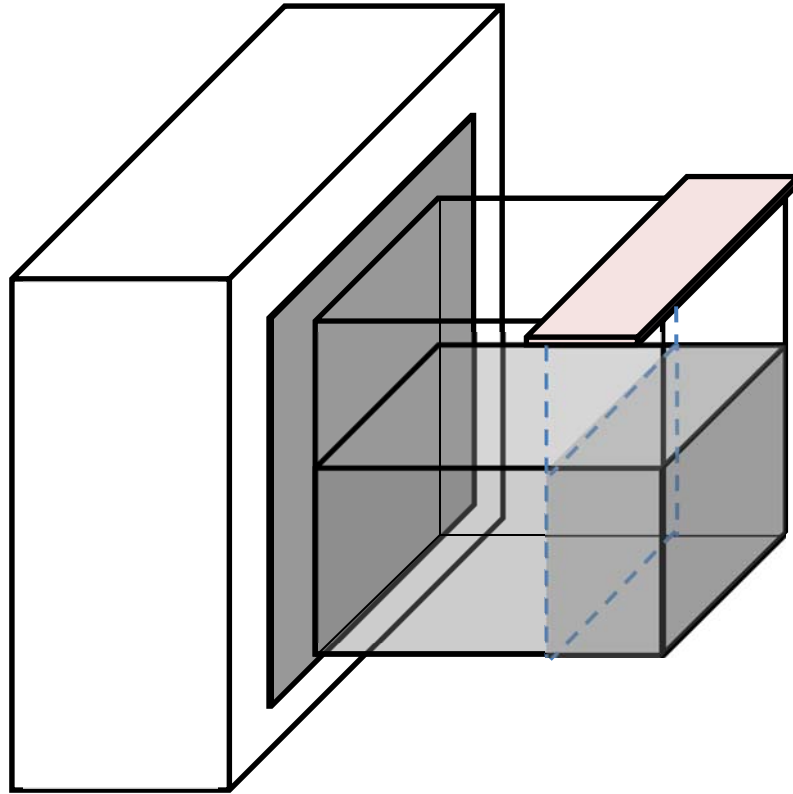


Figura 3.8. Vista lateral del arreglo experimental para los ensayos. El cartón corrugado que descansa sobre la pecera produce una sombra que cubre aproximadamente 1/3 del fondo de la pecera.

Cada ensayo (pre-experimental o experimental) consistía en colocar al pez en una pecera experimental con 3 L del agua preparada previamente; una de las paredes—la de 17 x 17 cm—quedaba totalmente pegada a la pantalla. Dejaba al pez 10 minutos para que se aclimatara a la condición. Pasado ese tiempo descubría la pantalla y mostraba el video correspondiente: una pecera vacía en el ensayo pre-experimental, o uno de los cinco videoestímulos en el ensayo experimental; el orden de presentación de los videoestímulos era aleatorio e independiente entre bloques (Tabla 3.2). Cada pez pasó por ambos ensayos en días sucesivos y a la misma hora (Tabla 3.1); repetía todo el arreglo

experimental tan idénticamente como era posible para que la única diferencia que cada pez experimentara entre un día y otro fuera la presencia del pez estímulo y las pautas mostradas por éste. Conectaba la videocámara para presenciar el ensayo en tiempo real a la vez que digitalizaba la filmación como describí anteriormente. Las videograbaciones eran almacenadas en formato AVI con compresión y sin audio. Pasados 20 minutos experimentales (30 minutos de grabación en total), regresaba al pez a su pecera de alojamiento. Tomaba las muestras de agua y las trataba para extraer los esteroides, y luego la pecera era lavada con detergente para peceras y etanol para remover cualquier rastro de esteroides.

3.6.2. Extracción de los esteroides

Realicé la extracción de los esteroides de la misma forma para todos los ensayos, ya fueran pre-experimentales o experimentales. Al concluir cada ensayo transportaba la pecera a una parrilla de agitación magnética (Lab-Line Instruments) y homogeneizaba el agua durante 3 minutos a baja velocidad. Luego filtraba el agua con filtros de celulosa puestos en un embudo Büchner de cerámica de 50 mL. Después, medía alícuotas de 100 mL del agua filtrada con un matraz aforado de 100 mL e introducía el agua a un reservorio de polipropileno con capacidad de 150 mL (botellas de suero de 100 mL). El reservorio estaba conectado a una columna cromatográfica de 3 mL con 500 mg de material adsorbente (Biotage). Elegí el adsorbente octadecilsilano (C18) para cromatografía en fase inversa; éste es similar a la sílice hidratada pero funcionalizado con cadenas de octadecil

que le confieren propiedades hidrofóbicas y no hidrofílicas. Además, el C18 es adecuado para extraer sustancias de muestras acuosas, aun si éstas son poco hidrofóbicas. Las columnas eran activadas previamente con 5 mL de etanol (J.T. Baker) y estabilizadas con 5 mL de agua tridestilada. Enseguida conectaba una bomba de aire al reservorio para ejercer una presión positiva sobre el agua, y así hacerla pasar por la columna a una velocidad de 10 mL/min, la velocidad recomendada por el fabricante (Figura 3.9). Extraje 100 mL de agua para los primeros 4 bloques y 200 mL para los siguientes 8—decidí aumentar el volumen para asegurar la extracción de suficientes esteroides para la prueba de EIA. Para el análisis de los resultados hice la conversión necesaria por el cambio de volumen. Al final de la extracción secaba cada columna con aire a presión y todas las congelaba a -80°C hasta su análisis. Trataba las muestras de agua de un ensayo a la vez y todo el material era lavado entre ensayos.



Figura 3.9 Disposición del material usado para la extracción de los esteroides. De izquierda a derecha: pecera con agua sobre la parrilla con agitación magnética, embudo Büchner y papel filtro, sistema de extracción con un reservorio para el agua, la columna cromatográfica y bomba para ejercer presión.

3.6.3. Mediciones de los ensayos pre-experimental y experimental

Las 60 videograbaciones obtenidas del ensayo experimental fueron analizadas por la misma persona que mencioné arriba. Entrené a la observadora para identificar las pautas de comportamiento con las definiciones de la Sección 3.3. Ella contaba la frecuencia de las aperturas del opérculo, mordidas y entradas al área en sombra en cada videograbación; además, también contaba la frecuencia y duración de los bostezos. Ella

empleó el software Windows Live Movie Maker para analizar las videograbaciones , y tenía la libertad de regresar o adelantar los videos como considerara necesario. Sin embargo, le pedí que evitara observar las videograbaciones en cámara lenta pues el bostezo se distingue tanto por su secuencia de movimientos como por su duración, y era importante que pudiera identificarlo a velocidad normal. Las videograbaciones de cada bloque fueron analizadas en un día y en orden aleatorio.

Para reforzar las mediciones de comportamiento cuantifiqué la concentración de 11-KT y cortisol en las muestras extraídas. Comparé la concentración de ambos esteroides en el ensayo pre-experimental con la obtenida en el ensayo experimental. Si asumimos que las condiciones externas eran idénticas podemos atribuir la diferencia medida entre un ensayo y otro a la presencia del pez estímulo y el comportamiento mostrado por éste. Hice las mediciones mediante EIA usando kits comerciales (Cayman Chemicals; ver la sección 3.7.3) y medía las 10 muestras de agua de un bloque en la misma placa (5 de la condición inicial y 5 de la condición experimental).

3.7. Análisis instrumental de los esteroides

Puesto que los peces son relativamente pequeños en un volumen de agua relativamente grande, los esteroides presentes en el agua estaban muy diluidos. Si bien las columnas cromatográficas facilitaron concentrar la muestra, fue necesario usar un método con el que pudiera medir concentraciones pequeñas de esteroides. Por esta razón

elegí usar placas de ensayo inmunoenzimático (EIA), por su sensibilidad, disponibilidad y capacidad de analizar varias muestras simultáneamente.

3.7.1. Recuperación de la muestra

Empezaba por descongelar las columnas con las muestras una hora antes de su extracción. Medía 2.5 mL de éter dietílico (Sigma-Aldrich) con una pipeta de vidrio de 5 mL y los colocaba dentro de cada columna. Esperaba hasta que el éter eluyera y mojara todo el material adsorbente, sólo entonces ejercía una presión suave (con una bomba de aire) sobre el líquido para hacerlo recorrer toda la columna y extraer la muestra. Recolectaba el éter con la muestra en tubos de ensayo de polipropileno de 5 mL (Sarstedt) apropiados para una centrífuga. Tapaba las muestras inmediatamente y las colocaba en hielo para evitar la evaporación del éter. Realicé todo el proceso de extracción de los esteroides en la campana de extracción del laboratorio del Dr. Fabián Galindo. Tan pronto como era posible introducía los tubos de ensayo en una centrífuga al vacío (Heto LabEquipment Speed Vacuum VR-1) para evaporar el éter y secar las muestras. Usé la centrífuga al vacío en el laboratorio de la Dra. Rosa María Padrós con la asistencia de la M. en C. Silvia Durán. Para evitar que el vacío pudiera arrastrar las muestras, y por lo tanto perder una fracción de éstas, seguí el siguiente protocolo de secado: 90 minutos de centrífuga sin vacío, 30 minutos de centrífuga con vacío mínimo, 30 minutos de centrífuga con vacío moderado y 30 - 60 minutos de centrífuga con vacío total hasta que la muestra estuviera

completamente seca. Al finalizar el secado sellaba los tubos de ensayo y los volvía a congelar a -80°C hasta su análisis por EIA.

3.7.2. Ensayo inmunoenzimático (EIA)

Elegí cuantificar los esteroides mediante EIA ya que es sensible a concentraciones bajas y cambios de concentración muy pequeños. Usé 8 kits de EIA disponibles comercialmente (Cayman Chemicals), 4 kits para 11-KT y 4 kits para cortisol. Analicé una submuestra de 35 peces, correspondientes a 7 bloques elegidos aleatoriamente entre los 12 bloques totales. Antes de cada prueba descongelaba los reactivos del kit y las muestras durante 1 hora. Volví a suspender las muestras con $350\ \mu\text{L}$ (primeros dos kits) ó $450\ \mu\text{L}$ (últimos dos kits) del buffer de EIA que venía con cada kit, agitando las muestras en un agitador en vórtice (MX-E de Science MED). Los kits emplean placas de 96 pozos con anticuerpos adheridos a la parte inferior, estas placas se incuban durante 18 horas con la muestra, anticuerpos específicos a cada esteroide y un rastreador. Después del tiempo de incubación lavaba los reactivos que no reaccionaban con el buffer de lavado que venía con cada kit (5 lavados sucesivos). Después del lavado añadía $200\ \mu\text{L}$ de reactivo de Ellman, el reactivo que produce la coloración. La reacción produce un compuesto coloreado con absorbancia máxima a $412\ \text{nm}$, que medí en un espectrofotómetro (Epoch) a cargo de la Dra. Citlalli Gamboa. Analizaba cada muestra por triplicado y en orden aleatorio. Realizaba los cálculos apropiados para obtener la concentración en pg de esteroide / $100\ \text{mL}$ de agua.

En hojas de cálculo almacenaba los resultados de las observaciones de comportamiento y la medición de esteroides, con respaldos físicos en papel. Cuando obtuve todos los datos realicé el análisis estadístico de los mismos.

3.8. Análisis estadístico

Durante los ensayos obtenía dos grupos de datos para cada pez: las observaciones de comportamiento registradas por la persona voluntaria y las mediciones de los esteroides; además, también registraba la longitud estándar y el peso corporal de cada pez. Consideré a las mediciones de comportamiento (respuestas a los videoestímulos) como la variable respuesta (i.e. variable dependiente) y el tratamiento, los niveles de ambos esteroides, la capacidad fisiológica, la longitud estándar y el peso del pez como variables explicativas (i.e. variables independientes). Para el análisis de los datos utilicé dos tipos de modelos: **1.** Modelos lineales mixtos (LMM por sus siglas en inglés) cuando los datos seguían una distribución normal; **2.** Modelos lineales generalizados mixtos (GLMM por sus siglas en inglés; Bolker y col. 2008) si los datos se ajustaban a distribuciones de la familia exponencial (binomial, Poisson, gama, entre otros). Para probar si los datos seguían una distribución normal usé la prueba Shapiro-Wilk. En ambos casos una parte de las variables explicativas se consideraban como de efectos fijos y otra parte como de efectos aleatorios, según fuera importante hacer comparaciones específicas o únicamente tomar en cuenta la variación debida el efecto de la variable.

Para el análisis estadístico utilicé el procedimiento de simplificación del modelo para obtener el modelo mínimo adecuado (Crawley, 2002). El procedimiento consiste en remover sucesivamente los términos del modelo que son innecesarios, siguiendo un procedimiento sistemático que analiza si cada término contribuye de manera significativa a la explicación de la varianza—es decir la proporción de la variación total que es explicada por cada variable . Con este propósito realicé un análisis de devianza para determinar si la variación explicada por cada término era significativa. El análisis de devianza compara la varianza explicada por el modelo con todos sus términos (modelo N) contra otro modelo con todos sus términos excepto el término a remover (modelo N-1). Los términos se remueven sucesivamente hasta obtener un modelo en el que todos los términos son estadísticamente significativos. Realicé los análisis en el programa R (R Core Team 2015) y consideré como significativo un valor de $P \leq 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Características de los peces y el agua

Medí el peso y la longitud estándar (definida anteriormente) de cada pez que usé (n = 60) para los ensayos experimentales. Hubo poca imprecisión en la estimación de la longitud estándar (3.57 ± 0.03 cm; promedio \pm desviación estándar del promedio) y el peso (1.30 ± 0.04 g). También medí el pH del agua de las peceras de alojamiento y encontré poca diferencia entre los días pre-experimental (7.18 ± 0.01) y experimental (7.17 ± 0.02); la medición del pH objetivo—el pH promedio en las 5 peceras de alojamiento de los peces experimentales—también fue muy similar entre los días pre-experimental (7.14 ± 0.02) y experimental (7.13 ± 0.02).

4.2. Duración de los bostezos

La observadora registró y midió la duración de 72 bostezos tentativos durante la condición experimental (Figura 4.1); usé una duración específica como criterio para distinguir a los bostezos de las aperturas de la boca y mordidas. Por la descripción del bostezo (Sección 3.3) sabemos que éste tiene una duración mayor que las aperturas de la boca y mordidas, por lo tanto decidí usar una prueba de hipótesis para separar a los dos tipos de comportamiento. Con este fin calculé el intervalo de confianza al 95% de la duración de los bostezos tentativos usando el método de muestreo repetido “bootstrap”, y fijé la zona de rechazo en la parte inferior (5%) de la distribución. El intervalo de

confianza así obtenido, permitió asegurar que en el 95% de las veces lo que se registró como bostezos fuera tal. Así, con el resultado de este análisis tomé como bostezos francos a aquellos con una duración mayor a 0.92 s. De los 72 bostezos tentativos mantuve sólo 36 bostezos francos (1.52 ± 0.11 s), los mismos que consideré en los análisis estadísticos.

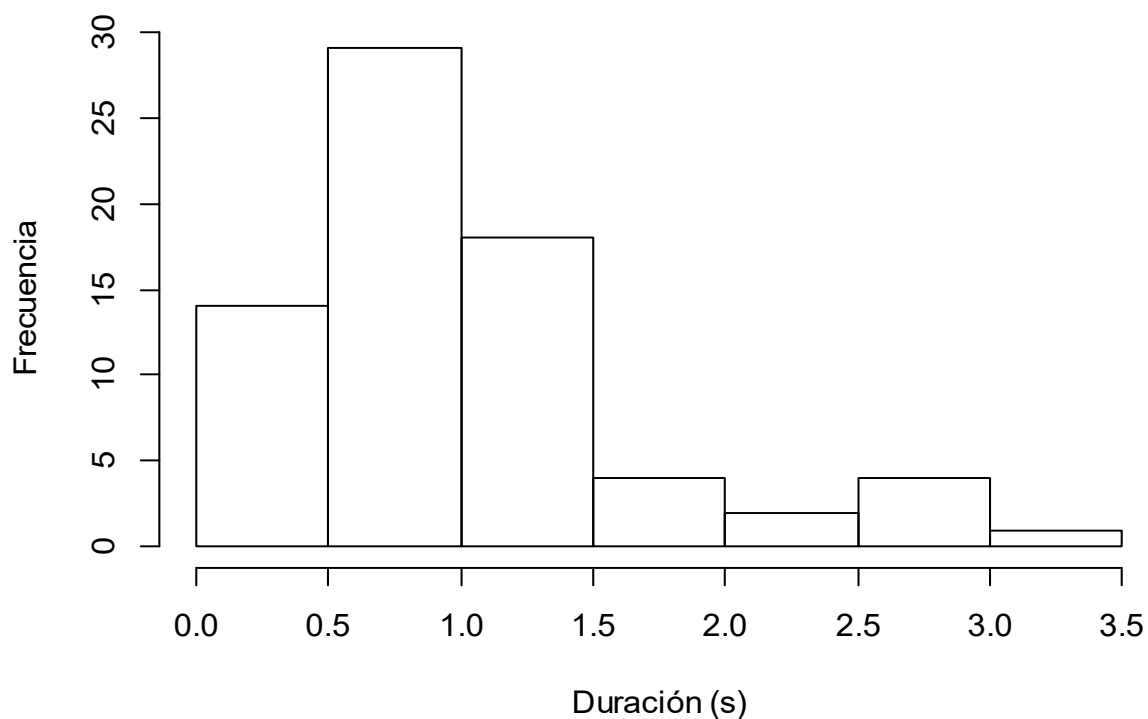


Figura 4.1. Histograma de la duración de los 72 bostezos tentativos.

4.3. Resultados del efecto de los niveles pre-experimentales de esteroides en los niveles experimentales

Mediante EIA obtuve las mediciones de 11-KT y cortisol para cada uno de los 35 peces en los ensayos pre-experimental y experimental. Transformé las concentraciones de 11-KT y cortisol (pg de esteroide/100 mL de agua/20 min) a su logaritmo para que los

datos se ajustaran al criterio de normalidad. Con esta transformación los datos de ambos esteroides fueron normales en los ensayos pre-experimental y experimental (Tabla 4.1). Hice un análisis estadístico independiente para cada esteroide, como describí en la sección de análisis estadístico, y la simplificación de los modelos y justificación del modelo mínimo adecuado se presentan en el Anexo, Tablas A1-A4 y Figuras A1-A2. A continuación describo los resultados obtenidos.

Tabla 4.1. Resumen de los resultados de la prueba Shapiro-Wilk al logaritmo de las concentraciones de esteroides.

Esteroides	Ensayo	W¹	P
11-KT	Pre-experimental	0.95	0.087
	Experimental	0.96	0.269
Cortisol	Pre-experimental	0.98	0.677
	Experimental	0.97	0.565

¹ Se refiere al estadístico de la prueba.

4.3.1. Análisis del efecto de las variables de predicción en los niveles de la 11-cetotestosterona experimental

La aplicación de un modelo lineal general mixto (GLMM) a los datos de la concentración experimental de 11-KT indicó que la variación de los efectos aleatorios (el bloque) era nula; opté entonces por el modelo más simple que no incluye a los efectos aleatorios y apliqué un modelo lineal general (GLM) a los datos. El modelo mínimo adecuado que resultó de la simplificación posee 10 términos: 5 términos correspondientes

a los 5 tratamientos, 1 término a la concentración de 11-KT pre-experimental y 4 términos a la interacción entre la concentración de 11-KT pre-experimental y el tratamiento (Tabla 4.2).

El efecto de la interacción fue estadísticamente significativo ($F_{4,25} = 3.64$, $P = 0.018$), así como el del tratamiento ($F_{4,25} = 3.08$, $P = 0.034$). Específicamente, la concentración promedio de 11-KT experimental de los peces que vieron el videoestímulo de bostezos (1.27 ± 0.22 , $n = 7$) fue significativamente mayor ($t = -2.28$, $g.l. = 25$, $P = 0.031$) que la de los peces que vieron el videoestímulo de movimiento del pez (0.90 ± 0.17 , $n = 7$; Figura 4.2). El efecto significativo de la interacción ocurrió entre el tratamiento del videoestímulo de bostezos contra la 11-KT pre-experimental ($t = 2.88$, $g.l. = 12$, $P = 0.008$), e indica que mientras que la concentración experimental de la 11 KT no cambió con la concentración pre-experimental de la 11 KT en los peces que vieron al pez en movimiento, creció en los peces que vieron el videoestímulo de los bostezos (Figura 4.3).

Tabla 4.2. Resumen estadístico del modelo mínimo adecuado para los datos del efecto de las variables de predicción en la concentración de 11-KT experimental.

Efectos fijos	Coeficiente	Error estándar	g.l.	Valor t	Valor P
PM ¹	1.02	0.35	25	2.88	0.008
AB	-0.68	0.66	25	-1.03	0.315
IM	0.27	0.51	25	0.53	0.598
B	-1.76	0.77	25	-2.28	0.031
BIM	0.77	0.53	25	1.45	0.159
KTpre	-0.08	0.23	25	-0.35	0.728
AB*KTpre	0.88	0.56	25	1.58	0.126
IM*KTpre	0.16	0.37	25	0.44	0.666
B*KTpre	1.55	0.54	25	2.88	0.008
BIM*KTpre	-0.32	0.33	25	-0.98	0.339

¹ PM, pez en movimiento; AB, aperturas de la boca; IM, intentos de mordidas; B, bostezos; BIM, bostezos e intentos de mordidas; KTpre, concentración de 11-KT pre-experimental. El asterisco (*) representa la interacción entre las variables en el modelo. Las comparaciones se hicieron con base en el procedimiento de contrastes de tratamiento; esto es, cada término se compara contra el primer término que aparece en la tabla.

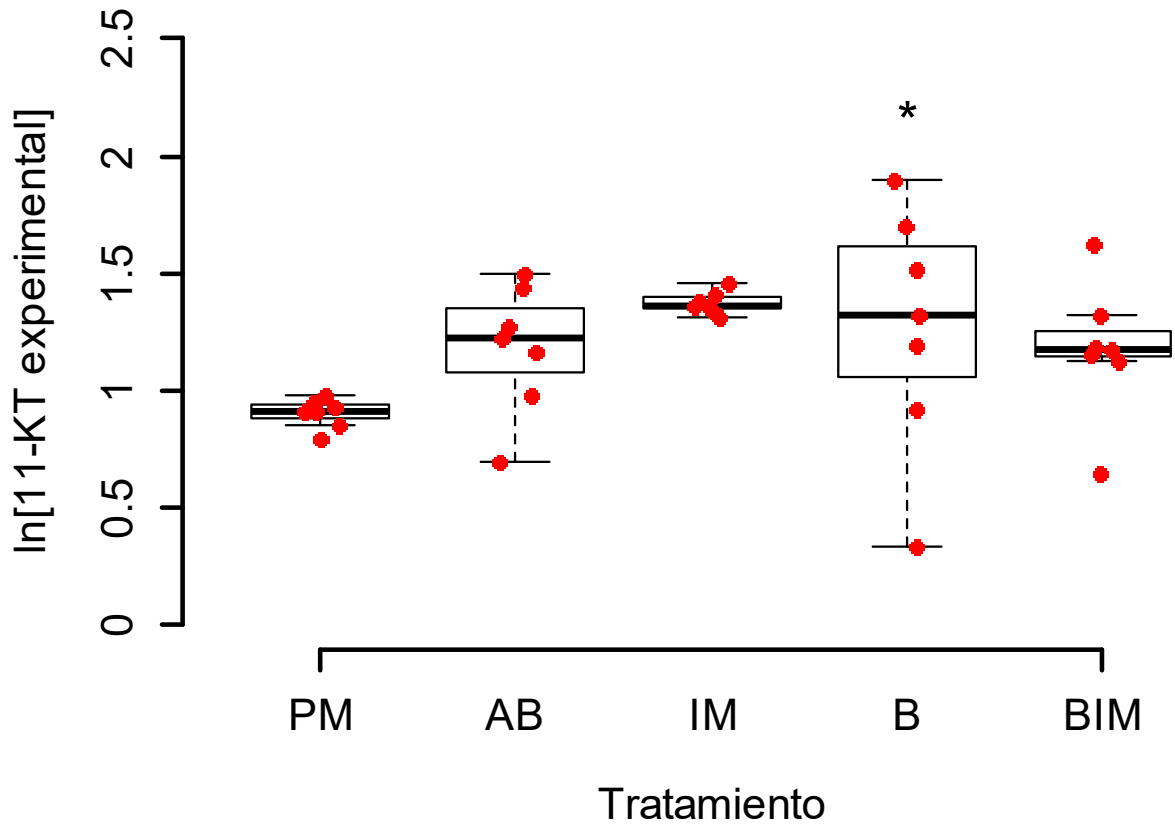


Figura 4.2. Gráfica de cajas del logaritmo de la concentración de 11-KT experimental respecto a cada uno de los cinco tratamientos: PM, pez en movimiento; AB, aperturas de la boca; IM, intentos de mordidas; B, bostezos; BIM, bostezos e intentos de mordidas. La línea sólida dentro de las cajas corresponde a la mediana, los bordes inferior y superior de la caja corresponden al primer y tercer cuartil respectivamente; los bigotes se extienden ± 1.5 veces el rango intercuartil (i.e, el valor del tercer cuartil menos el valor del primer cuartil). El promedio de la concentración de 11-KT experimental de los peces que vieron el videoestímulo de bostezos es significativamente mayor que el de los peces que vieron el videoestímulo de movimiento. Como se estila frecuentemente en la química, la concentración está indicada con corchetes.

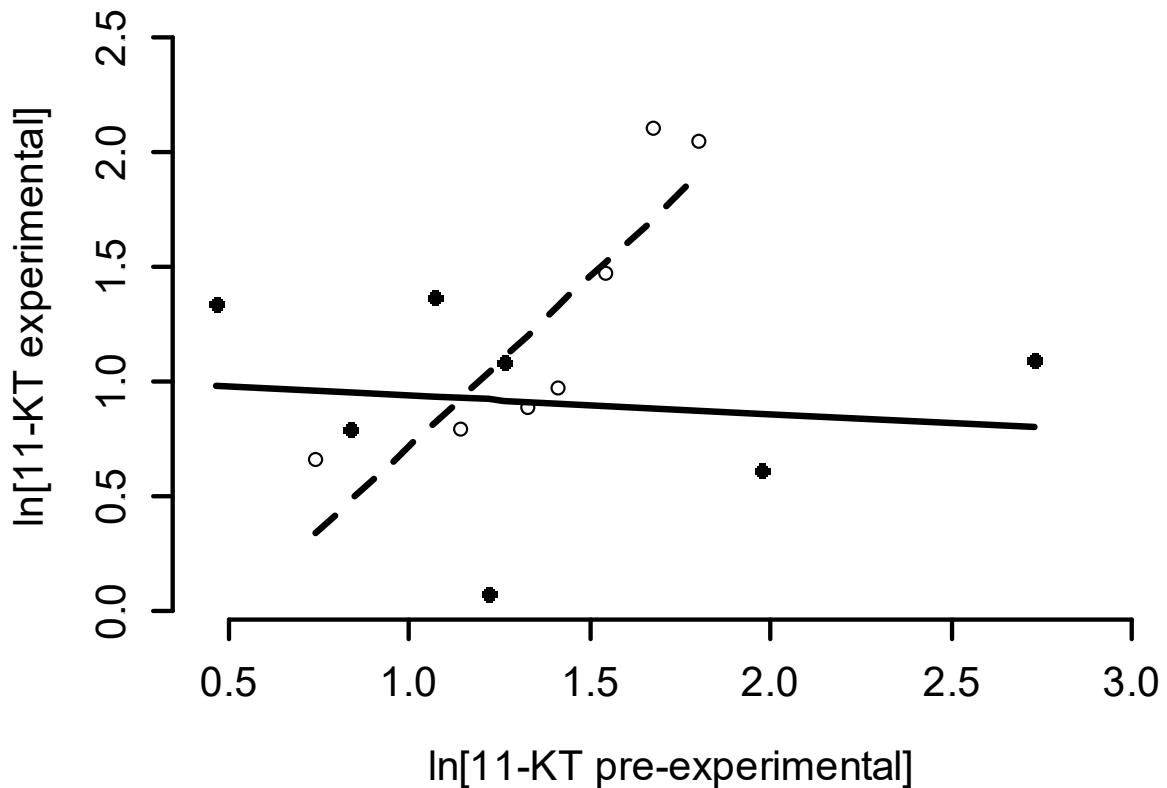


Figura 4.3. Gráfica que muestra la relación entre la 11-KT experimental y la pre-experimental para 2 tratamientos: 1) Pez en movimiento (línea sólida) y 2) Bostezos (línea punteada). Lo que se aprecia en la figura es que las 2 pendientes difieren entre sí, apreciación que el análisis estadístico confirma.

4.3.2. Análisis del efecto de las variables de predicción en los niveles del cortisol experimental

Apliqué a los datos un GLMM para evaluar la contribución de las variables de predicción a la variación en la respuesta (i.e., la concentración de cortisol experimental). El modelo mínimo adecuado que resultó de la simplificación posee 15 términos: 5 términos correspondientes a los tratamientos, 1 a la concentración de cortisol pre-experimental, 1 a

la capacidad fisiológica, 4 a la interacción de los tratamientos con la concentración de cortisol pre-experimental y 4 más a la interacción entre los tratamientos y la capacidad fisiológica (Tabla 4.3).

Dos interacciones contribuyeron significativamente a la variación medida en la variable respuesta: la interacción entre el tratamiento y la capacidad fisiológica ($\chi^2 = 16.89$, g.l. = 4, $P = 0.002$) y la interacción entre el tratamiento y la concentración de cortisol pre-experimental ($\chi^2 = 14.20$, g.l. = 4, $P = 0.007$). Respecto del efecto del tratamiento, la respuesta promedio de los peces a los videoestímulos de intento de mordidas (2.82 ± 0.11 , $n = 7$) aumentó significativamente ($t = 2.96$, g.l. = 17, $P = 0.009$) en relación a la respuesta promedio de los peces que vieron el videoestímulo de pez en movimiento (2.61 ± 0.11 , $n = 7$; Figura 4.4). La concentración de cortisol pre-experimental contribuyó significativamente a explicar la variación medida en la concentración de cortisol experimental ($t = 5.62$, g.l. = 17, $P < 0.001$; Figura 4.5); la asociación positiva que ilustra la gráfica aplica para todos los tratamientos excepto los intento de mordidas, cuya interacción con la concentración de cortisol pre-experimental fue significativa ($t = -2.65$, g.l. = 17, $P = 0.017$). Dicha interacción sugiere que el cortisol experimental aumentó lentamente con el cortisol pre-experimental (Figura 4.6). Finalmente, el efecto significativo de la interacción del tratamiento con la capacidad fisiológica ocurrió en los peces que vieron el videoestímulo de bostezos e intentos de mordidas ($t = 2.81$, g.l. = 17, $P = 0.012$). Como ilustra la Figura 4.7 el efecto de la concentración pre-experimental de cortisol en la concentración experimental depende del tratamiento; crece más rápido con la capacidad fisiológica en los peces que vieron los videoestímulos de bostezo e intentos

de mordida que en los que vieron los otros videoestímulos, incluido el de pez en movimiento.

Tabla 4.3. Resumen estadístico del modelo mínimo adecuado para los datos del efecto de las variables de predicción en la concentración de cortisol experimental.

Efectos aleatorios	Varianza				
Bloque	0.01				
Residual	0.08				
Efectos fijos	Coefficiente	Error estándar	g.l.	Valor t	Valor P
PM ¹	-0.91	0.72	17	-1.27	0.223
AB	-1.76	1.87	17	-0.94	0.360
IM	3.13	1.06	17	2.97	0.009
B	1.39	1.34	17	1.04	0.312
BIM	-0.09	1.46	17	-0.06	0.951
Cpre	1.41	0.25	17	5.62	<0.001
CF	-0.58	0.78	17	-0.75	0.465
AB*Cpre	0.39	0.60	17	0.65	0.526
IM*Cpre	-0.94	0.35	17	-2.65	0.017
B*Cpre	-0.56	0.43	17	-1.29	0.216
BIM*Cpre	-0.74	0.43	17	-1.71	0.106
AB*CF	1.16	1.14	17	1.01	0.325
IM*CF	-0.69	1.04	17	-0.66	0.516
B*CF	0.39	1.06	17	0.37	0.720
BIM*CF	3.80	1.35	17	2.81	0.012

¹PM, pez en movimiento; AB, aperturas de la boca; IM, intentos de mordidas; B, bostezos; BIM, bostezos e intentos de mordidas; Cpre, concentración de cortisol pre-experimental; CF, capacidad fisiológica. El asterisco (*) representa la interacción entre las variables en el modelo. Las comparaciones se hicieron con base en el procedimiento de contrastes de tratamiento.

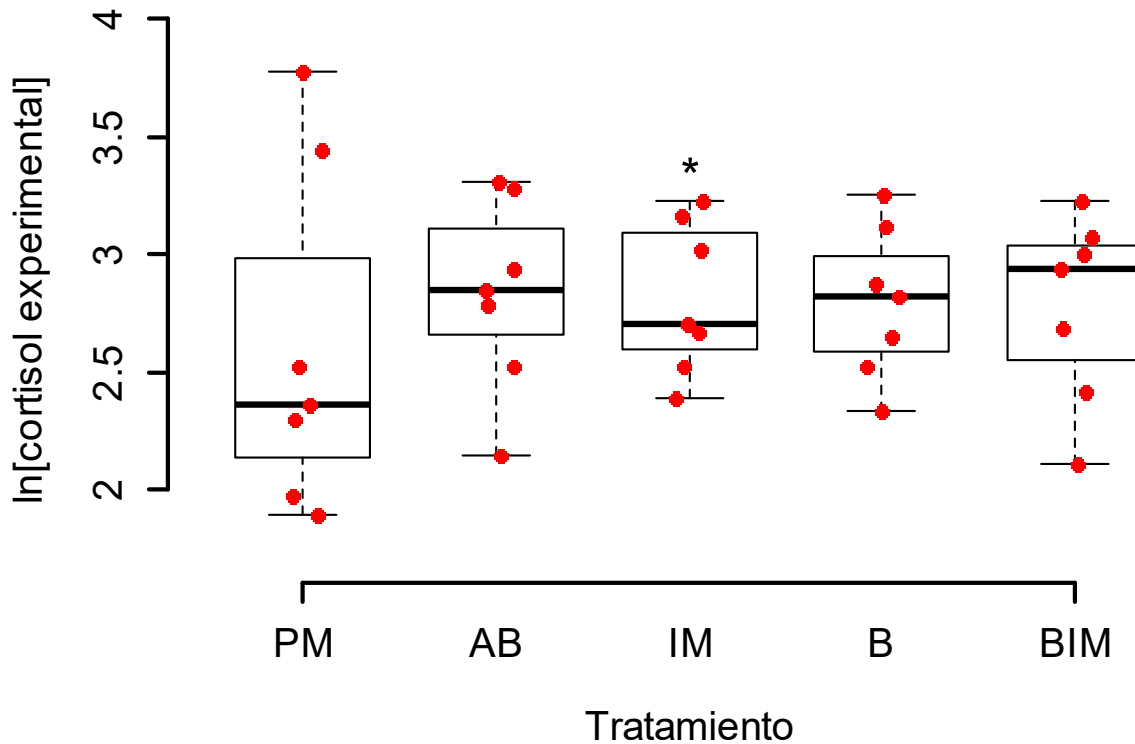


Figura 4.4. El logaritmo de la concentración de cortisol experimental respecto a cada uno de los cinco tratamientos. Las abreviaturas empleadas y el tipo de gráfica están explicadas al pie de la Figura 4.2. El promedio de la concentración de cortisol medida en los peces que vieron el videoestímulo de intentos de mordida fue significativamente mayor que el promedio en los peces que vieron el videoestímulo de movimiento de pez.

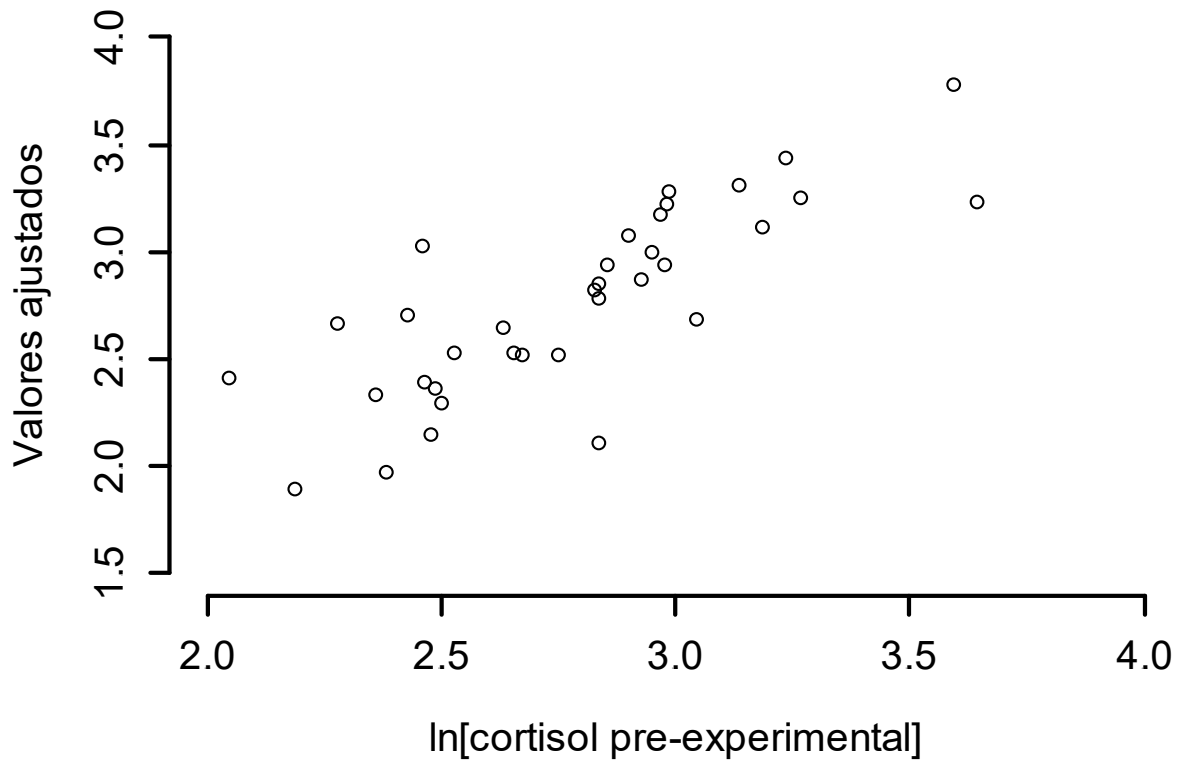


Figura 4.5. Gráfica que muestra la dependencia de la concentración de cortisol experimental (ajustada a los valores que predice el modelo estadístico) con la concentración de cortisol pre-experimental. Se aprecia que hay una relación positiva entre ambas variables.

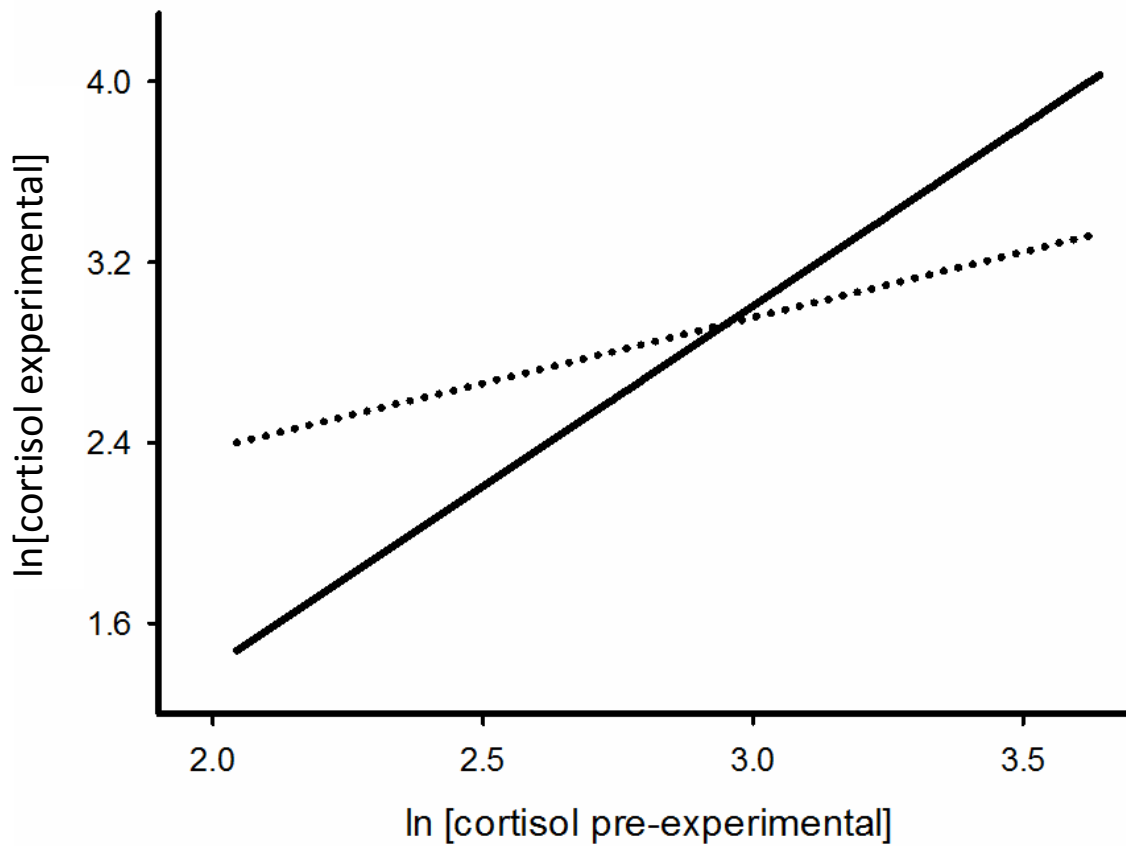


Figura 4.6. Gráfica que muestra la relación entre las concentraciones de cortisol experimental y pre-experimental para dos tratamientos: 1) Pez en movimiento (línea sólida) y 2) Intentos de mordidas (línea punteada). Lo que se aprecia en la figura es que las 2 pendientes difieren entre sí, observación que el análisis estadístico confirmó.

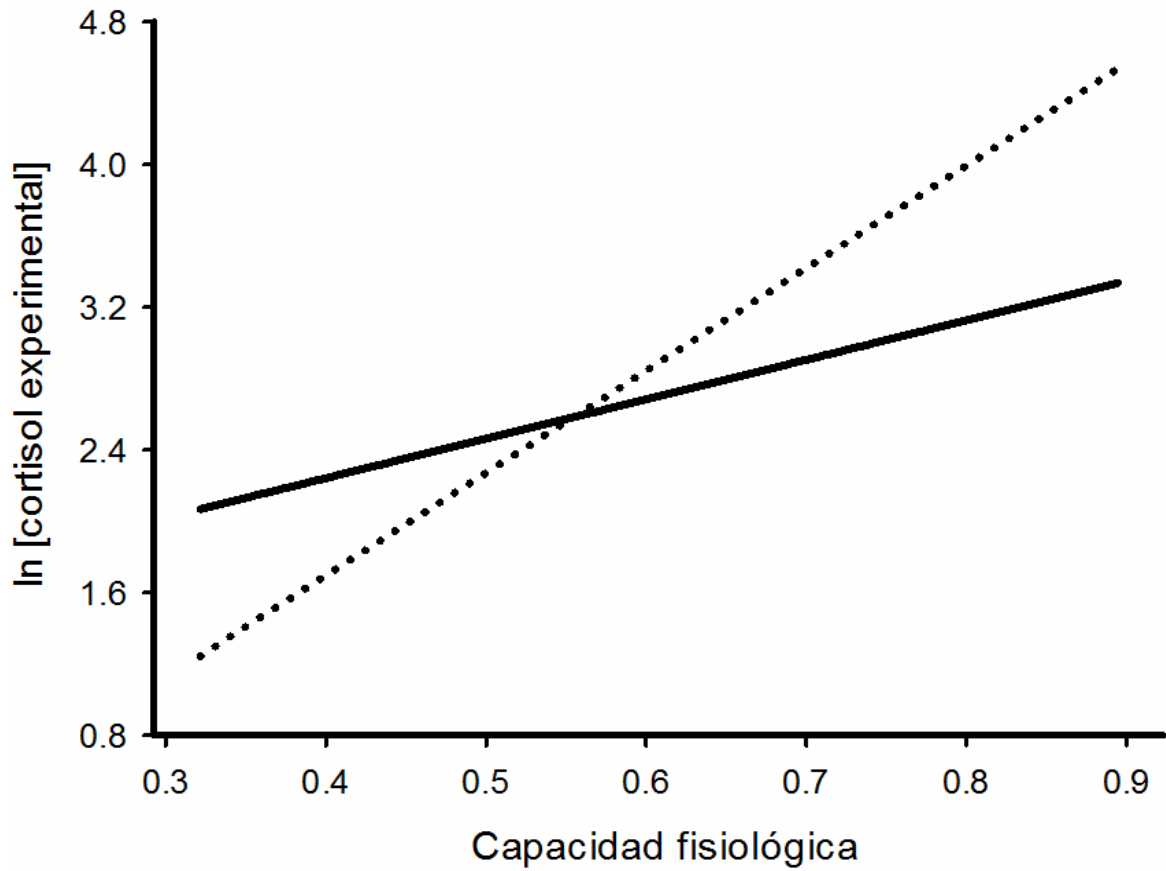


Figura 4.7. Gráfica que muestra la relación entre las concentraciones de cortisol experimental y la capacidad fisiológica para dos tratamientos: 1) Pez en movimiento (línea sólida) y 2) Bostezos e intentos de mordidas (línea punteada). Lo que se aprecia en la figura es que el efecto de la capacidad fisiológica en los niveles de cortisol depende del tratamiento ya que las 2 pendientes difieren entre sí.

4.4. Resultados del efecto de los tratamientos en el comportamiento de los peces

Hice tres análisis estadísticos independientes, uno para cada comportamiento de interés: las entradas al área en sombra, los bostezos y los desplantes durante el ensayo experimental. Primero apliqué una prueba Shapiro-Wilk a los datos para ver que éstos siguieran una distribución normal (Tabla 4.4); sólo las entradas al área en sombra cumplieron el criterio de normalidad ($P > 0.05$). Para los otros dos comportamientos apliqué el análisis estadístico asumiendo la distribución que mejor se ajustó a los datos (ver más adelante). Luego analicé los datos como describí en la sección de análisis estadístico, y la simplificación de los modelos y justificación del modelo mínimo adecuado se presentan en el Anexo, Tablas A5-A9 y Figuras A3-A4. A continuación describo los resultados obtenidos.

Tabla 4.4. Resumen de los resultados de la prueba Shapiro-Wilk para los resultados de comportamiento.

Comportamiento	W¹	P
Sombras	0.97	0.217
Bostezos	0.62	<0.001
Desplantes	0.55	<0.001

¹ Se refiere al estadístico de la prueba.

4.4.1. Análisis del efecto de las variables de predicción en la frecuencia de entradas al área en sombra

La cantidad observada de entradas al área en sombra siguió una distribución normal, por lo que apliqué un GLMM a los datos. El modelo mínimo adecuado posee 10 términos: 5 términos correspondientes a los tratamientos, un término a la capacidad fisiológica y 4 términos a la interacción entre los tratamientos y la capacidad fisiológica (Tabla 4.5).

El análisis estadístico que realicé indica que el tratamiento contribuyó significativamente a la variación observada en el número de entradas al área sombreada ($\chi^2 = 17.39$, g.l. = 5, $P = 0.004$). Dicho efecto significativo se debió a que el promedio de entradas al área sombreada por los peces que vieron el videoestímulo de aperturas de la boca (0.77 ± 0.06 , $n = 12$) fue significativamente menor ($t = -2.29$, g.l. = 12, $P = 0.041$) que el promedio que tuvieron los peces que vieron los videoestímulos de movimiento del pez (0.82 ± 0.06 , $n = 12$; Figura 4.8). También fue significativa la interacción entre la capacidad fisiológica y el tratamiento ($\chi^2 = 16.39$, g.l. = 4, $P = 0.002$). Tal efecto significativo ocurrió para el tratamiento de aperturas de la boca ($t = 2.23$, g.l. = 12, $P = 0.045$; Figura 4.9) e indica que el efecto de la capacidad fisiológica en las entradas al área en sombra depende del tratamiento; las aperturas de la boca se incrementaron (Figura 4.9), mientras que los otros tratamientos, incluido el de pez en movimiento, mostraron un decremento ligero de la respuesta.

Tabla 4.5. Resumen estadístico del modelo mínimo adecuado para los datos del efecto de las variables de predicción en la frecuencia de entradas al área en sombra.

Efectos aleatorios	Varianza				
Bloque	0.05				
Residual	0.04				
Efectos fijos	Coefficiente	Error estándar	g.l.	Valor t	Valor P
PM ¹	0.86	0.10	12	8.68	<0.001
AB	-0.29	0.13	12	-2.29	0.041
IM	0.02	0.12	12	0.13	0.896
B	-0.00	0.11	12	-0.01	0.991
BIM	0.11	0.11	12	1.04	0.321
CF	-0.29	0.34	12	-0.86	0.406
AB*CF	1.00	0.45	12	2.23	0.045
IM*CF	0.21	0.51	12	0.41	0.692
B*CF	-0.49	0.48	12	-1.03	0.325
BIM*CF	-0.28	0.45	12	-0.63	0.544

¹PM, pez en movimiento; AB, aperturas de la boca; IM, intentos de mordidas; B, bostezos; BIM, bostezos e intentos de mordidas; CF, capacidad fisiológica. El asterisco (*) representa la interacción entre las variables en el modelo. Las comparaciones se hicieron con base en el procedimiento de contrastes de tratamiento.

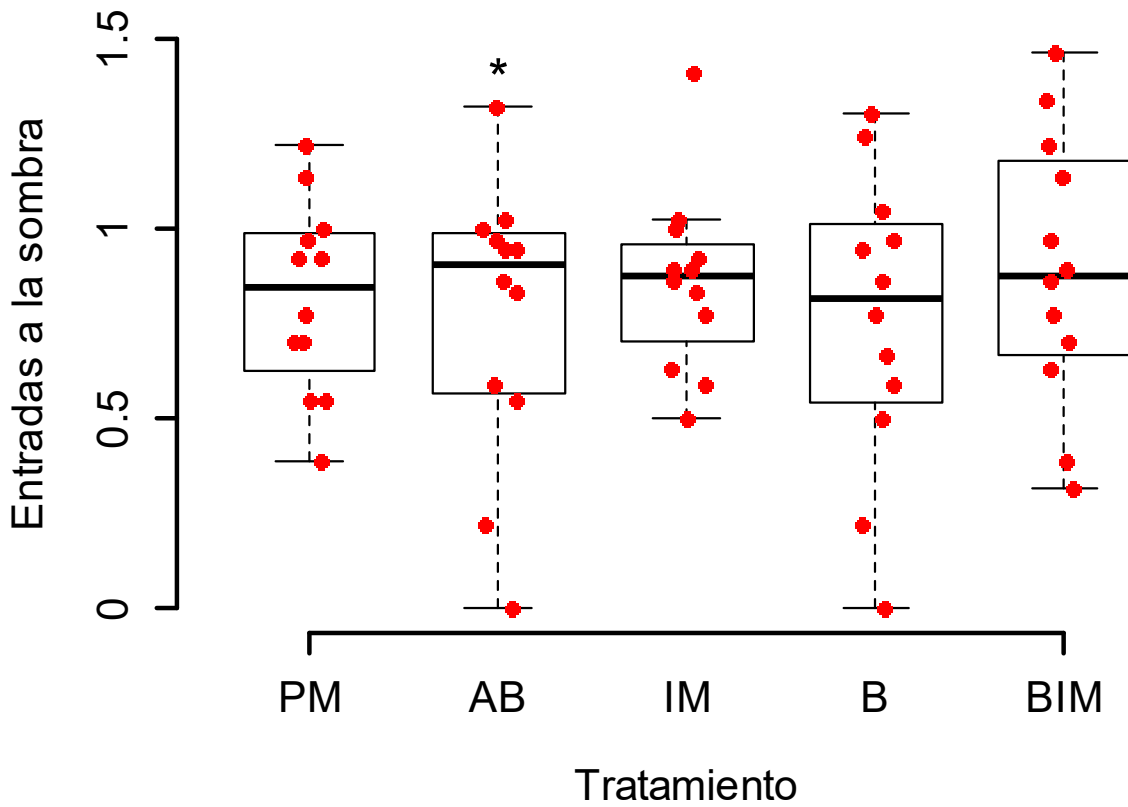


Figura 4.8. Frecuencia de entradas al área en sombra respecto a cada uno de los cinco tratamientos. Las abreviaturas empleadas y el tipo de gráfica están explicadas al pie de la Figura 4.2. El promedio del tratamiento de aperturas de la boca es significativamente menor que el tratamiento de pez en movimiento.

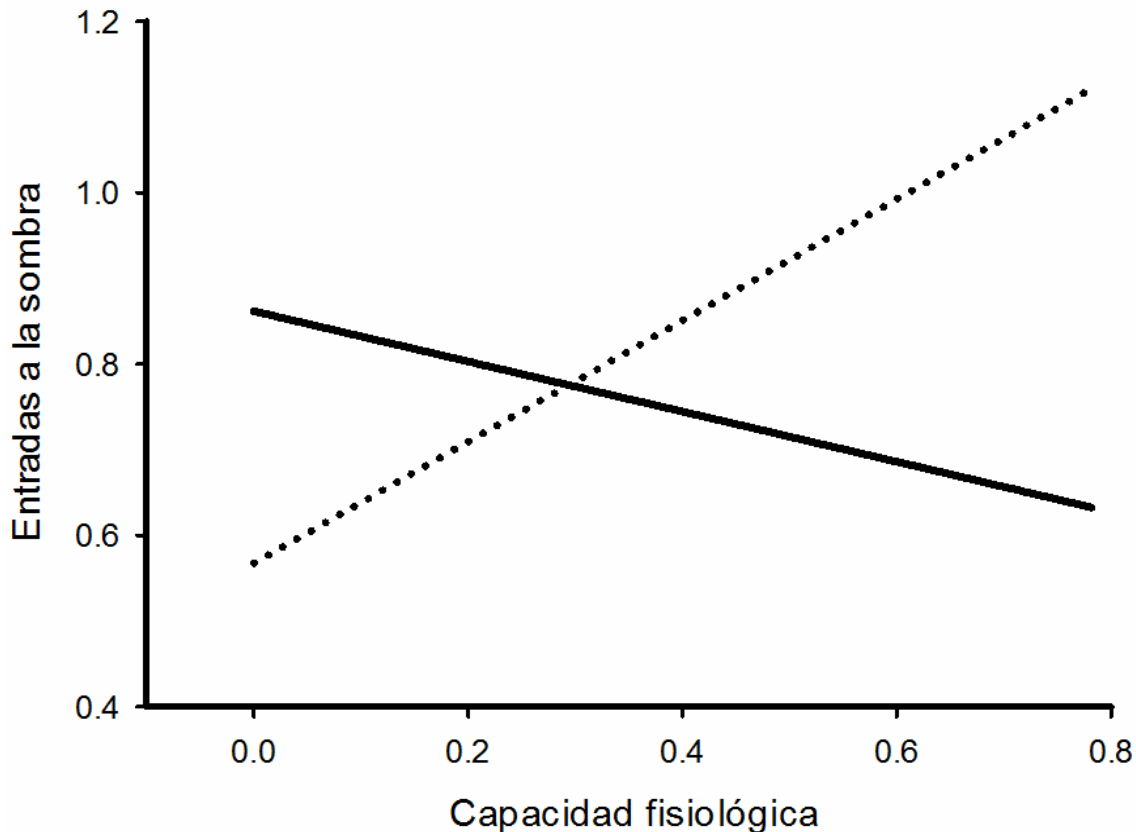


Figura 4.9. Gráfica que muestra la relación entre la frecuencia de entradas al área en sombra y la capacidad fisiológica para dos tratamientos: 1) Pez en movimiento (línea sólida) y 2) Aperturas de la boca (línea punteada). Lo que se aprecia en la figura es que las 2 pendientes difieren entre sí.

4.4.2. Análisis del efecto de las variables de predicción en la frecuencia de bostezos

La frecuencia de bostezos observada se aproximó a una distribución Poisson, así que apliqué un modelo lineal generalizado mixto (GLMMs) a los datos asumiendo una distribución de este tipo. Con la simplificación del modelo removí todas las variables de efecto fijo, pues ninguna de ellas aportó una explicación significativa a la variación observada. El tamaño corporal ($\chi^2 = 0.04$, g.l. = 1, $P = 0.843$), como la capacidad fisiológica

($\chi^2 = 0.42$, g.l. = 1, $P = 0.518$), el tratamiento ($\chi^2 = 3.37$, g.l. = 4, $P = 0.498$) y la interacción entre el tratamiento y la capacidad fisiológica ($\chi^2 = 6.77$, g.l. = 4, $P = 0.148$) no tuvieron un efecto que fuera significativo bajo las condiciones que usé en los ensayos.

4.4.3. Análisis del efecto de las variables de predicción en la frecuencia de desplantes

Puesto que las aperturas del opérculo y las mordidas pueden considerarse como comportamientos del mismo sistema motivacional (i.e. la agresión) decidí combinarlas en una sola medida que llamé desplantes. Con este fin agrupé y normalicé los datos (promedio = 0 y desviación estándar = 1) y luego los elevé al cuadrado. Como 2 datos de los desplantes se encontraban a más de 1.5 veces el rango intercuartilar (i.e. lejos de donde se encuentra el 95 % de los datos) los removí del análisis estadístico (Figura 4.10). La frecuencia de desplantes se aproximó a una distribución gamma, así que apliqué un GLMMs asumiendo una distribución de este tipo. El modelo mínimo adecuado incluyó 10 términos: 5 términos correspondientes a los tratamientos, un término a la capacidad fisiológica y 4 términos a la interacción entre los tratamientos y la capacidad fisiológica (Tabla 4.6).

El tratamiento tuvo un efecto significativo en el número de desplantes ($\chi^2 = 33.2$, g.l. = 8, $P < 0.001$) pero los promedios de los desplantes observados en los peces que vieron los videoestímulos no fueron distintos de los desplantes de los peces que vieron al pez en movimiento, aunque no analicé si existían diferencias entre otros pares de

tratamientos (Figura 4.11). La capacidad fisiológica también tuvo una contribución significativa a la explicación de la variación en el número de desplantes ($z = -8.36$, g.l. = 12, $P < 0.001$; Figura 4.12). La interacción entre el tratamiento y la capacidad fisiológica fue significativa ($\chi^2 = 29.11$, g.l. = 4, $P < 0.001$); lo fue para los peces que vieron los videoestímulos de aperturas de la boca ($z = 6.03$, g.l. = 12, $P < 0.001$), intentos de mordidas ($z = 7.39$, g.l. = 12, $P < 0.001$) y bostezos ($z = 7.36$, g.l. = 12, $P < 0.001$; Figura 4.13). Dichas interacciones sugieren que el efecto de la capacidad fisiológica en el número de desplantes depende del tratamiento, y en general puede decirse que cuando los valores de la capacidad fisiológica son grandes, los tratamientos difieren más en sus efectos. El tamaño corporal de los peces no tuvo contribución importante en la variación del número de desplantes ($\chi^2 = 0.19$, g.l. = 1, $P = 0.662$).

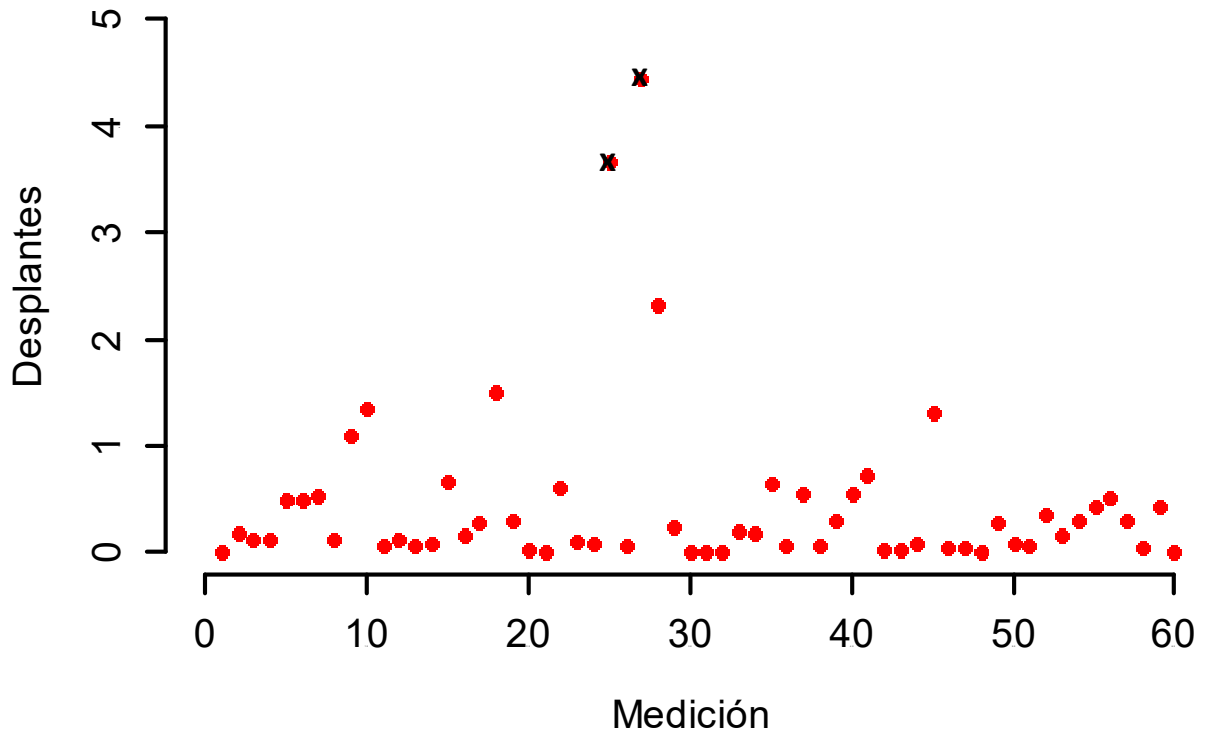


Figura 4.10. Número de desplantes observados en 60 peces. Los dos puntos marcados con una “x” superan 1.5 veces el rango intercuartil, por lo que fueron considerados valores inusuales y removidos del análisis estadístico.

Tabla 4.6. Resumen estadístico del modelo mínimo adecuado para los datos del efecto de las variables de predicción en la frecuencia de desplantes.

Efectos aleatorios		Varianza				
Bloque		4.65x10 ⁻⁶				
Residual		0.02				
Efectos fijos	Coefficiente	Error estándar	g.l.	Valor z	Valor P	
PM ¹	-1.09	0.37	12	-2.95	0.003	
AB	-0.09	0.60	12	-0.15	0.879	
IM	-0.27	0.52	12	-0.51	0.609	
B	-0.46	0.50	12	-0.91	0.361	
BIM	0.88	0.55	12	1.60	0.109	
CF	-12.79	1.53	12	-8.36	< 0.001	
AB*CF	12.36	2.05	12	6.03	< 0.001	
IM*CF	14.67	1.99	12	7.39	< 0.001	
B*CF	14.46	1.97	12	7.36	< 0.001	
BIM*CF	3.92	3.41	12	1.15	0.251	

¹PM, pez en movimiento; AB, aperturas de la boca; IM, intentos de mordidas; B, bostezos; BIM, bostezos e intentos de mordidas; CF, capacidad fisiológica. El asterisco (*) representa la interacción entre las variables en el modelo. Las comparaciones se hicieron con base en el procedimiento de contrastes de tratamiento.

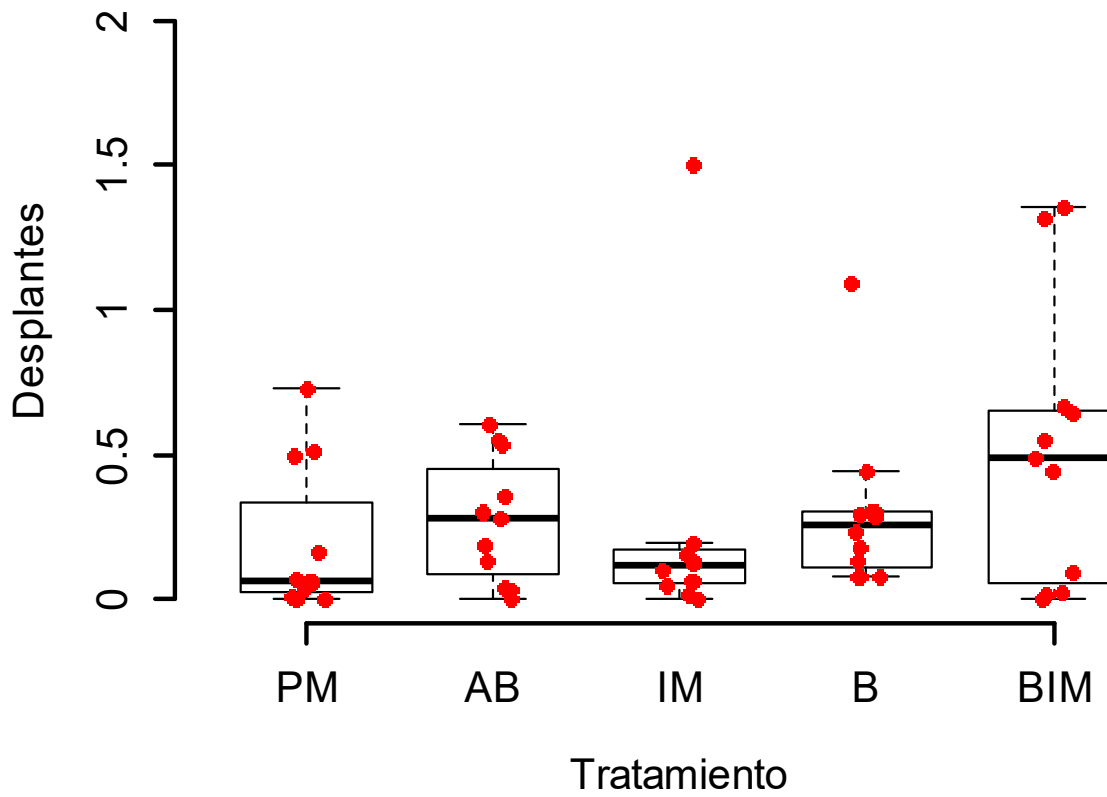


Figura 4.11. Número de desplantes observados en función de los cinco tratamientos. Las abreviaturas empleadas y el tipo de gráfica están explicadas al pie de la Figura 4.2. Ninguno de los promedios fue significativamente mayor que el promedio del tratamiento del pez en movimiento.

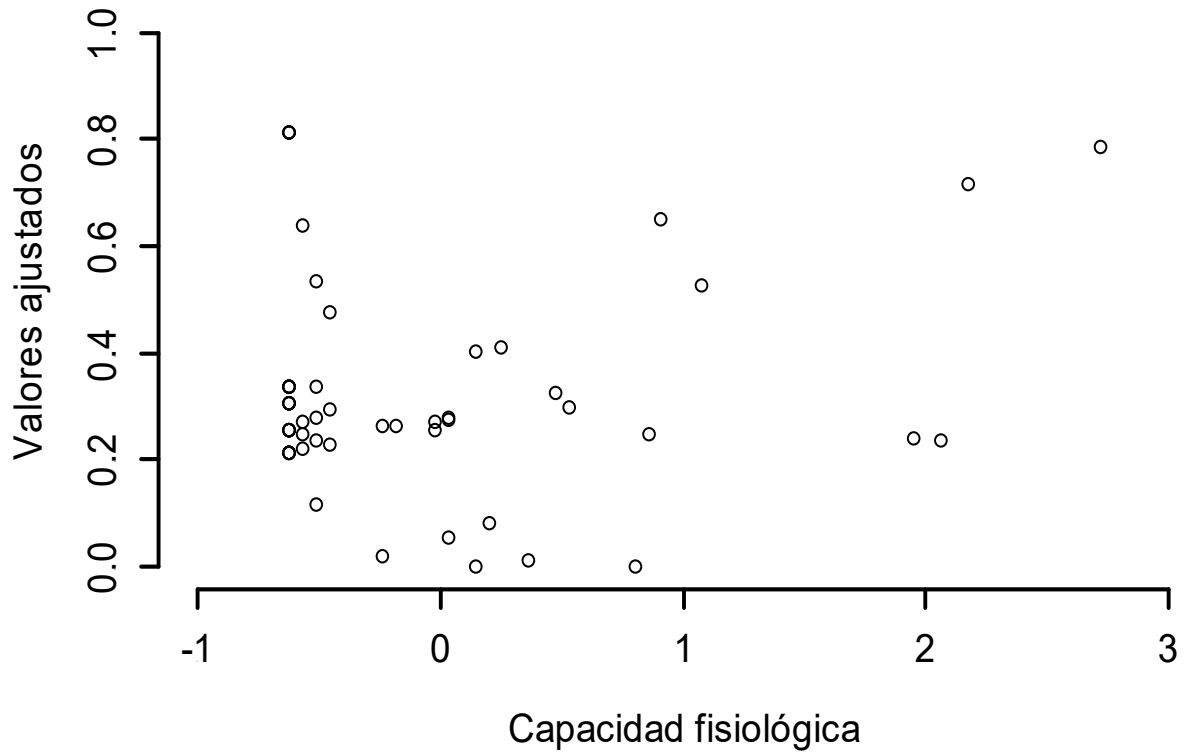


Figura 4.12. Gráfica que ilustra la relación encontrada entre la frecuencia de desplantes (expresada como los valores ajustados por el modelo) y la capacidad fisiológica de los peces experimentales.

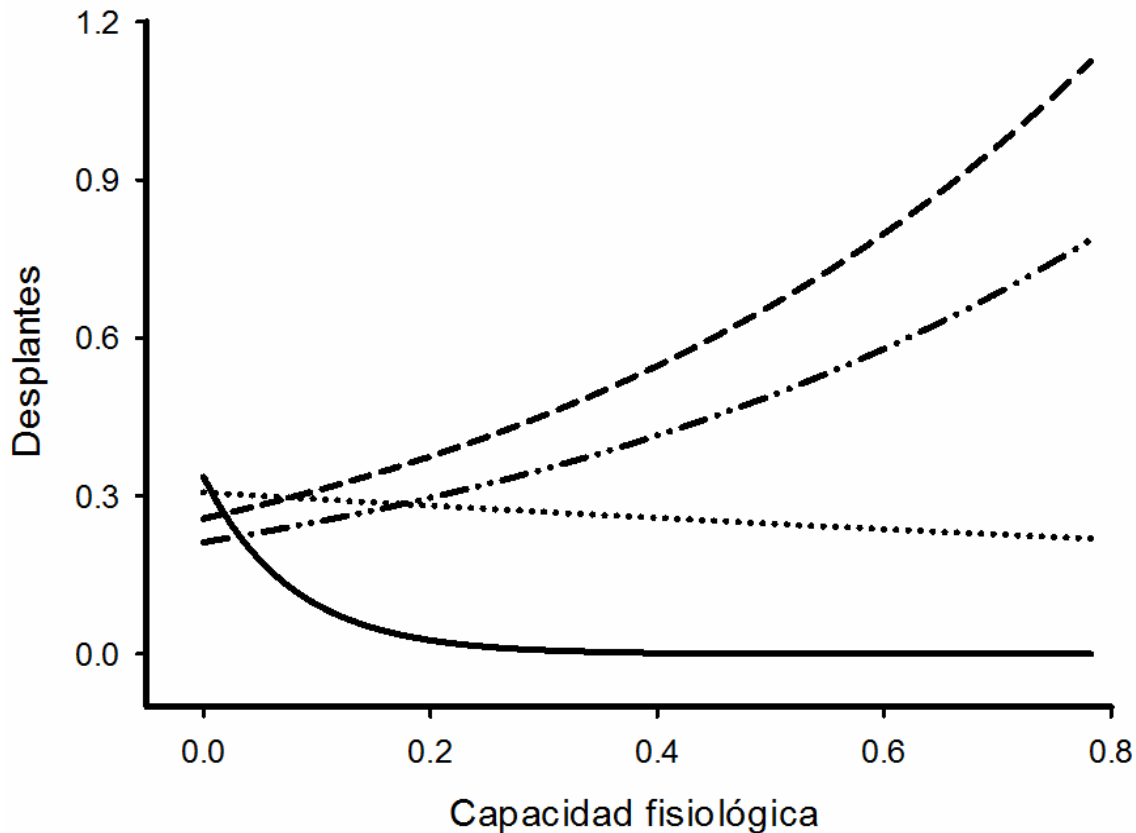


Figura 4.13. Gráfica que muestra la relación entre la frecuencia de los desplantes y la capacidad fisiológica para cuatro tratamientos: 1) Pez en movimiento (línea sólida), 2) Aperturas de la boca (línea punteada), 3) Intentos de mordidas (guiones) y 4) Bostezos (guiones y puntos). El análisis estadístico comparó las pendientes de los tratamientos respecto de la pendiente del tratamiento del pez en movimiento y encontró que son distintas de ésta.

4.5. Resultados del efecto conjunto de esteroides y comportamiento

Medí las concentraciones de 11-KT y cortisol a 35 peces agrupados en 7 bloques, así como las pautas de comportamiento descritas arriba. Expresé las concentraciones de ambos esteroides como su proporción, es decir la concentración experimental entre la suma de las concentraciones experimental y pre-experimental. Luego analicé los datos como describí en la sección de análisis estadístico, y la simplificación de los modelos y

justificación del modelo mínimo adecuado se presentan en el Anexo, Tablas A10-A14, y Figuras A5-A6. A continuación presento los resultados obtenidos.

4.5.1. Análisis estadístico de la relación entre capacidad fisiológica y

11-KT

Para poner a prueba la predicción de que la capacidad fisiológica está sustentada en los niveles de 11-KT, procedí como sigue. Puesto que el tamaño corporal del pez (identificado por la longitud estándar) puede estar relacionado con la producción de esteroides, removí su efecto mediante una regresión lineal del logaritmo de la concentración de 11-KT pre-experimental en la longitud estándar. Los residuales de esta regresión representan la cantidad de variación en los niveles de 11-KT que no puede ser explicada por el tamaño corporal del pez. Realicé el mismo procedimiento estadístico para las aperturas del opérculo y la longitud estándar; en este caso los residuales representan la variación en el número de aperturas del opérculo que la longitud estándar no puede explicar. Calculé la regresión lineal entre los residuales de la 11-KT y las aperturas del opérculo y encontré una relación significativa entre ambos ($t = 2.05$, g.l. = 33, $P = 0.048$). Puesto que uno de los datos de esta regresión se ubicaba a más de 1.5 veces el rango intercuartilar, lo consideré un valor inusual. Removí dicho valor y volví a calcular la regresión lineal, obteniendo un resultado más significativo ($t = 2.208$, g.l. = 32, $P = 0.035$), el mismo sugiere que en efecto la capacidad fisiológica, medida aquí como aperturas del opérculo, depende de la 11-KT (Figura 4.14).

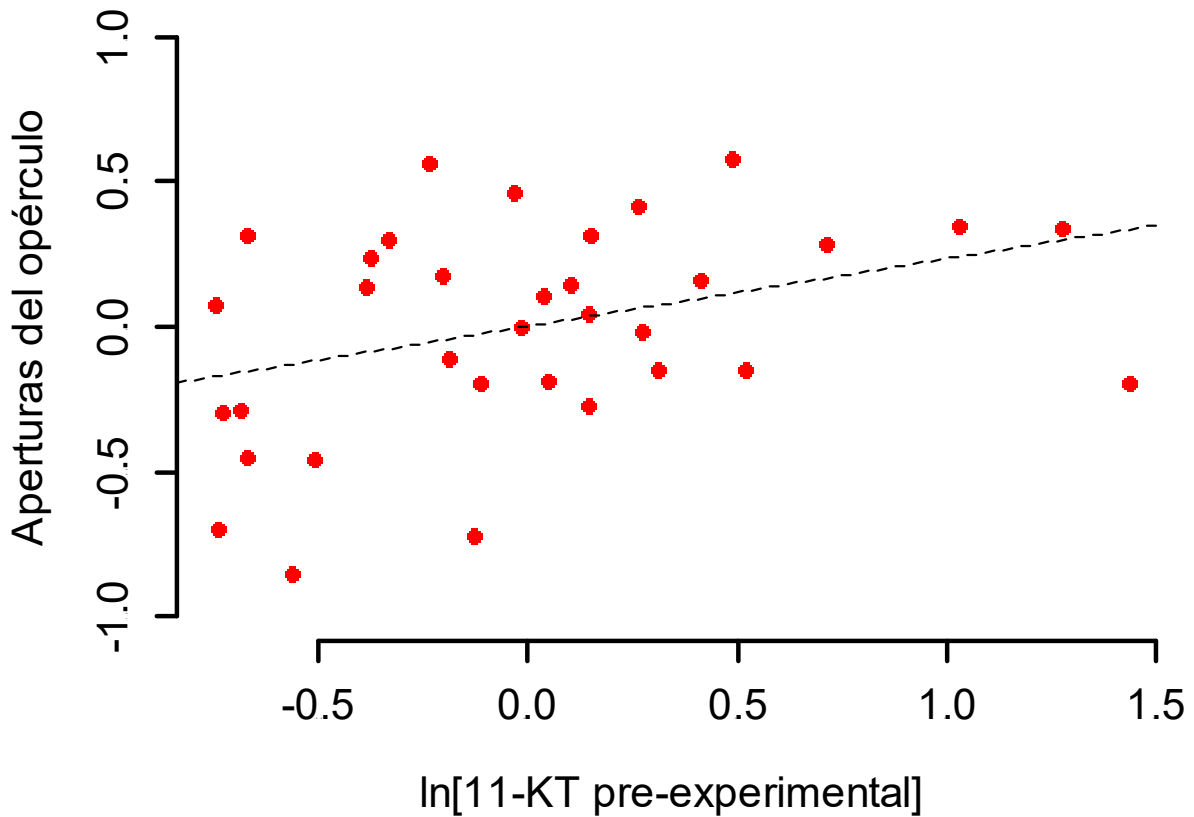


Figura 4.14. Gráfica que muestra el resultado de la regresión lineal de los residuales de las aperturas del opérculo (la cantidad de aperturas que no es explicada por el tamaño corporal del pez) en los residuales de la 11-KT (la concentración de 11-KT pre-experimental que no es explicada por el tamaño del pez). Cada círculo representa al número de aperturas del opérculo de cada uno de los 35 peces para niveles específicos de 11-KT. La línea punteada representa el mejor ajuste de acuerdo con un modelo de regresión lineal.

4.5.2. Análisis estadístico de la relación entre bostezo y la capacidad fisiológica

Analicé si el bostezo dependía de la capacidad fisiológica, usando como medida de la capacidad fisiológica a los residuales del ajuste del modelo estadístico descrito en la sección 4.5.1. Removí un valor inusual antes del análisis estadístico, pues se encontraba a más de 1.5 veces el rango intercuartilar. Luego apliqué una regresión Poisson a la frecuencia observada de bostezos contra los residuales de la capacidad fisiológica y encontré una dependencia significativa del primero en los segundos ($z = 2.11$, g.l. = 32, $P = 0.035$). Este resultado sugiere que en efecto el bostezo está relacionado con la capacidad fisiológica (Figura 4.15).

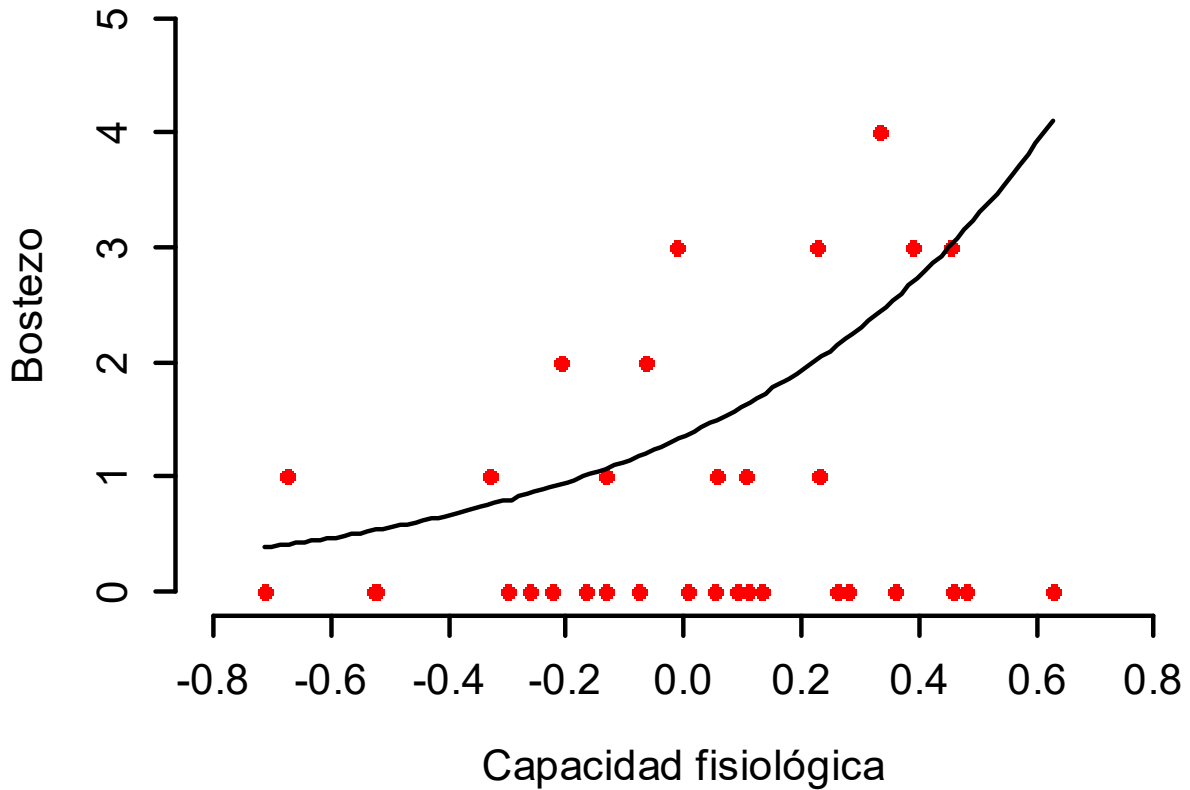


Figura 4.15. Gráfica que muestra la relación entre la frecuencia de bostezo y los residuales de la capacidad fisiológica.

4.5.3. Análisis del efecto de las variables de predicción en la frecuencia de entradas al área en sombra en función de la concentración de esteroides

El número de las entradas al área en sombra se ajustó a una distribución normal, por lo que apliqué un GLMM a los datos observados. El modelo mínimo adecuado incluyó 10 términos: 5 términos correspondientes a los tratamientos, 1 término a la proporción de 11-KT y 4 a la interacción del tratamiento con la proporción de 11-KT (Tabla 4.7).

El tratamiento tuvo un efecto significativo en la variación en el número de entradas al área en sombra ($\chi^2 = 18.68$, g.l.= 4, $P < 0.001$). Específicamente, el análisis estadístico indica que la respuesta promedio de los peces que vieron los videoestímulos de pez en movimiento (12.14 ± 2.53 , $n = 7$) fue menor que el promedio de los peces que vieron los videoestímulos de bostezos y mordidas (20.71 ± 2.53 , $n = 7$; $t = 2.65$, $P = 0.021$) y de los que vieron los videoestímulos de aperturas de la boca (16.43 ± 2.53 , $n = 7$; $t = -2.61$, $P = 0.023$) como lo muestra la Figura 4.16. También hallé un efecto significativo de la interacción entre la proporción de 11-KT y el tratamiento ($\chi^2 = 18.68$, g.l.= 4, $P < 0.001$); el efecto significativo de esta interacción se debió al tratamiento de aperturas de la boca ($t = 2.85$, g.l. = 12, $P = 0.015$) como ilustra la Figura 4.17. Dicho efecto sugiere que los peces que vieron el videoestímulo de pez en movimiento visitaron el área en sombra con una frecuencia relativamente igual, sin importar la proporción de 11-KT. En contraste, los peces que vieron el videoestímulo de aperturas de la boca aumentaron sus visitas al área en sombra tanto como aumentó la proporción de 11-KT.

Tabla 4.7. Resumen estadístico del modelo mínimo adecuado para los datos del efecto de las variables de predicción en la frecuencia de entradas al área en sombra.

Efectos aleatorios		Varianza			
Bloque		33.85			
Residual		44.80			
Efectos fijos	Coefficiente	Error estándar	g.l.	Valor t	Valor P
PM ¹	14.26	6.81	12	2.09	0.058
AB	-43.98	16.88	12	-2.61	0.023
IM	5.16	12.89	12	0.40	0.696
B	-15.16	18.63	12	-0.81	0.432
BIM	24.59	9.28	12	2.65	0.021
KTp	-5.25	14.71	12	-0.36	0.727
AB*KTp	92.02	32.33	12	2.85	0.015
IM*KTp	-4.91	24.46	12	-0.20	0.844
B*KTp	42.42	39.46	12	1.08	0.304
BIM*KTp	-35.02	19.95	12	-1.76	0.105

¹PM, pez en movimiento; AB, aperturas de la boca; IM, intentos de mordidas; B, bostezos; BIM, bostezos e intentos de mordidas; KTp, proporción de la concentración de 11-KT. El asterisco (*) representa la interacción entre las variables en el modelo. Las comparaciones se hicieron con base en el procedimiento de contrastes de tratamiento.

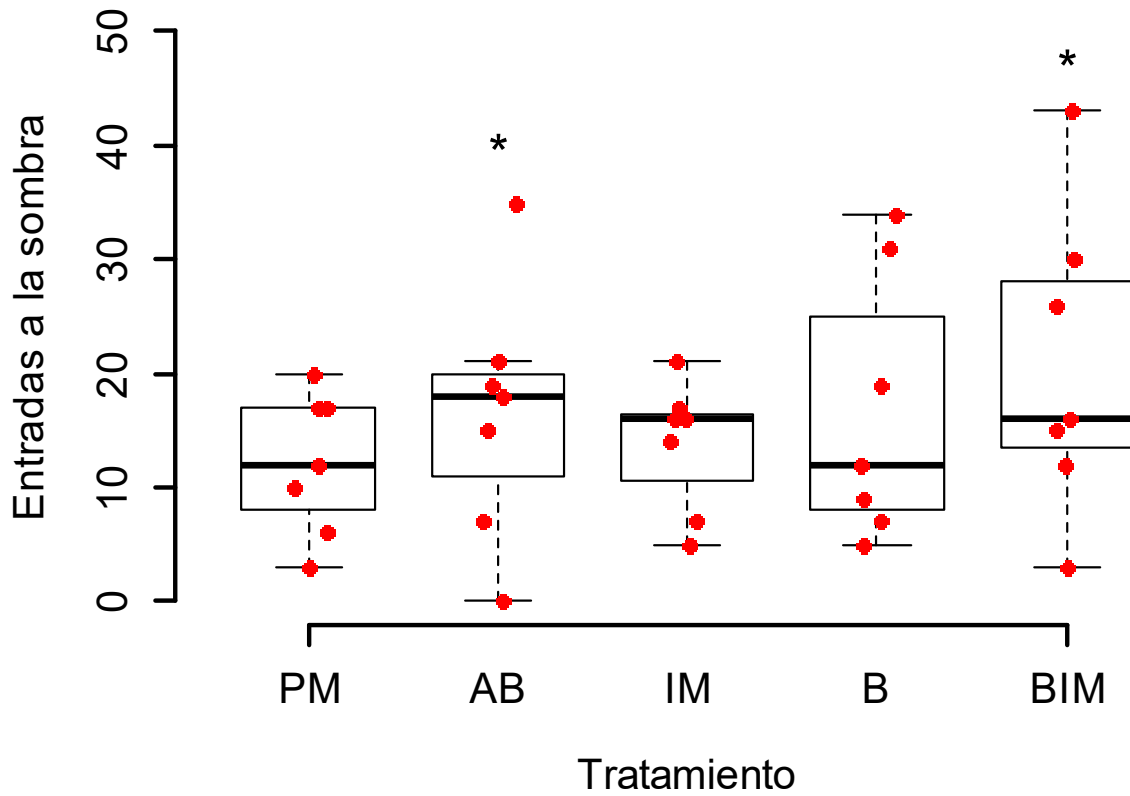


Figura 4.16. La gráfica muestra el número de entradas al área en sombra en función de los cinco tratamientos. Las abreviaturas empleadas y el tipo de gráfica están explicadas al pie de la Figura 4.2. Los tratamientos de aperturas de la boca (AB), y bostezos y mordidas (BIM) tuvieron promedios más grandes que el tratamiento de movimiento del pez.

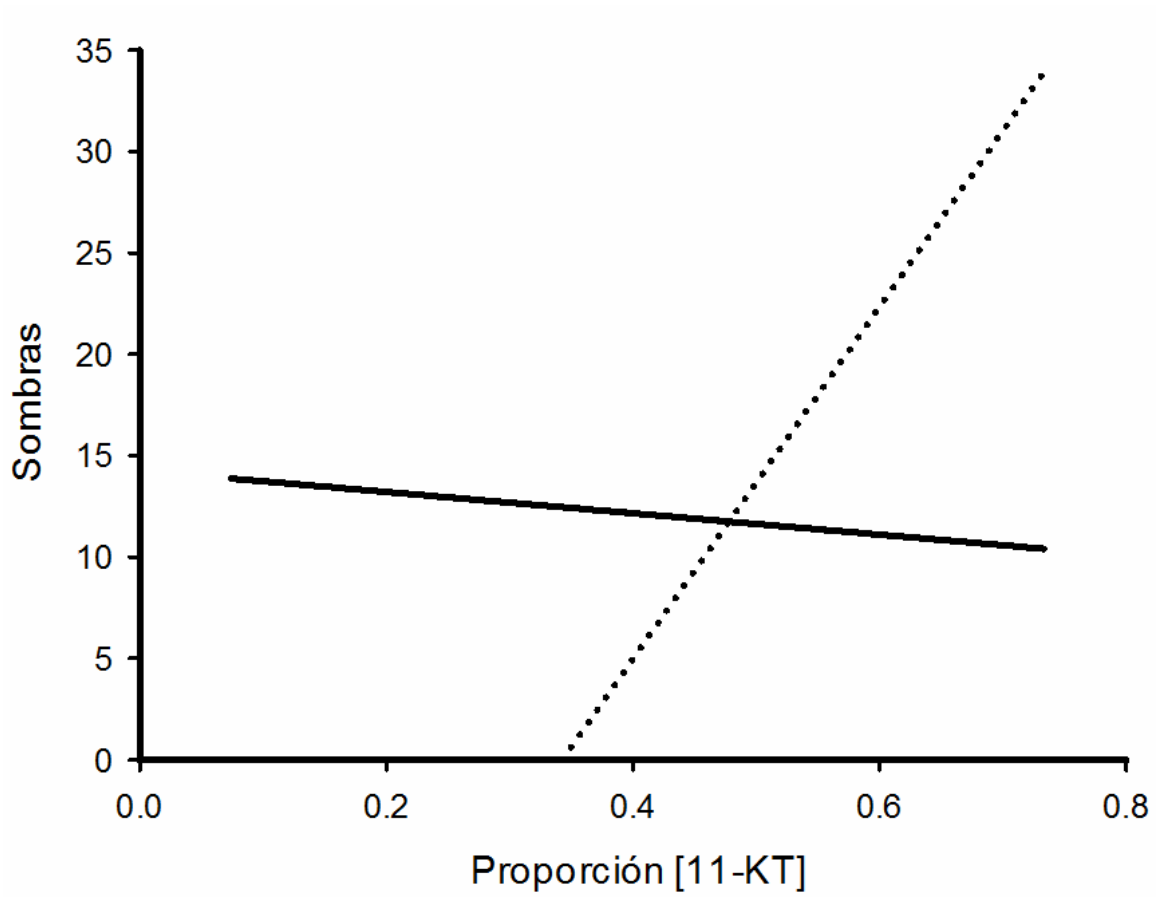


Figura 4.17. Gráfica que muestra la relación entre el número de entradas al área en sombra y la proporción de 11-KT para dos tratamientos: 1) Pez en movimiento (línea sólida), 2) Aperturas de la boca (línea punteada). Se puede ver que las pendientes que representan a los dos tratamientos son distintas una de la otra.

4.5.4. Análisis del efecto de las variables de predicción en la frecuencia de bostezos en función de la concentración de esteroides

Apliqué un GLMMs a los datos de frecuencia de bostezos porque asumí que seguían una distribución Poisson. El proceso de simplificación del modelo resultó en la eliminación de todos los términos ya que ninguno aportaba una explicación significativa a la variación en el número de bostezos; no fueron significativos el tratamiento ($\chi^2 = 4.30$, g.l. = 4, $P = 0.367$), la proporción de 11-KT ($\chi^2 = 0.05$, g.l. = 1, $P = 0.821$), ni la interacción entre ambos ($\chi^2 = 8.03$, g.l. = 4, $P = 0.091$).

4.5.5. Análisis del efecto de las variables de predicción en la frecuencia desplantes en función de la concentración de esteroides

Removí 3 valores inusuales como describí en la sección 4.4.3. Luego apliqué un GLMMs a los datos porque asumí que seguían una distribución Gamma y realicé el procedimiento de simplificación del modelo. El modelo mínimo adecuado incluyó 11 términos: 5 términos correspondieron a los tratamientos, 1 a la proporción de cortisol, 1 a la capacidad fisiológica y 4 a la interacción entre el tratamiento y la proporción de cortisol (Tabla 4.8).

El número de desplantes promedio de los peces que vieron los videoestímulos de aperturas de la boca (0.39 ± 0.15 , $n = 7$) y de los que vieron los videoestímulos de bostezos y mordidas (0.50 ± 0.15 , $n = 7$) aumentó significativamente ($t = 3.34$, $P < 0.001$ y $t = 4.31$, $P < 0.001$, respectivamente) en relación a la respuesta promedio de los peces que vieron los videoestímulos de pez en movimiento (0.13 ± 0.15 , $n = 7$). Por el contrario, el número promedio de desplantes de los peces que vieron los videoestímulos de intentos de mordidas (0.12 ± 0.15 , $n = 7$) y de los que vieron los videoestímulos de bostezos (0.11 ± 0.15 , $n = 7$) disminuyó significativamente respecto de la respuesta de los peces que vieron los videoestímulos de los peces en movimiento ($t = 3.63$, $P < 0.01$ y $t = 2.57$, $P = 0.010$ respectivamente; Figura 4.18). La capacidad fisiológica también tuvo un efecto significativo positivo en el número de desplantes ($t = 2.13$, g.l. = 13, $P = 0.033$; Figura 4.19), lo que sugiere la existencia de una relación causal entre ambos. La proporción de cortisol también tuvo un efecto significativo en el número de desplantes ($t = 4.26$, g.l. = 13, $P < 0.001$) y como sugiere la Figura 4.20, el número de desplantes parece aumentar con los niveles de cortisol.

La interacción entre la proporción de cortisol y el tratamiento fue estadísticamente significativa ($\chi^2 = 12.36$, g.l. = 4, $P = 0.015$). Específicamente, el efecto de la interacción se debe a los tratamientos de aperturas de la boca ($t = -3.00$, g.l. = 13, $P = 0.003$), intentos de mordida ($t = -3.65$, g.l. = 13, $P < 0.001$), bostezos ($t = -2.57$, g.l. = 13, $P = 0.010$) y bostezos e intentos de mordidas ($t = -3.78$, g.l. = 13, $P < 0.001$). Este resultado sugiere que el efecto del cortisol en el número de desplantes fue similar para todos los tratamientos, excepto el de los videos de pez en movimiento que difirió de ellos (Figura 4.21).

Tabla 4.8. Resumen estadístico del modelo mínimo adecuado para los datos del efecto de las variables de predicción en la frecuencia de desplantes.

Efectos aleatorios	Varianza				
Bloque	7.84x10 ⁻⁷				
Residual	0.16				
Efectos fijos	Coefficiente	Error estándar	g.l.	Valor z	Valor P
PM ¹	-12.90	2.43	13	-5.31	<0.001
AB	10.67	3.19	13	3.34	<0.001
IM	9.53	2.63	13	3.63	<0.001
B	22.58	8.80	13	2.57	0.010
BIM	12.78	2.96	13	4.31	<0.001
Cp	20.49	4.81	13	4.26	<0.001
CF	2.10	0.98	13	2.13	0.033
B*Cp	-20.24	6.75	13	-3.00	0.002
IM*Cp	-19.51	5.34	13	-3.65	<0.001
B*Cp	-45.54	17.74	13	-2.57	0.010
BIM*Cp	-23.02	6.10	13	-3.78	<0.001

¹PM, pez en movimiento; AB, aperturas de la boca; IM, intentos de mordidas; B, bostezos; BIM, bostezos e intentos de mordida; Cp, proporción de la concentración de cortisol; CF, capacidad fisiológica. El asterisco (*) representa la interacción entre las variables en el modelo. Las comparaciones se hicieron con base en el procedimiento de contrastes de tratamiento.

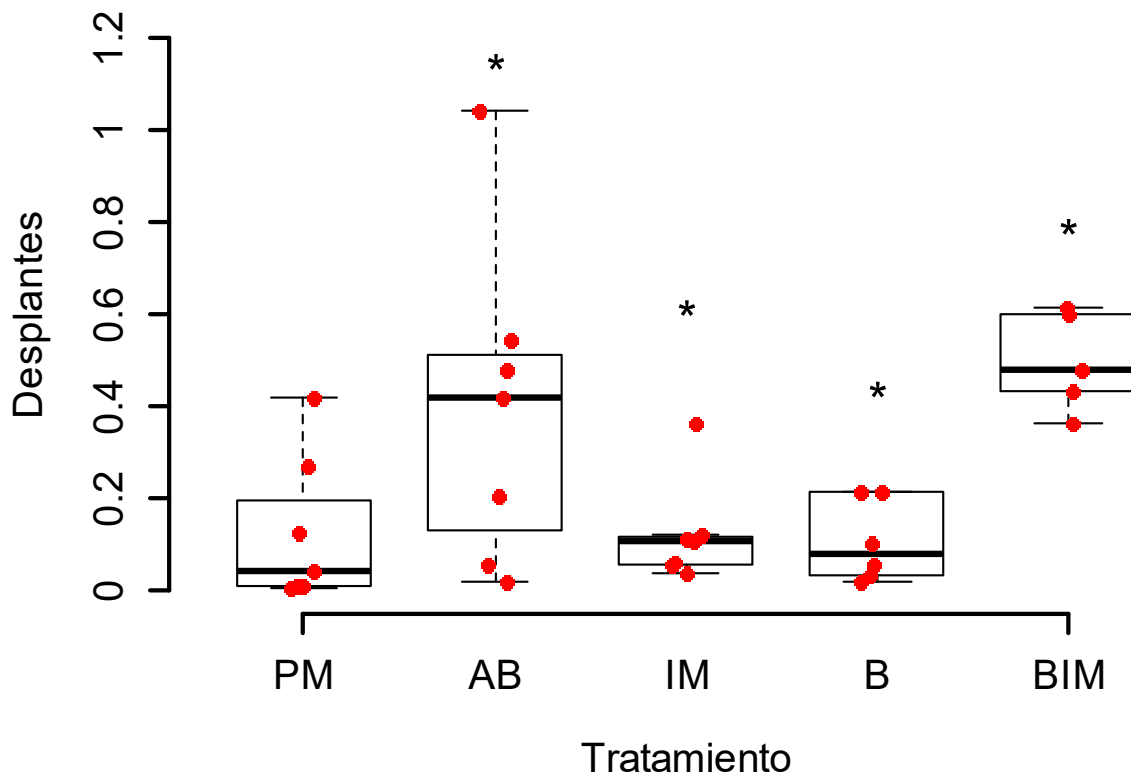


Figura 4.18. Número de desplantes en función de los cinco tratamientos. Las abreviaturas empleadas y el tipo de gráfica están explicados al pie de la Figura 4.2. Los promedios de los tratamientos de apertura de la boca, y bostezos y mordidas aumentaron respecto al tratamiento de pez en movimiento. Los promedios de los tratamientos de mordidas, y bostezos disminuyeron respecto al tratamiento de pez en movimiento.

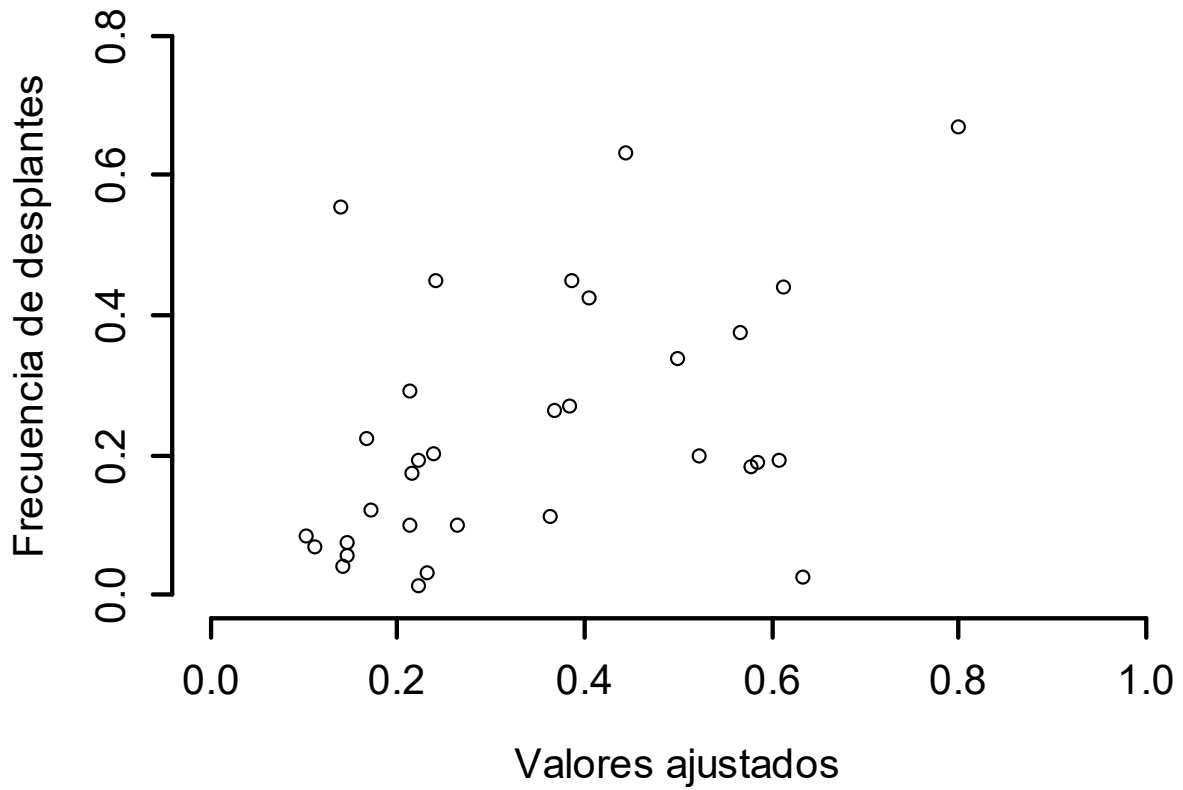


Figura 4.19. Gráfica que ilustra la relación entre la frecuencia de desplantes y la capacidad fisiológica (usé los valores ajustados por el modelo estadístico). Cada círculo representa los resultados obtenidos para cada uno de los 35 peces experimentales. En términos generales puede decirse que hay una tendencia de los peces a mostrar más desplantes cuanto más capacidad fisiológica tienen.

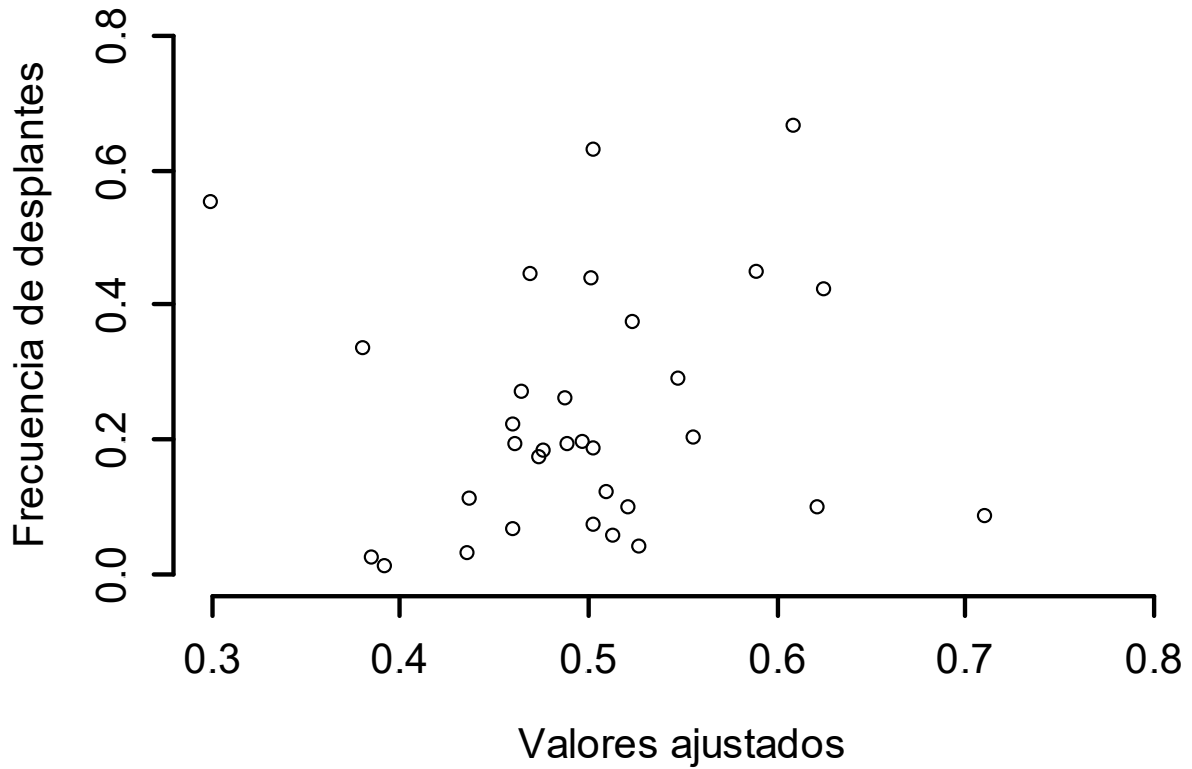


Figura 4.20. Gráfica que ilustra la relación entre la frecuencia de desplantes y la proporción de cortisol (usé los valores ajustados por el modelo estadístico). Cada círculo representa la frecuencia observada de desplantes para cada uno de los 35 peces experimentales, en función de la proporción de cortisol. El patrón general de los datos indica que el número de desplantes crece con el cortisol.

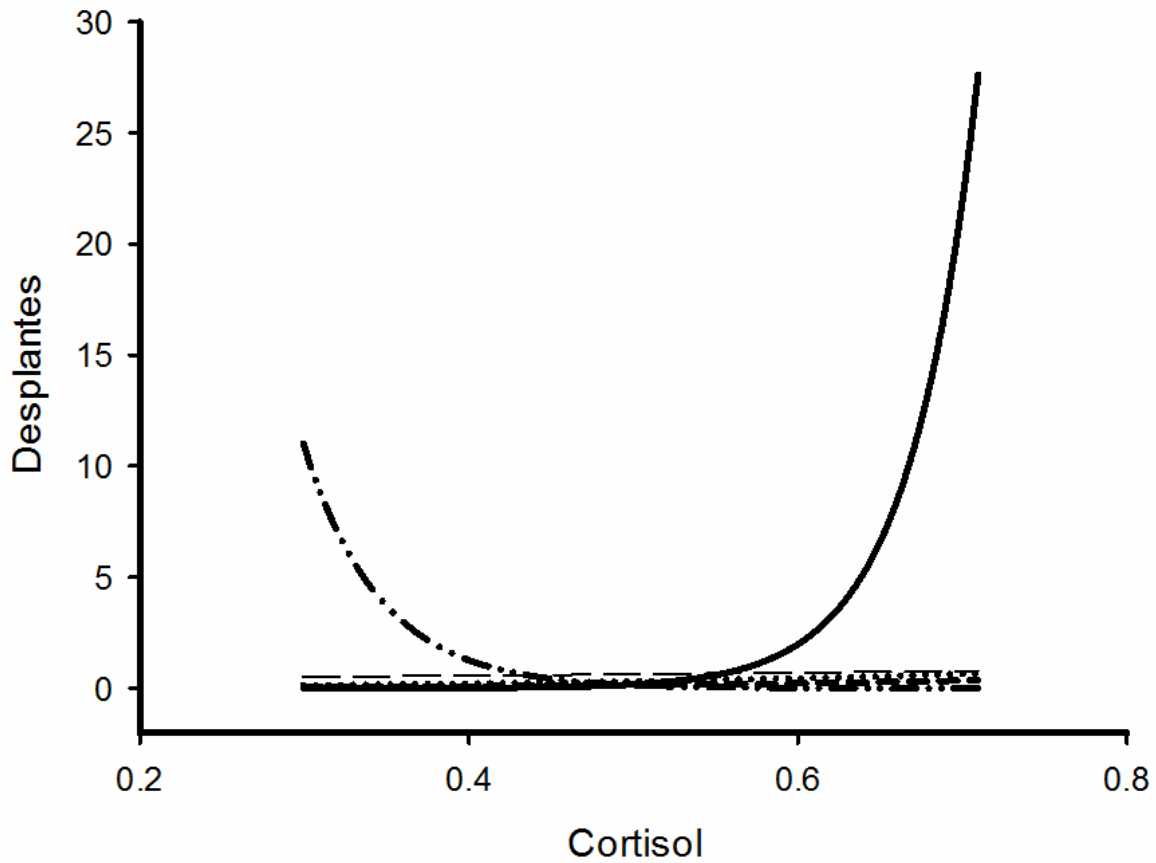


Figura 4.21. Gráfica que muestra la relación entre la frecuencia de desplantes y la proporción de cortisol para los 5 tratamientos: 1) Pez en movimiento (línea sólida), 2) Aperturas de la boca (línea punteada), 3) Intentos de mordidas (guiones) y 4) Bostezos (guiones y puntos), 5) Bostezos y mordidas (línea no continua). El análisis estadístico encontró que la pendiente de los peces que vieron el videoestímulo de pez en movimiento es diferente a la pendiente de los otros 4 tratamientos.

4.6 Resumen de los resultados

A continuación resumo los resultados obtenidos en el presente proyecto (Tabla 4.9).

Tabla 4.9 Resumen de los resultados

Análisis	Videoestímulo				
	PM	AB	IM	B	BIM
11-KT				Aumenta	
Cortisol			Aumenta		
Sombras Desplantes Bostezo		Disminuye			
Sombras/Esteroides		Aumenta			Aumenta
Desplantes/Esteroides Bostezo/Esteroides		Aumenta	Disminuye	Disminuye	Aumenta

5. DISCUSIÓN

El estudio que presento tuvo como objetivo buscar si el bostezo tiene una función comunicativa en *B. splendens*; con este fin puse a prueba algunas de las predicciones que se desprenden de las tres hipótesis comunicativas del bostezo: agresión, apaciguamiento y capacidad fisiológica. A 60 peces experimentales les presenté uno de cinco posibles videoestímulos de un pez: en movimiento, con aperturas de la boca, intentos de mordidas, bostezos, y bostezos e intentos de mordidas. Medí la respuesta de cada pez experimental a estos videoestímulos: entradas al área en sombra, bostezos y desplantes. Así mismo medí los niveles de 11-KT y cortisol en una submuestra de 35 peces. Observé que los peces experimentales modificaron su comportamiento y respuesta fisiológica a los videoestímulos de bostezos, y hallé una relación positiva de su bostezo con su capacidad fisiológica. Al ver el videoestímulo de bostezo los peces disminuyeron su frecuencia de desplantes posiblemente buscando evitar un conflicto contra un rival que manifiesta su capacidad fisiológica, sin embargo aumentaron sus niveles de 11-KT como preparación para un conflicto potencial (descartando que el bostezo comunique apaciguamiento); los peces que vieron el videoestímulo de bostezo no aumentaron sus niveles de cortisol, lo que descarta que el bostezo comunica agresión. Aunque no se cumplieron todas las predicciones, los resultados sugieren que el bostezo comunica la capacidad fisiológica de los machos del pez siamés durante encuentros agonísticos. A continuación expondré la discusión que lo justifica.

Consideré apropiado definir el bostezo del pez siamés tomando en cuenta la secuencia de movimientos que presenta (apertura lenta de la boca, retención de la posición con proyección frontal de la mandíbula inferior, y cierre rápido de la boca) y su duración (>0.92 s). Así, pude distinguir con seguridad al bostezo de otros comportamientos que también involucran la apertura de la boca, pero que son más veloces (e.g. intentos de mordidas, apertura de la boca para bombear agua a las agallas, respiraciones superficiales, alimentación, etc.).

La duración promedio de los bostezos observados (1.52 ± 0.11 s) es inferior a la reportada para machos de otras especies como los chimpancés (4.65 s), mandriles (2 s) y humanos (4.05 s), (Vick y col., 2010; Baenninger, 1987; Provine y col., 1986). Esta diferencia podría atribuirse a las diferencias de tamaño corporal entre las especies; las mandíbulas de los animales más grandes recorren distancias mayores para abrirse y cerrarse.

La secuencia de movimientos descrita para el bostezo ocurre en varias especies de peces incluyendo el pez siamés (Simpson, 1968; Baenninger, 1987), y al menos en el carrasco espinoso (*Cottus gobio*) se ha reportado que el bostezo es distinguible de otras aperturas agonísticas de la boca (Morris, 1955). No se había estudiado si el bostezo cumple una función comunicativa entre peces aunque se han propuesto varias funciones, además de la comunicativa. Por ejemplo, se ha sugerido que el bostezo es una actividad de desplazamiento durante el cortejo (Morris, 1955), que sirve para estirar la mandíbula (Morris, 1958), o bien que es un facilitador en el cambio de actividades (Myrberg, 1972). También se ha sugerido que el bostezo sirve para comprimir la vejiga natatoria y reducir la

flotabilidad (McCutcheon, 1962) o para calentar los músculos y preparar al pez para un aumento en la actividad (Rasa, 1971). Probablemente más estudios sean necesarios para corroborar si el bostezo de los peces es análogo al de los vertebrados terrestres, aunque sí es posible afirmar que los peces bostezan.

Los resultados indican que los peces fueron capaces de distinguir los videoestímulos que les presenté, pues su respuesta (en comportamiento y secreción de esteroides) fue distinta para cada tratamiento. Se sabe que los peces siameses reúnen información de sus conespecíficos la que usan para anticipar el grado de agresividad y capacidad de sus rivales durante un encuentro agonístico, así ajustan su comportamiento agresivo en función de tal información (Oliveira, 1998). En los experimentos que hice también observé que los peces siameses fueron capaces de modular su respuesta usando la información que pudieron obtener de su rival (el pez estímulo).

La hipótesis de que el bostezo comunica agresión sugiere que sirve para comunicar la intención de dañar al rival durante un encuentro agonista mediante la exposición de los dientes (Darwin, 1873; Hadidian, 1980; Leone y col., 2014). Los peces siameses sólo bostezan en presencia de otros peces de la misma especie (Baenninger, 1987), lo que los hace un modelo adecuado para estudiar la hipótesis de agresión. Se puede comparar a los intentos de mordida, el comportamiento agresivo franco, con el bostezo para saber si éste comunica agresión. Si los intentos de mordida y el bostezo comunicaran lo mismo (i.e. agresión) y si el número de estímulos fuera idéntico, esperaríamos que el estímulo combinado produjera una respuesta mayor a los estímulos individuales. Cuando analicé los datos de la submuestra (i.e. mediciones de esteroides) encontré que el estímulo combinado de

bostezos e intentos de mordidas elevó la frecuencia de desplantes, lo opuesto al resultado que obtuve para los estímulos individuales. Esto sugiere que los peces interpretaron el bostezo como algo distinto a la agresión. Además, los peces que vieron bostezos disminuyeron su frecuencia de desplantes, posiblemente porque el encuentro con el rival potencial (i.e. el videoestímulo) los indujo a evitar un conflicto mayor. Esta sería una estrategia conveniente que los peces usarían para evitar un conflicto potencialmente peligroso. De forma similar, encontré que la frecuencia de los desplantes aumentó con la capacidad fisiológica en los peces que vieron los videoestímulos de intentos de mordidas, y bostezos; la frecuencia no cambió cuando los peces vieron los videoestímulos combinados. Suponiendo que los intentos de mordida fueran una intención de agresión inmediata, y que el bostezo comunicara la capacidad fisiológica al rival (y que por lo tanto representaran una amenaza potencial), entonces, los peces que vieron los dos videoestímulos combinados enfrentaron a la vez agresión inminente y amenaza potencial. El hecho de que los peces respondieran de forma diferente a los estímulos individuales y al estímulo combinado, puede explicarse de dos maneras: 1) es posible que los peces hayan percibido mensajes opuestos del pez conespecífico, y que ante esta disyuntiva no supieran como responder. Sin embargo, ambos comportamientos han sido interpretados como parte del repertorio de desplantes del pez siamés e incluso parece existir una correlación entre la frecuencia de bostezos e intentos de mordidas durante encuentros agonistas (Baenninger, 1987). Esto sugiere que es poco probable que en condiciones naturales los peces no experimenten ambos comportamientos. 2) La presentación de un rival que, al mismo tiempo que intentaba agredir a los peces (mediante los intentos de

mordidas), comunicaba su capacidad fisiológica superior (mediante el bostezo). El pez experimental pudo interpretar esta situación como una amenaza mayor que la que representaban las pautas separadas; aparentemente la respuesta del pez fue defenderse aumentando la frecuencia de sus desplantes. Los peces siameses han sido seleccionados para ser agresivos (Simpson, 1968), por lo que en una situación de peligro es probable que respondan mostrándose más agresivos que intentar escapar. En conjunto estos resultados sugieren que los peces interpretaron los intentos de mordidas y los bostezos de forma diferente; el bostezo no parece entonces comunicar agresión.

Los resultados que obtuve en la medición de los esteroides también indican que el bostezo no comunica agresión. Esperaba que el videoestímulo de intentos de mordidas (como pauta agresiva) aumentara la concentración de cortisol experimental de los peces, y este resultado fue el que obtuve. Por lo tanto, el hecho de que el bostezo no produjera la misma respuesta sugiere que éste fue interpretado por los peces como algo distinto a agresión. Los resultados que obtuve del efecto en el cortisol sugieren que los peces que vieron los videoestímulos de intentos de mordida se sintieron amenazados y se estresaron, como podría esperarse de un comportamiento que comunica agresividad. Entonces, que los peces no hayan reaccionado de la misma forma al bostezo, hace menos factible la hipótesis de que éste comunique agresividad. También encontré que la concentración de cortisol experimental fue proporcional a la concentración pre-experimental para todos los tratamientos, aunque esta dependencia fue menos marcada en los peces que vieron los videoestímulos de intentos de mordidas.

Si la hipótesis de apaciguamiento, una invitación a la calma (Sauer y Sauer, 1967), fuera cierta, esperaríamos que los peces disminuyeran su actividad (fisiológica y de comportamiento) al ver los videoestímulos de bostezos. La frecuencia de desplantes, controlando por la concentración de esteroides, disminuyó en los peces que vieron bostezos. Este resultado sí parece reforzar la hipótesis de apaciguamiento. Sin embargo, también esperaríamos que el videoestímulo combinado de bostezos e intentos de mordidas provocara que la frecuencia de desplantes de los peces fuera intermedia a la encontrada para los estímulos individuales; un estímulo agresivo y otro de apaciguamiento que se anularían mutuamente. Lo que ocurrió fue que la frecuencia de desplantes creció, lo que indica que los peces no se apaciguaron al ver bostezos. También, la frecuencia de los desplantes de los peces que vieron los videoestímulos de bostezos aumentó con la capacidad fisiológica, en contraste con lo que predice la hipótesis de apaciguamiento. Si el bostezo, en efecto comunica capacidad fisiológica, esperaríamos que los peces experimentales con mayor capacidad fisiológica fueran quienes estuvieran más dispuestos a enfrentar al pez estímulo; estos peces experimentales estarían a la par del pez estímulo que bosteza y tendrían una probabilidad mayor de ganar el conflicto. Por lo tanto, este resultado ofrece evidencia de que los peces siameses posiblemente comunican su capacidad fisiológica mediante el bostezo.

Con el análisis estadístico encontré que la concentración promedio de 11-KT experimental fue mayor en los peces que vieron los videoestímulos de bostezos que los peces que vieron a otro pez en movimiento. Este resultado es opuesto a la predicción que hice si el bostezo comunicara apaciguamiento: la concentración de 11-KT experimental

sería igual o disminuiría respecto de los peces que observaron al pez en movimiento. En cambio, el aumento de la concentración de 11-KT experimental en los peces que vieron bostezos sugiere que aquellos podrían estar preparándose para un conflicto. Así que este resultado hace menos factible la hipótesis de apaciguamiento. Además, el efecto de la 11-KT pre-experimental en la 11-KT experimental dependió del tratamiento, dependencia que fue más intensa en los peces que vieron bostezos, y que explica que la concentración promedio de 11-KT experimental fuera más grande en los peces que vieron los videoestímulos de bostezos.

Una de las funciones de la 11-KT es estimular el comportamiento agresivo en contextos de conflictos agonistas, por ejemplo se ha encontrado que los machos del pez siamés aumentan su concentración de 11-KT cuando están frente a otro macho agresivo, aunque no exista contacto directo (Dzieweczynski, 2006). Esto sugiere que los peces que vieron los videoestímulos del pez en movimiento no consideraron al estímulo como una amenaza, y por lo tanto no modificaron su concentración de 11-KT experimental. En cambio, cuando los peces vieron videoestímulos de bostezos respondieron ajustando sus niveles de 11-KT experimental en función de la concentración pre-experimental. De ser así, los peces que poseen más 11-KT (pre-experimental) serán los que mejor preparados estén para un conflicto con un macho que comunique su capacidad fisiológica mediante el bostezo.

Encontré que la concentración de 11-KT se relaciona positivamente con las aperturas del opérculo, mismas que usé como una medida de la capacidad fisiológica. Los andrógenos como la 11-KT son el sustrato fisiológico de la capacidad fisiológica (Sinervo,

2010), por lo que el resultado que obtuve corrobora que las aperturas del opérculo son una medida confiable de la capacidad fisiológica del pez siamés, como ya se había encontrado en otras pruebas de comportamiento (Abrahams y col., 2005).

Otro análisis estadístico confirmó la existencia de una relación entre la capacidad fisiológica y la frecuencia de bostezo de los peces experimentales. Esta relación indica que los peces siameses que bostezan más también son los que muestran una capacidad fisiológica elevada, hallazgo que coincide con la hipótesis de comunicación de la capacidad fisiológica del bostezo. Ésta también estuvo asociada con la frecuencia de los desplantes, antes y después de controlar por la concentración de esteroides. Los peces que tuvieron una capacidad fisiológica superior también realizaron más desplantes, resultado que concuerda con lo que Sinervo y col. en el 2000 encontraron en una especie de lagartija. Sinervo y col. encontraron que los machos que tuvieron una capacidad fisiológica elevada (estimada por los niveles de testosterona) también fueron más agresivos y activos.

En conclusión, los resultados del trabajo de la tesis hacen menos factible la hipótesis de agresión porque el videoestímulo de bostezo no aumenta la concentración de cortisol y el videoestímulo de bostezos e intentos de mordidas no produce la misma respuesta cuando se presentan separados. Tampoco es factible la hipótesis de apaciguamiento porque el videoestímulo de bostezo aumenta la concentración de 11-KT y el videoestímulo de bostezos e intentos de mordidas no produce una respuesta intermedia respecto a los estímulos separados. Los resultados parecen ofrecer más evidencia a favor de la hipótesis de la capacidad fisiológica porque la frecuencia de bostezo se asoció positivamente con la capacidad fisiológica de los peces, y porque la

frecuencia de desplantes de los peces aumentó con el bostezo en función de su capacidad fisiológica. Al inicio del proyecto predije que la 11-KT y la frecuencia de desplantes variarían a la par (los andrógenos y el comportamiento agresivo están vinculados por una retroalimentación recíproca). Sin embargo encontré que esta relación no es tan directa. Aunque los peces disminuyan sus desplantes para evitar entrar en conflicto con un pez que está manifestando su capacidad fisiológica, no es una estrategia viable disminuir a la par la concentración de 11-KT. La disminución de la concentración de 11-KT haría al pez vulnerable para enfrentar a un rival con una capacidad fisiológica superior. En cambio, los peces pudieron optar por disminuir su frecuencia de desplantes al observar a un rival bostezar, y simultáneamente aumentar su concentración de 11-KT anticipando un conflicto.

Los resultados que obtuve ofrecen evidencia de que el bostezo del pez siamés tiene la función de comunicar la capacidad fisiológica. Estudios futuros podrían poner a prueba predicciones más específicas que confirmarían los resultados encontrados en el estudio que presento aquí.

6. REFERENCIAS

- Abrahams, M. V., Robb, T. L., y Hare, J. F. (2005). Effect of hypoxia on opercular displays: evidence for an honest signal?. *Animal Behaviour*, 70(2), 427-432.
- Allen, J. M., y Nicoletto, P. F. (1997). Response of *Betta splendens* to computer animations of males with fins of different length. *Copeia*, 1997(1), 195-199.
- Amici, F., Aureli, F., y Call, J. (2014). Response facilitation in the four great apes: is there a role for empathy?. *Primates*, 55(1), 113-118.
- Argiolas, A., Melis, M. R., Mauri, A., & Gessa, G. L. (1987). Paraventricular nucleus lesion prevents yawning and penile erection induced by apomorphine and oxytocin but not by ACTH in rats. *Brain research*, 421(1), 349-352.
- Argiolas, A., y Melis, M. R. (1998). The neuropharmacology of yawning. *European journal of pharmacology*, 343(1), 1-16.
- Argiolas, A., Melis, M. R., Murgia, S., & Schiöth, H. B. (2000). ACTH-and α -MSH-induced grooming, stretching, yawning and penile erection in male rats: site of action in the brain and role of melanocortin receptors. *Brain research bulletin*, 51(5), 425-431.
- Baenninger, R. (1987). Some comparative aspects of yawning in *Betta splendens*, *Homo sapiens*, *Panthera leo*, and *Papio sphinx*.. *Journal of Comparative Psychology*, 101(4), 349.
- Baenninger, R. (1997). On yawning and its functions. *Psychonomic Bulletin y Review*, 4(2), 198-207.

- Berendsen, H. H. G., y Gower, A. J. (1986). Opiate-androgen interactions in drug-induced yawning and penile erections in the rat. *Neuroendocrinology*, 42(3), 185-190.
- Bolker, B. M. (2008). *Ecological models and data in R*. Princeton University Press.
- Borg, B. (1994). Androgens in teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 109(3), 219-245.
- Collins, G. T., y Eguibar, J. R. (2010). Neuropharmacology of yawning In: *Walusinski O.: The Mystery of Yawning in Physiology and Disease* (Vol. 28, pp. 90-106). Front Neurol Neurosci.: Karger, Basel.
- Crawley, M. J. (2002). Statistical computing: an introduction to data analysis using S-Plus.–
J. *Statistical computing: an introduction to data analysis using S-Plus*.
- Darwin, C. (1873). *The Expression of the Emotions in Man and Animals: London, Murray, 1872*. Culture et civilisation.
- de Castro Siqueira, L. (2009). Yawning and thermoregulation in budgerigars: lack of support from results. *Animal Behaviour*, 78(6), e1-e2.
- Dzieweczynski, T. L., Eklund, A. C., y Rowland, W. J. (2006). Male 11-ketotestosterone levels change as a result of being watched in Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *General and comparative endocrinology*, 147(2), 184-189.
- Ellis, T., Yildiz, H. Y., López-Olmeda, J., Spedicato, M. T., Tort, L., Øverli, Ø., y Martins, C. I. (2012). Cortisol and finfish welfare. *Fish physiology and biochemistry*, 38(1), 163-188.

- Ferrari, W., Gessa, G. L., & Vargiu, L. (1963). Behavioral effects induced by intracisternally injected ACTH and MSH. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 104(1), 330-345.
- Gallup, A. C., Swartwood, L., Militello, J., y Sackett, S. (2015). Experimental evidence of contagious yawning in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Animal cognition*, 18(5), 1051-1058.
- Gallup, A. C., y Eldakar, O. T. (2013). The thermoregulatory theory of yawning: what we know from over 5 years of research. *Frontiers in neuroscience*, 6, 1-13.
- Graves, F. C., y Wallen, K. (2006). Androgen-induced yawning in rhesus monkey females is reversed with a nonsteroidal anti-androgen. *Hormones and behavior*, 49(2), 233-236.
- Guggisberg, A. G., Mathis, J., Schnider, A., y Hess, C. W. (2010). Why do we yawn?. *Neuroscience y Biobehavioral Reviews*, 34(8), 1267-1276.
- Hadidian, J. (1980). Yawning in an old world monkey, *Macaca nigra* (Primates: Cercopithecidae). *Behaviour*, 75(3), 133-147.
- Harr, A. L., Gilbert, V. R., y Phillips, K. A. (2009). Do dogs (*Canis familiaris*) show contagious yawning?. *Animal cognition*, 12(6), 833-837.
- Hasson, O. (1994). Cheating signals. *Journal of theoretical Biology*, 167(3), 223-238.
- Hauser, M. D. (1996). *The evolution of communication*. MIT press.
- Holmgren, B., Urba-Holmgren, R., Aguiar, M., y Rodriguez, R. (1980). Sex hormone influences on yawning behavior. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 40(2), 515-519.

- Joly-Mascheroni, R. M., Senju, A., y Shepherd, A. J. (2008). Dogs catch human yawns. *Biology Letters*, 4(5), 446-448.
- Laskiewicz, A. (1953). Yawning with regard to the respiratory organs and the ear. *Acta otolaryngologica*, 43(2-3), 267-270.
- Leone, A., Ferrari, P. F., y Palagi, E. (2014). Different yawns, different functions? Testing social hypotheses on spontaneous yawning in Theropithecus gelada. *Scientific reports*, 4.
- McCuTCHEON, F. H. (1962). Swimbladder volume control in the pinfish. *Lagodon rhomboides*. *Cell. Comp. Physiol.* 59, p. 203-214.
- Melis, M. R., Argiolas, A., & Gessa, G. L. (1986). Oxytocin-induced penile erection and yawning: site of action in the brain. *Brain research*, 398(2), 259-265.
- Melis, M. R., Stancampiano, R., & Argiolas, A. (1992). Hippocampal oxytocin mediates apomorphine-induced penile erection and yawning. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 42(1), 61-66.
- Miller, M. L., Gallup, A. C., Vogel, A. R., Vicario, S. M., y Clark, A. B. (2012). Evidence for contagious behaviors in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*): an observational study of yawning and stretching. *Behavioural processes*, 89(3), 264-270.
- Morris, D. (1955). The reproductive behaviour of the river bullhead (*Cottus gobio* L.), with special reference to the fanning activity. *Behaviour*, 7(1), 1-32.
- Morris, D. (1958). The reproductive behaviour of the ten-spined stickleback (*Pygosteus pungitius* L.). *Behaviour. Supplement*, III-154.

- Moyaho, A., Rivas-Zamudio, X., Ugarte, A., Eguibar, J. R., y Valencia, J. (2014). Smell facilitates auditory contagious yawning in stranger rats. *Animal cognition*, 18(1), 279-290.
- Moyaho, A., y Valencia, J. (2002). Grooming and yawning trace adjustment to unfamiliar environments in laboratory Sprague-Dawley rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, 116(3), 263.
- Myrberg Jr, A. A., Brahy, B. D., y Emery, A. R. (1967). Field observations on reproduction of the damselfish, *Chromis multilineata* (Pomacentridae), with additional notes on general behavior. *Copeia*, 819-827.
- O'Hara, S. J., y Reeve, A. V. (2011). A test of the yawning contagion and emotional connectedness hypothesis in dogs, *Canis familiaris*. *Animal Behaviour*, 81(1), 335-340.
- Oliveira, R. F., McGregor, P. K., y Latruffe, C. (1998). Know thine enemy: fighting fish gather information from observing conspecific interactions. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 265(1401), 1045-1049.
- Platek, S. M., Critton, S. R., Myers, T. E., y Gallup, G. G. (2003). Contagious yawning: the role of self-awareness and mental state attribution. *Cognitive Brain Research*, 17(2), 223-227.
- Provine, R. R. (1986). Yawning as a stereotyped action pattern and releasing stimulus. *Ethology*, 72(2), 109-122.

- Provine, R. R. (2005). Yawning: the yawn is primal, unstoppable and contagious, revealing the evolutionary and neural basis of empathy and unconscious behavior. *American scientist*, 93(6), 532-539.
- Provine, R. R., Tate, B. C., y Geldmacher, L. L. (1987). Yawning: no effect of 3–5% CO₂, 100% O₂, and exercise. *Behavioral and Neural Biology*, 48(3), 382-393.
- Rasa, O. A. E. (1971). The Causal Factors and Function of Yawning'in Microspathodon Chrysurus (Pisces: Pomacentridae). *Behaviour*, 39(1), 39-57.
- Romero, T., Ito, M., Saito, A., y Hasegawa, T. (2014). Social modulation of contagious yawning in wolves. *PloS one*, 9(8), e105963.
- Rose, R. M., Holaday, J. W., y Bernstein, I. S. (1971). Plasma testosterone, dominance rank and aggressive behaviour in male rhesus monkeys. *Nature*.
- Rundle, B. K., Vaughn, V. R., y Stanford, M. S. (2015). Contagious yawning and psychopathy. *Personality and Individual Differences*, 86, 33-37.
- Sauer, E. F., y Sauer, E. M. (1967). Yawning and other maintenance activities in the South African Ostrich. *The Auk*, 571-587.
- Scott, A. P., y Ellis, T. (2007). Measurement of fish steroids in water—a review. *General and comparative endocrinology*, 153(1), 392-400.
- Scott, A. P., Hirschenhauser, K., Bender, N., Oliveira, R., Earley, R. L., Sebire, M., ... y Canario, A. (2008). Non-invasive measurement of steroids in fish-holding water: important considerations when applying the procedure to behaviour studies. *Behaviour*, 145(10), 1307-1328.

- Senju, A. (2010). Developmental and Comparative Perspectives of Contagious Yawning in: Walusinski: The Mystery of Yawning in Physiology and Disease (Vol. 28, pp. 113-119): Front Neurol Neurosci. Basel, Karger.
- Simpson, M. J. A. (1968). The display of the Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *Animal Behaviour Monographs*, 1, i-73.
- Sinervo, B., Miles, D. B., Frankino, W. A., Klukowski, M., y DeNardo, D. F. (2000). Testosterone, endurance, and Darwinian fitness: natural and sexual selection on the physiological bases of alternative male behaviors in side-blotched lizards. *Hormones and Behavior*, 38(4), 222-233.
- Smith, J. M., y Harper, D. (2003). *Animal signals*. Oxford University Press.
- Thompson, S. B., y Bishop, P. (2012). Born to yawn? Understanding yawning as a warning of the rise in cortisol levels: randomized trial. *Interactive journal of medical research*, 1(2), e4.
- Urbá-Holmgren, R., González, R. M., & Holmgren, B. (1977). Is yawning a cholinergic response?. *Nature*.
- Ushijima, I., Mizuki, Y., Imaizumi, J., Yamada, M., Noda, Y., Yamada, K., & Furukawa, T. (1985). Characteristics of yawning behavior induced by apomorphine, physostigmine and pilocarpine. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*, 273(2), 196-201.
- Usui, S., Senju, A., Kikuchi, Y., Akechi, H., Tojo, Y., Osanai, H., y Hasegawa, T. (2013). Presence of contagious yawning in children with autism spectrum disorder. *Autism research and treatment*, 2013.

Vick, S. J., y Paukner, A. (2010). Variation and context of yawns in captive chimpanzees (Pan troglodytes). *American journal of primatology*, 72(3), 262-269.

Wallbrunn, H. M. (1958). Genetics of the Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *Genetics*, 43(3), 289-298.

Walusinski, O. (2010). Fetal Yawning in: Walusinski: The Mystery of Yawning in Physiology and Disease (Vol. 28, pp. 32-41): Basel, Karger.

ANEXO

Tabla A1. Resumen de la simplificación del modelo lineal (LM) para el análisis del efecto de las variables de predicción en la concentración de 11-KT experimental.

Etapa	Simplificación	g.l.	Cambio en la devianza (F)	Valor <i>P</i>
Modelo máximo	$Tr^{1*}KTpre*CF + P$	14		
1	$Tr + KTpre + CF + P + Tr*KTpre + Tr*CF + KTpre*CF$	18	0.92	0.481
2	$Tr + KTpre + CF + P + Tr*KTpre + Tr*CF$	19	0.76	0.390
3	$Tr + KTpre + CF + P + Tr*KTpre$	23	0.57	0.687
4	$Tr + KTpre + P + Tr*KTpre$	24	0.13	0.723
5	$Tr + KTpre + Tr*KTpre$	25	0.81	0.377
6	$Tr + KTpre$	29	3.64	0.018

¹Tr, tratamiento, KTpre, concentración de 11-KT pre-experimental; CF, capacidad fisiológica; P, peso corporal. El símbolo más (+) y el asterisco (*) representan respectivamente la inclusión de la variable explicativa y la interacción entre las variables en el modelo.

Tabla A2. Intervalos de confianza al 95% para los parámetros del modelo mínimo adecuado del análisis del efecto de las variables de predicción en la concentración de 11-KT experimental.

Parámetro	2.5%	97.5%
TrPM ¹	0.29	1.74
TrAB	-2.03	0.68
TrIM	-0.77	1.31
TrB	-3.36	-0.17
TrBIM	-0.32	1.86
KTpre	-0.55	0.39
TrB*KTpre	-0.26	2.02
TrC*KTpre	-0.61	0.93
TrD*KTpre	0.44	2.65
TrE*KTpre	-1.01	0.36

¹TrPM, pez en movimiento; TrAB, aperturas de la boca; TrIM, intentos de mordidas; TrB, bostezos; TrBIM, bostezos e intentos de mordidas; KTpre, concentración de 11-KT pre-experimental. El asterisco (*) representa la interacción entre las variables en el modelo.

Tabla A3. Resumen de la simplificación del modelo lineal mixto (LMM) para del análisis del efecto de las variables de predicción en la concentración de cortisol experimental.

Etapa	Simplificación	g.l.	logLik¹	Cambio en la devianza (Δ)	Valor P
Modelo máximo	$Bk^2 + Tr * Cpre * CF + P$	23	7.82		
1	$Bk + Tr + Cpre + CF + P + Tr * Cpre + Tr * CF + Cpre * CF$	19	4.05	7.55	0.110
2	$Bk + Tr + Cpre + CF + P + Tr * Cpre + Tr * CF$	18	3.66	0.77	0.380
3	$Bk + Tr + Cpre + CF + Tr * Cpre + Tr * CF$	17	2.50	2.33	0.127
4	$Bk + Tr + Cpre + CF + Tr * Cpre$	13	-5.95	16.89	0.002

¹ logLik, tasa de máxima verosimilitud.

² Bk, bloque; Tr, tratamiento, Cpre, concentración de cortisol pre-experimental; CF, capacidad fisiológica; P, peso corporal. El símbolo más (+) y el asterisco (*) representan respectivamente la inclusión de la variable explicativa y la interacción entre las variables en el modelo.

Tabla A4. Intervalos de confianza al 95% para los parámetros del modelo mínimo adecuado del análisis del efecto de las variables de predicción en la concentración de cortisol experimental.

Parámetro	2.5%	97.5%
TrPM ¹	-2.32	0.55
TrAB	-5.56	2.69
TrIM	0.97	5.43
TrB	-1.06	4.16
TrBIM	-3.07	2.86
Cpre	0.94	1.90
CF	-2.21	0.94
TrAB*Cpre	-0.94	1.57
TrIM*Cpre	-1.67	-0.27
TrB*Cpre	-1.51	0.22
TrBIM*Cpre	-1.67	0.17
TrAB*CF	-1.33	3.68
TrIM*CF	-2.87	1.42
TrB*CF	-1.83	2.54
TrBIM*CF	1.11	6.50

¹ TrPM, pez en movimiento; TrAB, aperturas de la boca; TrIM, intentos de mordidas; TrB, bostezos; TrBIM, bostezos e intentos de mordidas; Cpre, concentración de cortisol pre-experimental; CF, capacidad fisiológica. El asterisco (*) representa la interacción entre las variables en el modelo.

Tabla A5. Resumen de la simplificación del LMM para el análisis del efecto de las variables de predicción en la frecuencia de entradas a la sombra.

Etapa	Simplificación	g.l.	logLik ¹	Cambio en la devianza (Δ)	Valor P
Modelo máximo	Bk ² + Tr*CF + LE	13	2.53		
1	Bk + Tr*CF	12	2.52	0.03	0.864
2	Bk + Tr + CF	8	-5.68	16.39	0.003

¹ logLik, tasa de máxima verosimilitud.

² Bk, bloque; Tr, tratamiento, CF, capacidad fisiológica; LE, longitud estándar. El símbolo más (+) y el asterisco (*) representan respectivamente la inclusión de la variable explicativa y la interacción entre las variables en el modelo.

Tabla A6. Intervalos de confianza al 95% para los parámetros del modelo mínimo adecuado del análisis del efecto de las variables de predicción en la frecuencia de entradas al área en sombra.

Parámetro	2.5%	97.5%
TrPM ¹	0.67	1.06
TrAB	-0.55	-0.01
TrIM	-0.24	0.25
TrB	-0.22	0.21
TrBIM	-0.10	0.32
CF	-1.02	0.41
TrAB*CF	0.13	1.95
TrIM*CF	-0.79	1.24
TrB*CF	-1.42	0.47
TrBIM*CF	-1.12	0.63

¹ TrPM, pez en movimiento; TrAB, aperturas de la boca; TrIM, intentos de mordidas; TrB, bostezos; TrBIM, bostezos e intentos de mordidas; CF, capacidad fisiológica. El asterisco (*) representa la interacción entre las variables en el modelo.

Tabla A7. Resumen de la simplificación del GLMM para el análisis del efecto de las variables de predicción en la frecuencia de bostezos.

Etapa	Simplificación	g.l.	logLik¹	Cambio en la devianza (Δ)	Valor P
Modelo máximo	Bk ² + Tr*CF + LE	13	-57.31		
1	Bk + Tr + CF + LE	9	-60.70	6.77	0.148
2	Bk + Tr + CF	8	-60.72	0.04	0.843
3	Bk + Tr	7	-60.93	0.42	0.518
4	Bk	3	-62.61	3.37	0.498

¹ logLik, tasa de máxima verosimilitud.

² Bk, bloque; Tr, tratamiento, CF, capacidad fisiológica; LE, longitud estándar. El símbolo más (+) y el asterisco (*) representan respectivamente la inclusión de la variable explicativa y la interacción entre las variables en el modelo.

Tabla A8. Resumen de la simplificación del GLMM para el análisis del efecto de las variables de predicción en la frecuencia de desplantes.

Etapa	Simplificación	g.l.	logLik ¹	Cambio en la devianza (χ^2)	Valor P
Modelo máximo	Bk ² + Tr*CF + LE	13	29.86		
1	Bk + Tr*CF	12	29.77	0.19	0.662
2	Bk + Tr + CF	8	15.22	29.11	<0.001

¹ logLik, tasa de máxima verosimilitud.

² Bk, bloque; Tr, tratamiento, CF, capacidad fisiológica; LE, longitud estándar. El símbolo más (+) y el asterisco (*) representan respectivamente la inclusión de la variable explicativa y la interacción entre las variables en el modelo.

Tabla A9. Intervalos de confianza al 95% para los parámetros del modelo mínimo adecuado del análisis del efecto de las variables de predicción en la frecuencia desplantes.

Parámetro	2.5%	97.5%
TrPM ¹	-1.82	-0.36
TrAB	-1.27	1.09
TrIM	-1.30	0.76
TrB	-1.45	0.53
TrBIM	-0.20	1.97
CF	-15.78	-9.79
TrAB*CF	8.34	16.37
TrIM*CF	10.78	18.57
TrB*CF	10.61	18.31
TrBIM*CF	-2.77	10.61

¹ TrPM, pez en movimiento; TrAB, aperturas de la boca; TrIM, intentos de mordidas; TrB, bostezos; TrBIM, bostezos e intentos de mordidas; CF, capacidad fisiológica. El asterisco (*) representa la interacción entre las variables en el modelo.

Tabla A10. Resumen de la simplificación del LMM para del análisis del efecto de las variables de predicción en la frecuencia de entradas al área en sombra, incluyendo a la concentración de los esteroides entre las variables de predicción.

Etapa	Simplificación	g.l.	logLik¹	Cambio en la devianza (χ^2)	Valor P
Modelo máximo	$Bk^2 + Tr*Tp + Tr*Cp + CF + LE$	19	-113.08		
1	$Bk + Tr*Tp + Cp + CF + LE$	15	-114.44	2.72	0.605
2	$Bk + Tr*Tp + CF + LE$	14	-114.44	<0.001	0.979
3	$Bk + Tr*Tp + CF$	13	-114.50	0.11	0.746
4	$Bk + Tr*Tp$	12	-115.74	2.49	0.114
5	$Bk + Tr + Tp$	8	-125.08	18.68	<0.001

¹ logLik, tasa de máxima verosimilitud.

² Bk, bloque; Tr, tratamiento, Tp, proporción de 11-KT; Cp, proporción de cortisol; CF, capacidad fisiológica; LE, longitud estándar. El símbolo más (+) y el asterisco (*) representan respectivamente la inclusión de la variable explicativa y la interacción entre las variables en el modelo.

Tabla A11. Intervalos de confianza al 95% para los parámetros del modelo mínimo adecuado del análisis del efecto de las variables de predicción en la frecuencia de entradas al área en sombra, incluyendo a la concentración de esteroides entre las variables de predicción.

Parámetro	2.5%	97.5%
TrPM ¹	0.49	29.07
TrAB	-78.15	-8.04
TrIM	-20.94	32.82
TrB	-51.91	20.42
TrBIM	6.42	44.31
Tp	-33.92	25.18
TrAB*Tp	23.04	156.82
TrIM*Tp	-57.80	42.31
TrB*Tp	-41.26	118.70
TrBIM*Tp	-72.50	3.68

¹ TrPM, pez en movimiento; TrAB, aperturas de la boca; TrIM, intentos de mordidas; TrB, bostezos; TrBIM, bostezos e intentos de mordidas; Tp, proporción de 11-KT. El asterisco (*) representa la interacción entre las variables en el modelo.

Tabla A12. Resumen de la simplificación del GLMM para del análisis del efecto de las variables de predicción en la frecuencia de bostezos, incluyendo a la concentración de los esteroides entre las variables de predicción.

Etapa	Simplificación	g.l.	logLik¹	Cambio en la devianza (Δ^2)	Valor P
Modelo máximo	$Bk^2 + Tr*Tp + Tr*CF + LE$	18	-34.40		
1	$Bk + Tr + Tp + CF + Tr*CF + LE$	14	-30.38	8.03	0.091
2	$Bk + Tr + Tp + CF + LE$	10	-38.73	8.66	0.070
3	$Bk + Tr + CF + LE$	9	-38.75	0.05	0.821
4	$Bk + CF + LE$	5	-40.90	4.30	0.367

¹ logLik, tasa de máxima verosimilitud.

² Bk, bloque; Tr, tratamiento, Tp, proporción de 11-KT; CF, capacidad fisiológica; LE, longitud estándar. El símbolo más (+) y el asterisco (*) representan respectivamente la inclusión de la variable explicativa y la interacción entre las variables en el modelo.

Tabla A13. Resumen de la simplificación del GLMM para del análisis del efecto de las variables de predicción en la frecuencia de desplantes, incluyendo a la concentración de los esteroides entre las variables de predicción.

Etapa	Simplificación	g.l.	logLik¹	Cambio en la devianza (Δ)	Valor P
Modelo máximo	Bk ² + Tr*Tp + Tr*Cp + Tr*CF + LE	23	35.95		
1	Bk + Tr + Tp + Cp + CF+ Tr*Tp + Tr*Cp + LE	19	32.07	7.76	0.101
2	Bk + Tr + Tp + Cp + CF+ Tr*Cp + LE	15	28.80	6.54	0.162
3	Bk + Tr + Cp + CF+ Tr*Cp + LE	14	28.80	0.01	0.909
4	Bk + Tr + Cp + CF+ Tr*Cp	13	28.47	0.64	0.424
5	Bk + Tr + Cp + CF	9	22.29	12.36	0.015

¹ logLik, tasa de máxima verosimilitud.

² Bk, bloque; Tr, tratamiento, Tp, proporción de 11-KT; Cp, proporción de cortisol; CF, capacidad fisiológica; LE, longitud estándar. El símbolo más (+) y el asterisco (*) representan respectivamente la inclusión de la variable explicativa y la interacción entre las variables en el modelo.

Tabla A14. Intervalos de confianza al 95% para los parámetros del modelo mínimo adecuado del análisis del efecto de las variables de predicción en la frecuencia de desplantes, incluyendo a la concentración de esteroides entre las variables de predicción.

Parámetro	2.5%	97.5%
TrPM ¹	-17.67	-8.13
TrAB	4.41	16.93
TrIM	4.38	14.68
TrB	5.33	39.82
TrBIM	6.97	18.59
Cp	11.07	29.92
CF	0.17	4.02
TrAB*Cp	-33.47	-7.00
TrIM*Cp	-29.98	-9.05
TrB*Cp	-80.31	-10.77
TrBIM*Cp	-34.97	-11.07

¹ TrPM, pez en movimiento; TrAB, aperturas de la boca; TrIM, intentos de mordidas; TrB, bostezos; TrBIM, bostezos e intentos de mordidas; Cp, proporción de cortisol; CF, capacidad fisiológica. El asterisco (*) representa la interacción entre las variables en el modelo.

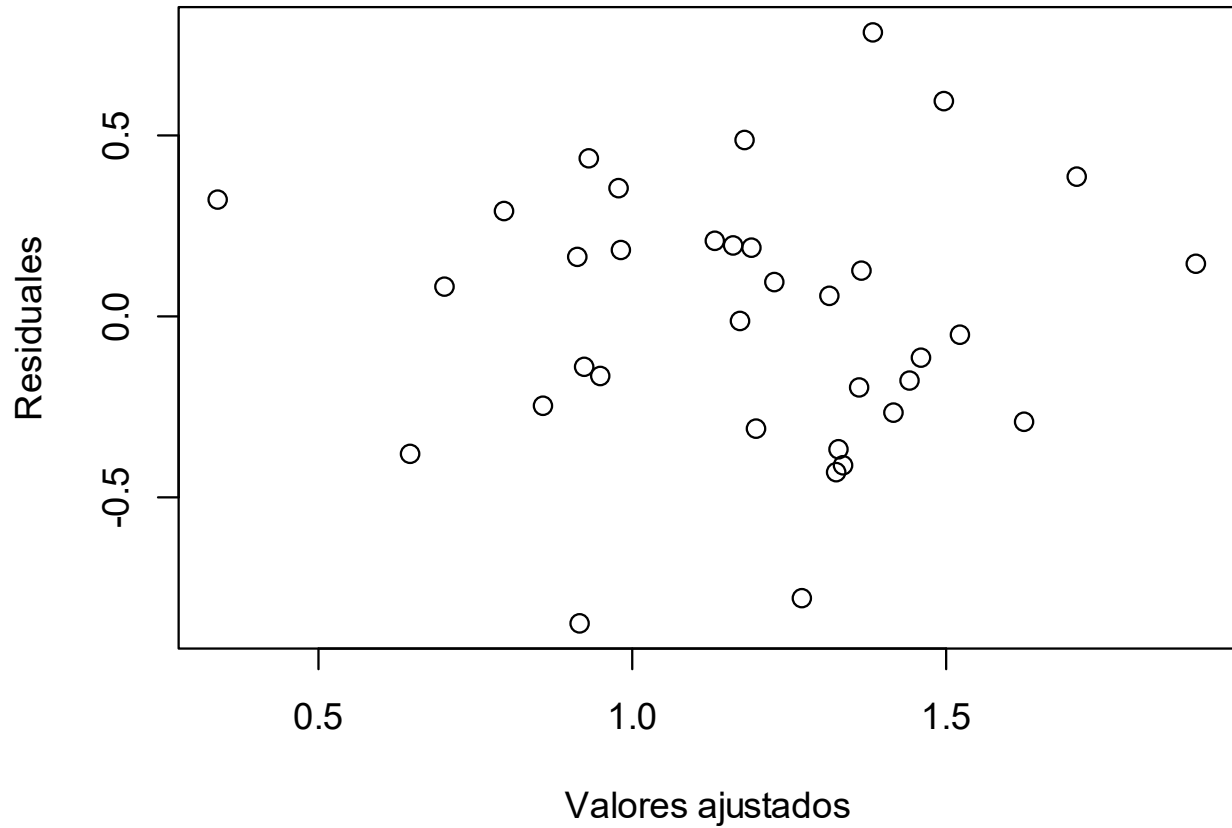


Figura A1. Relación entre los residuales y los valores ajustados del modelo mínimo adecuado para la concentración de 11-KT experimental. De acuerdo con los especialistas (Crowley, 2002) cuando no hay ningún patrón en la relación entre las dos variables se puede asumir que el modelo es adecuado.

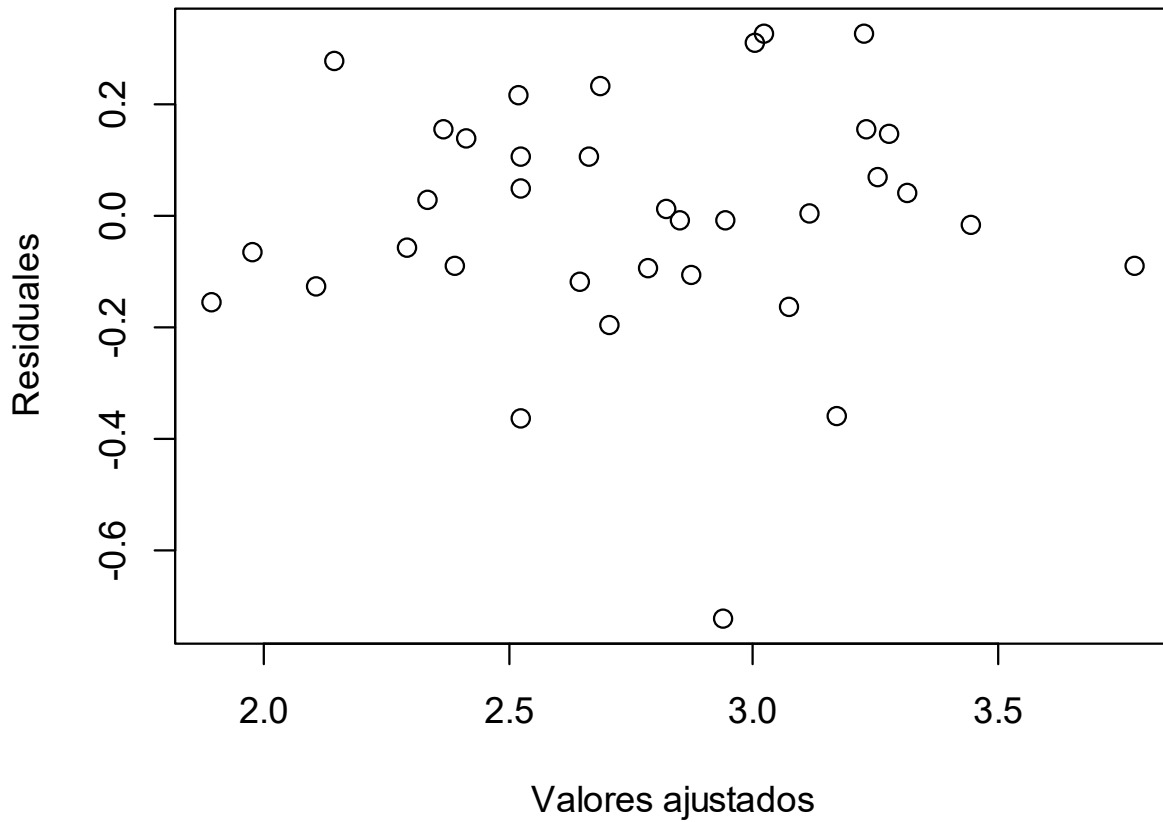


Figura A2. Relación entre los residuales y los valores ajustados del modelo mínimo adecuado para la concentración de cortisol experimental. La gráfica está explicada al pie de la Figura A1.

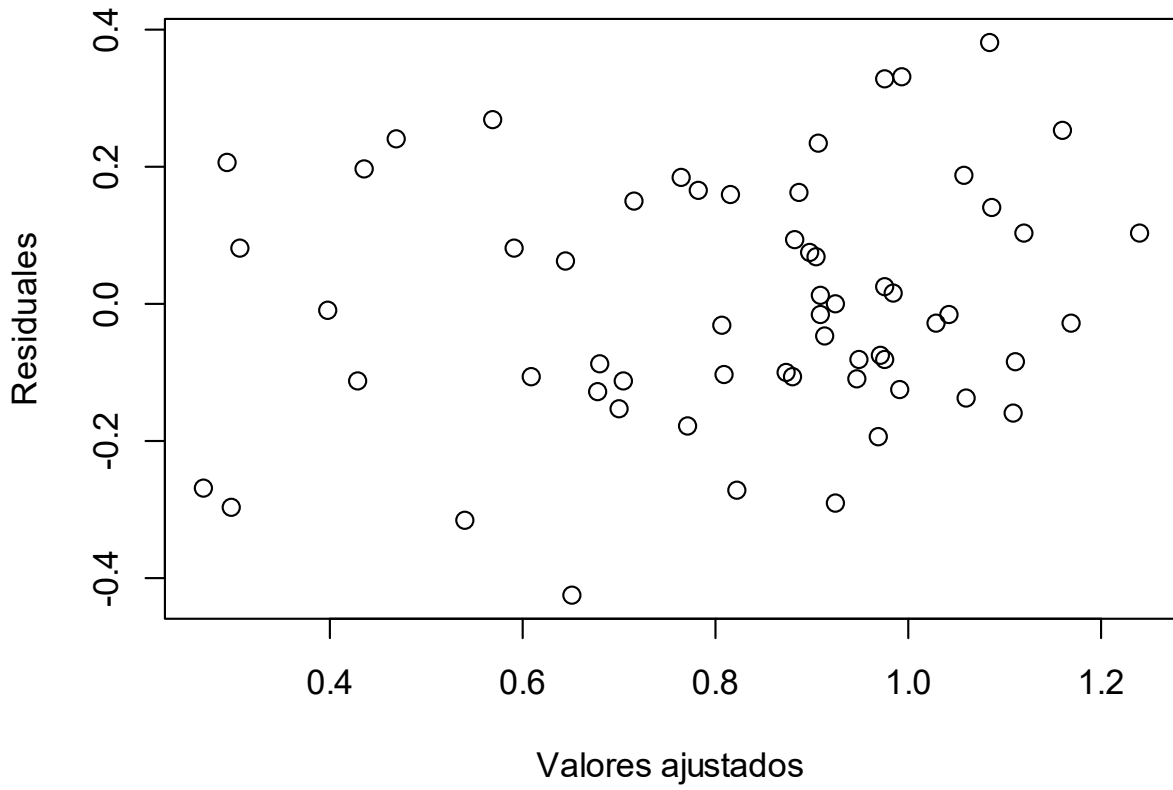


Figura A3. Relación entre los residuales y los valores ajustados del modelo mínimo adecuado para la frecuencia de entradas al área en sombra. La gráfica está explicada al pie de la Figura A1.

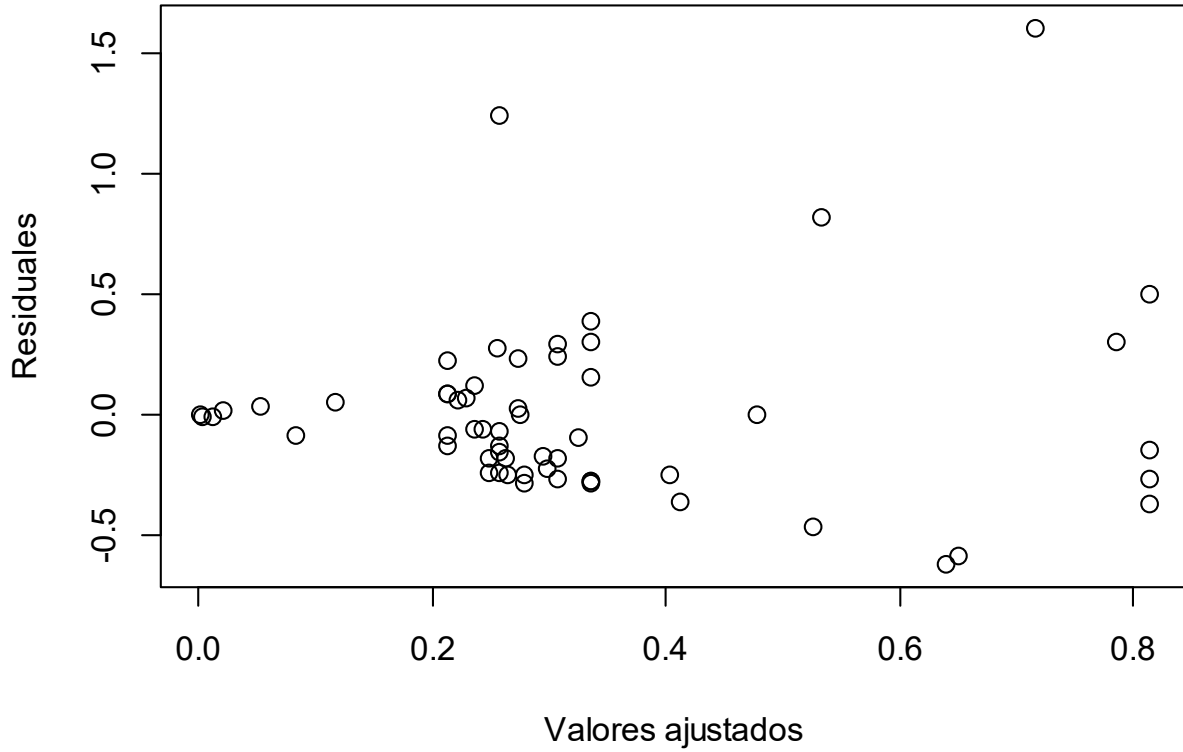


Figura A4. Relación entre los residuales y los valores ajustados del modelo mínimo adecuado para la frecuencia de desplantes. La gráfica está explicada al pie de la Figura A1.

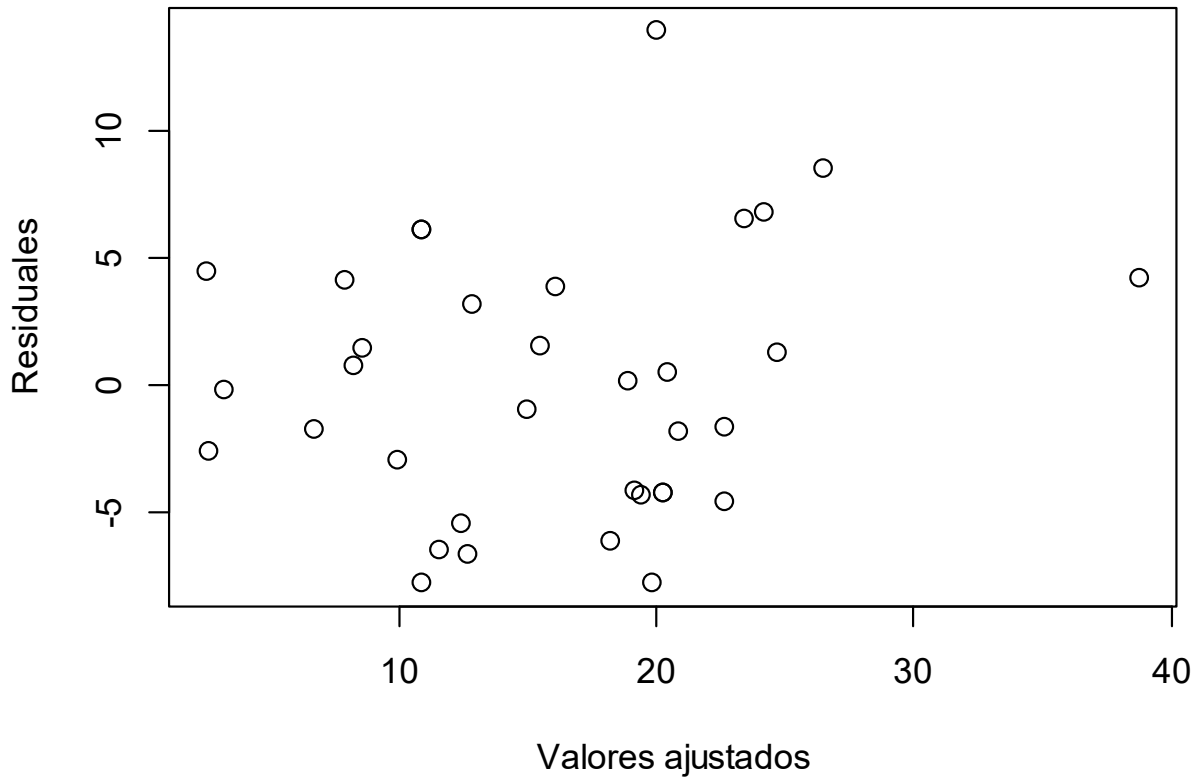


Figura A5. Relación entre los residuales y los valores ajustados del modelo mínimo adecuado para la frecuencia de entradas al área en sombra, incluyendo a los esteroides como variables de predicción. La gráfica está explicada al pie de la Figura A1.

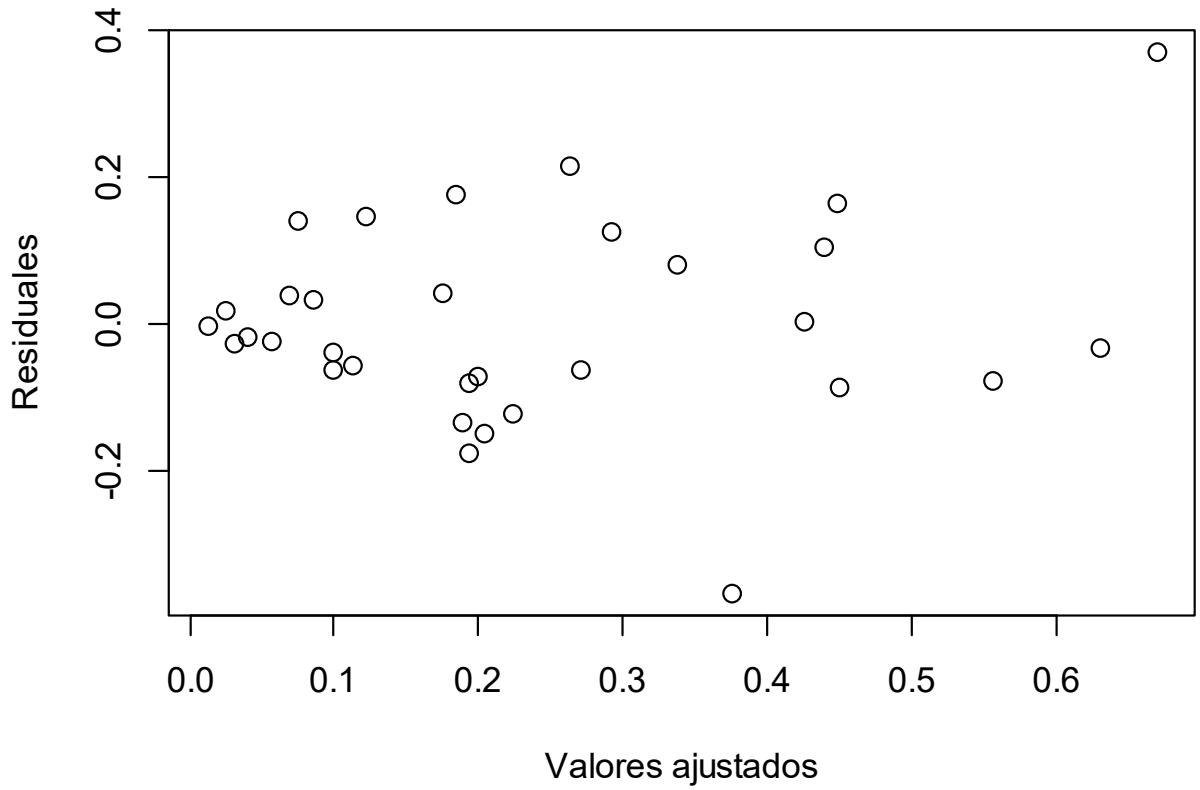


Figura A6. Relación entre los residuales y los valores ajustados del modelo mínimo adecuado para la frecuencia de desplantes, incluyendo a los esteroides como variables de predicción. La gráfica está explicada al pie de la Figura A1.