



**TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO
DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Patrones diarios de actividad locomotora y
reproductiva en el pez anual autóctono
Austrolebias reicherti
(Cyprinodontiformes, Rivulidae)**

Andrés Olivera Acquistapace

Orientador:

Dr. Carlos Passos

Coorientador:

Dra. Adriana Migliaro

Laboratorio de ejecución:

Sección Etología, Facultad de Ciencias

Diciembre, 2018

AGADECIMIENTOS

A mis tutores Caco y Adri, por el apoyo constante, la motivación y la enseñanza durante todo el proceso, dándome las herramientas y la libertad para avanzar, pero con la crítica y rigurosidad necesaria para hacer de este trabajo una experiencia clave.

A todo el piso 6, que desde un principio me hicieron sentir mejor que en casa, fueron y son responsables de llegar cada día a trabajar con una sonrisa, y si no la tengo, se que ahí la encontraré.

Al grupo cronobiológico, reciente pero creciente, con caras nuevas y viejos conocidos, donde me siento parte y participe. Disfruto el presente y anhelo un futuro floreciente. Mención especial, Ana y Bettina, líderes maternas, que desde su vocación y profesionalismo guían con afecto y rigor, confianza y exigencia. Gracias por las oportunidades

A la familia y amigos que siempre estuvieron presentes, dieron para adelante y han sufrido repetidas veces, las historias de los peces anuales y ritmos biológicos.

Vale, que siempre que precise alguna mano, tuve la respuesta necesaria.

Betta, que desde el primer año sabes mi nombre y el tiempo nos cruzó, muchas gracias por todos los concejos y sobre todo por ser ejemplo.

A mis padres, que desde el desconocimiento y la libertad, jamás me cuestionaron y siempre me apoyaron.

Emi, la que sufrió mis desahogos, y su sonrisa como estandarte siempre fue reconfortante.

Caco, más que un tutor, compañero, gracias por todo.

RESUMEN

Una adecuada relación temporal entre las variables fisiológicas, los repertorios conductuales y el entorno, es clave para la supervivencia de los organismos. Los ritmos circadianos permiten anticipar y organizar temporalmente las distintas actividades influyendo en el establecimiento de hábitos nocturnos o diurnos. En este trabajo se propuso evaluar el ritmo circadiano del pez anual *Austrolebias reicherti* en aislamiento y en contexto social. Mediante la utilización de cámaras de videoregistro continuo, durante 6 días monitoreamos la actividad locomotora de 10 animales (5 machos y 5 hembras) mantenidos en acuarios individuales, y 10 animales (5 machos y 5 hembras) mantenidos en pareja, bajo condiciones de fotoperíodo variable y temperatura constante. Cada acuario fue dividido transversalmente mediante marcas externas y la actividad locomotora se contabilizó como el número de veces que los peces cruzaron las divisiones durante intervalos de 10 minutos separados por una hora. El procesamiento de datos fue realizado mediante métodos de análisis de series temporales. Utilizando un software especializado obtuvimos actogramas y realizamos análisis de cosinor para la caracterización de la fase de actividad. Para ambos sexos, el mayor porcentaje de actividad locomotora ocurrió durante la fase diurna, con una acrofase promedio de la población cercana al ocaso. Se evidenció un efecto significativo de la interacción social sobre el patrón de actividad, causando una disminución de la actividad locomotora total, así como también una sincronización entre los individuos. Por otra parte, todos los eventos reproductivos ocurrieron durante la fase de luz. Este trabajo constituye la primer aproximación al estudio del ritmo circadiano en peces anuales Neotropicales. Las particularidades del hábitat y ciclo de vida de los peces anuales hacen que sean un modelo promisorio y novedoso para contribuir a la comprensión general del funcionamiento del reloj biológico.

INTRODUCCIÓN

El estudio de los ritmos biológicos ha permitido evidenciar la importancia de una correcta sincronización de los ritmos internos de los organismos con el ambiente. En sincronía con variables ambientales naturales, los sistemas biológicos mantienen una actividad rítmica constante (Aschoff, 1978; Lucas-Sanchez et al., 2011). Las variables ambientales que actúan como sincronizadores (o *zeitgebers*) se clasifican en abióticas o bióticas, en función de si están relacionadas con parámetros físico-químicos o biológicos, respectivamente. Sincronizadores abióticos son por ejemplo, la luz y la temperatura, mientras que el alimento y las interacciones sociales actúan como sincronizadores bióticos (Mistlberger, 1993; Singh et al., 2016). De todos estos, la luz se plantea como el principal sincronizador en la mayoría de las especies estudiadas (Aschoff et al., 1982; Helfrich-Forster y Engelmann, 2002). Los ritmos biológicos se han clasificado de acuerdo a su periodicidad en ultradiana (menor a 24h), circadiana (cerca a 24h), e infradiana (mayor a 24h). Estos ritmos se encuentran en varios niveles de organización y complejidad, lo que sugiere una ventaja adaptativa (Palmer, 2002; Sharma, 2003). Un organismo que posee una correcta temporización de sus procesos biológicos incrementa su *fitness* de dos maneras: (i) mediante la coordinación de sus procesos metabólicos internos (valor adaptativo intrínseco); (ii) mediante la sincronización de sus procesos fisiológicos y de su comportamiento con factores ambientales cíclicos (valor adaptativo extrínseco) (Sharma, 2003). La temporización apropiada de los ritmos biológicos mejora la capacidad innata de los organismos para sobrevivir en entornos cambiantes, al permitirles anticipar de manera eficiente los eventos periódicos (Paranjpe y Kumar, 2005). Estas ventajas pueden traducirse en términos de menor riesgo de depredación, reducción de la competencia, aumento en el éxito reproductivo y protección frente a condiciones ambientales adversas (Sharma, 1997; Dardente y Cermakian, 2007).

El sistema circadiano difiere entre las especies en su organización circuital, celular y molecular. Sin embargo, su estructura general es muy similar y consiste en: i) sensores que reciben y procesan la información de los *zeitgebers*; ii) un marcapasos central, que se encarga de producir el ritmo endógeno y acompasar la estructura temporal del organismo al ritmo de las entradas, de su integración en información apropiada y de la transmisión de esta información al organismo; iii) salidas, que transmiten las señales temporales desde el marcapaso central a cada célula del organismo (Sharma, 2003). Además del marcapasos central, en los mamíferos hay osciladores adicionales en el cerebro y otros órganos como el riñón, el hígado, el intestino o el tejido adiposo, cuya función es mantener el reloj central (Golombek y Rosenstein, 2010; Terzibasi, 2017). En estos animales, la señal lumínica es detectada exclusivamente por la retina, en gran parte por células ganglionares retinales. Sin embargo, esta característica no es conservada en el resto de los grupos

vertebrados (aves, reptiles, anfibios y peces) donde la fotorrecepción no es exclusiva de la retina. Células especializadas para la fotorrecepción se encuentran en muchos otros sitios, que incluyen el complejo pineal, el diencéfalo ventral, regiones del hipotálamo e incluso los melanóforos dérmicos (Sassone-Corsi et al., 2000). En peces teleósteos, el sistema circadiano está organizado como una red de unidades de oscilación sensibles a la luz, independientes e interconectados (Falcon, 2010). La caracterización del sistema circadiano en este grupo se dificulta por la variabilidad propia de este grupo, pero al igual que en mamíferos la hormona melatonina es el principal mensajero hormonal.

Uno de los ritmos circadianos más estudiados es la actividad locomotora, la cual se ha utilizado ampliamente para analizar la organización fisiológica de los sistemas circadianos de mamíferos, aves, reptiles y peces (Hurd et al., 1998). Los peces muestran patrones diarios de actividad locomotora que pueden clasificarse en diurnos, nocturnos o crepusculares, según la fase del fotoperiodo en que se expresan preferentemente (Herrero et al, 2003; Schulz y Leuchtenberger, 2006). Sin embargo, la determinación del patrón diario de esta actividad no es sencilla, ya que diferentes individuos de la misma especie pueden mostrar distintos patrones, e incluso un mismo individuo puede variar el patrón a lo largo del tiempo (Helfman, 1993). Por otro lado, las interacciones sociales, tanto intra como interespecíficas, pueden influir sobre los patrones diarios de actividad (Davidson y Menaker, 2003; Favreau et al, 2009). La supervivencia depende de encontrar nichos espaciales y temporales favorables, y la presencia de otros individuos puede afectar el nicho mediante la cooperación, la competencia o la depredación, entre otras interacciones (Larson, 2004). Por ejemplo, en especies que se organizan jerárquicamente ocurre un desplazamiento de la actividad de los individuos menos competitivos hacia horarios de alimentación desfavorables (Kavaliers, 1980), y una disminución de su actividad locomotora (Favreau et al, 2009). Experiencias en teleósteos han puesto en evidencia que el agrupamiento modifica el hábito nocturno o diurno de los individuos (Kavaliers, 1980). A su vez, efectos de las claves sociales sobre el patrón de actividad también se han descrito en contexto reproductivo, considerando, que la reproducción es un momento esencial en el ciclo de vida de un animal. Este período conlleva cambios hormonales que afectan el sistema circadiano y pueden generar a su vez una mayor sensibilidad de los organismos a las señales sociales (Lumineau et al., 1998; Campos-Mendoza et al., 2003), determinando el éxito de apareamiento mediante la sincronización fisiológica y comportamental entre los individuos (Rad et al., 2006).

Peces Anuales

Los peces anuales son un grupo fascinante debido a sus adaptaciones particulares de desarrollo, ecológicas, fisiológicas y evolutivas al ciclo de vida más corto entre los vertebrados. Se encuentran en la región africana y Neotropical (Loureiro y de Sa, 2016a). El peculiar ciclo de vida se

inicia con la deposición de huevos con resistencia a la desecación en el fondo de los charcos temporales que habitan (Figura 1). Los embriones poseen la capacidad de resistir a eventos de desecación, al atravesar hasta tres períodos de diapausa (Berois et al., 2014), lo que les permiten retrasar el tiempo de desarrollo hasta el momento en que las condiciones ambientales son nuevamente propicias para la eclosión. Una vez adultos, los peces constantemente se reproducen hasta su muerte, la cual ocurre poco antes de que los charcos se sequen, posiblemente debido al aumento de la temperatura al final de la primavera y la disminución de la concentración de oxígeno en estos cuerpos de agua (Simpson, 1979).



Figura 1. Ambiente temporal típico de los peces anuales durante el período de desecación (izquierda) y la estación lluviosa (derecha).

El estudio pionero sobre patrones de actividad circadiana en peces anuales se remonta al elaborado por Hass (1976) en el pez africano *Nothobranchius guentheri*, donde se observó un pico máximo a mediodía, tanto para la actividad locomotora como reproductiva. Recientemente se ha incorporado al género *Nothobranchius* como modelo de investigación en el efecto degenerativo del envejecimiento sobre la ritmicidad (Terzibasi et al., 2008; Di Cicco et al., 2011). En este marco, estudios en *N. korthausae* y *N. rachovii* también constataron mayor actividad durante la fase lumínica (Lucas-Sanchez et al., 2011; 2013; 2014).

En la región Neotropical, *Austrolebias* es el género que presenta mayor diversidad, con 42 especies actualmente reconocidas, y ampliamente distribuidas en las cuencas La Plata-Paraná y Patos-Merín (Costa, 2006; Loureiro et al., 2016b). Tanto en la región como en nuestro país, existe una larga trayectoria de investigación profundizada desde distintos aspectos, que van desde la biología del desarrollo y la fisiología, hasta aspectos ecológicos, evolutivos y comportamentales. Al igual que su equivalente africano, el género *Austrolebias* ha sido y es considerado como un modelo propicio para desarrollar estudios sobre estrategia sexual, gametogénesis, fertilización y desarrollo temprano, especialmente a nivel celular y molecular (Loureiro y de Sá, 1996; Arezo et al., 2007; Berois et al., 2007). El hecho de habitar exclusivamente humedales efímeros con una intensa variación temporal en diversos ejes ambientales (Williams 2006), un área restringida de distribución

y una reducida posibilidad de migrar libremente (Loureiro, 2016b), brinda un contexto propicio para el estudio de los procesos evolutivos y ecológicos dependientes del espacio y que dan forma a la biodiversidad (Costa, 2006; Costa, 2009; García et al., 2009a). Por otra parte, se han desarrollado numerosos trabajos sobre el comportamiento del género en un amplio espectro; que va desde el comportamiento reproductivo (García et al., 2008), selección sexual (Passos et al., 2013a; Passos et al., 2014), agresión (Reyes et al., 2017a), comunicación química (Passos et al., 2013b, Reyes et al 2017b), y relación entre el comportamiento reproductivo y el estrés (Passos et al., 2017). Sin embargo, aunque se evidencia una larga trayectoria de investigación, acompañada de un creciente y amplio espectro de enfoques, hasta la fecha no existen estudios cronobiológicos sobre peces anuales del continente americano.

Dentro del género *Austrolebias*, una de las especies actualmente más utilizada en estudios comportamentales en nuestro país es *A. reicherti*. Es una especie endémica de Uruguay, que se encuentra en el sector suroeste de la cuenca de la Laguna Merín (Fig. 2a). Al igual que el resto de las especies del género, presenta un marcado dimorfismo sexual tanto morfológico como comportamental: los machos son de mayor tamaño, presentan la región opercular y las aletas impares intensamente pigmentadas, y poseen un diseño de bandas verticales oscuras sobre un fondo claro en el flanco, cortejan activamente y son intrasexualmente agresivos; mientras que las hembras son más pequeñas, de color marrón claro y relativamente crípticas y no expresan agresividad (Loureiro y García 2008)(Figura 2b,c). Presentan fecundación externa y el comportamiento reproductivo consiste en el despliegue de conductas de atracción y respuesta por parte del macho y la hembra, y culmina con el enterramiento total o parcial de la pareja con el fin de depositar los huevos dentro del sustrato (Vaz-Ferreira et al., 1964; Belote y Costa, 2002; García et al., 2008).

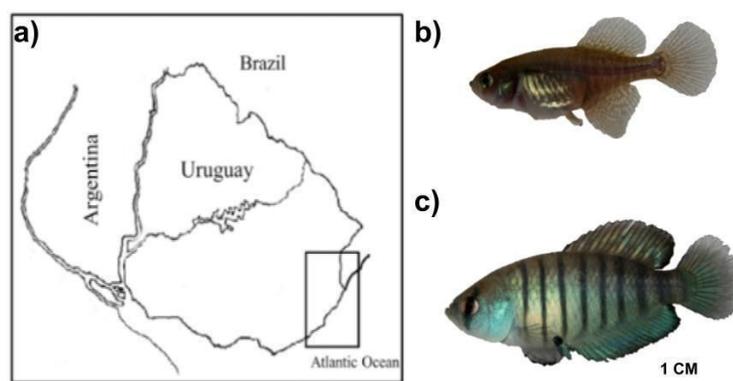


Figura 2. a) Sitio de distribución de *A. reicherti*. **b)** Ejemplar hembra *A. reicherti*, **c)** Ejemplar macho *A. reicherti*.

HIPÓTESIS

La pigmentación del cuerpo y los vistosos despliegues comportamentales (Belote y Costa, 2002; García et al., 2008), junto a los antecedentes en *Nothobranchius* (Hass, 1997; Lucas-Sanchez et al., 2011; 2013; 2014), fundamentan una primer hipótesis de que *A. reicherti* es una especie con preferencia de actividad locomotora y reproductiva en las horas de luz. Además, considerando que son peces que viven en charcos con alta densidad de individuos se plantea como segunda hipótesis que los patrones de actividad son afectados por la interacción social, fortaleciendo la sincronización grupal de la actividad diaria.

OBJETIVO

El objetivo general de esta tesina fue evaluar la variación diaria de actividad locomotora y reproductiva en el pez anual *A. reicherti*. De este objetivo general se desprenden los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar la variación diaria de la actividad locomotora, bajo condiciones de temperatura constante y fotoperiodo variable, en aislamiento.
2. Evaluar la variación diaria de la actividad locomotora, bajo condiciones de temperatura constante y fotoperiodo variable, en contexto social.
3. Evaluar la variación diaria de la actividad reproductiva, bajo condiciones de temperatura constante y fotoperiodo variable.

Con el fin de lograr los objetivos antes mencionados, el trabajo de esta tesina se organizó en dos partes: **1)** ritmo de actividad locomotora en aislamiento; **2)** ritmo de actividad locomotora y reproductiva en contexto social.

METODOLOGÍA

Colecta y mantenimiento

Se utilizaron individuos adultos machos y hembras de *A. reicherti* colectados en charcos temporales en la localidad de Vergara (32°58'56.89"S, 53°52'13.02"O, Dpto. de Treinta y Tres, Uruguay) en octubre de 2015 y agosto de 2016, para evaluar el ritmo de actividad en aislamiento y en contexto social, respectivamente (Figura 3). Los animales fueron mantenidos en el acuario de Facultad de Ciencias de acuerdo a un protocolo estandarizado de cría y mantenimiento de peces anuales (Papa et al., 2016), durante un período de 15 días, a temperatura constante (19 °C) y fotoperiodo natural. Los machos fueron alojados en acuarios individuales (20 x 9 x 15 cm, largo x ancho x altura) con visibilidad interrumpida entre los mismos para disminuir estrés y evitar el establecimiento de jerarquías, mientras que las hembras se mantuvieron en acuarios comunales (40 x 13 x 15 cm) en grupos de hasta 5 individuos. Cada acuario fue provisto de oxígeno colocando un tubo plástico conectado a una bomba de aire. El agua se cambió cada 3 días en un tercio de su volumen, y los individuos fueron alimentados *ad libitum* con *Tubifex sp.* El alimento fue suministrado en horarios aleatorios con el fin de evitar habituación y su influencia en la sincronización temporal de la actividad (Blanco, 2009; Sánchez et al., 2009).

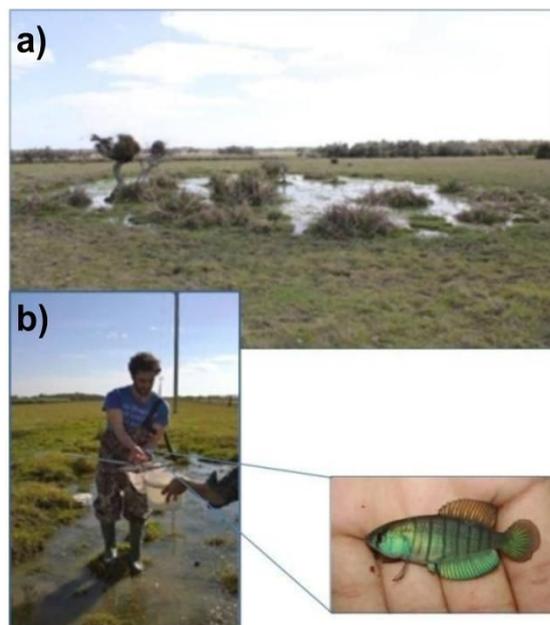


Figura 3. a) Charco temporal lleno. b) Momento de pesca con calderín (izquierda), ejemplar macho de *A. reicherti* (derecha).

Diseño experimental

Los experimentos fueron realizados en la Sección Etología de la Facultad de Ciencias, que cuenta con una estación experimental aislada para la realización de observaciones y experiencias de

comportamiento, con control de temperatura y ciclo de luz-oscuridad. Para el registro de la actividad se utilizaron cámaras de registro continuo (Protecta, modelo PTC-CI20B-65) con luz infrarroja para visión nocturna, conectadas a una videgrabadora digital. Éstas fueron dispuestas en una estructura que permitió filmar los acuarios desde arriba. Los acuarios experimentales (45 x 15 x 15 cm) fueron divididos transversalmente en tres zonas iguales mediante marcas externas y colocados sobre un fondo blanco (Figura 4). La visibilidad entre los mismos fue interrumpida mediante láminas opacas. Previo a las experiencias los individuos fueron aclimatados durante 5 días a las condiciones experimentales de temperatura y fotoperíodo. Durante la aclimatación así como durante la fase experimental el alimento fue suministrado cada cinco días en horarios aleatorios. Al finalizar las experiencias los individuos fueron devueltos al acuario de mantenimiento, para constituir parte del stock de cría.

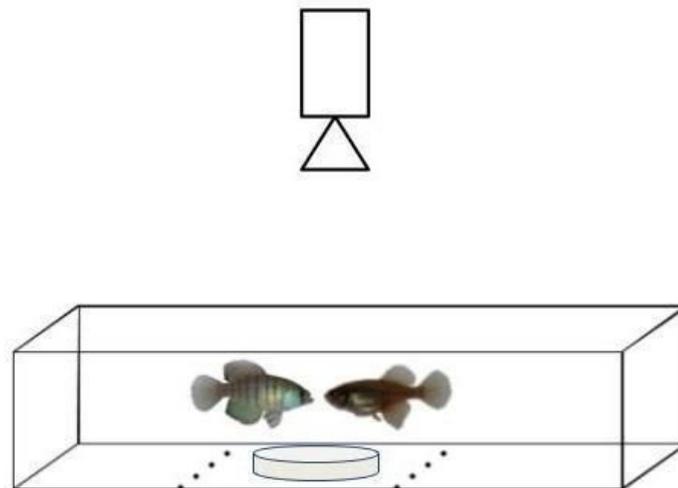


Figura 4. (Abajo) Acuario experimental para registro de actividad. Divisiones transversales mediante marcas externas (líneas punteadas) dividen el acuario en tres zonas iguales, con un recipiente en la zona central donde se colocó el sustrato para la oviposición y registró la actividad reproductiva. (Arriba) Cámara de registro continuo con vista desde arriba.

Actividad locomotora en aislamiento

Para evaluar la actividad locomotora en aislamiento, se utilizaron tanto hembras (n=5) como machos (n=5), colocados individualmente en acuarios, sometidos a condiciones de temperatura constante (19°C) y un fotoperíodo de 13:11 (L:O) por un período de 6 días.

Actividad locomotora en contexto social y reproductiva

Para evaluar la actividad locomotora en contexto social, se utilizaron díadas (n=5) compuestas por un macho y una hembra. Cada díada fue colocada en un acuario, sometido a condiciones de temperatura constante (19°C) y un fotoperiodo de 12:12 (L:O) por un período de 6 días.

Para evaluar la actividad reproductiva, en cada acuario experimental se colocó un recipiente circular (12 x 3 cm, diámetro x altura) en el sector central conteniendo bolitas de borosilicato (Thomas scientific beads 0,5mm), esterilizadas con agua hirviendo e hipoclorito de sodio al 2% (Podrabsky, 1999), como sustrato adecuado para la oviposición. Se dispuso de sustrato suficiente para permitir un despliegue de comportamiento natural (no menos de 2cm de profundidad).

Análisis de datos

A partir de las videograbaciones se cuantificó la actividad locomotora a lo largo de los días, calculada como la cantidad de veces que los individuos atravesaron una marca de la pecera durante los primeros diez minutos de cada hora, obteniendo de esta manera un valor de actividad por hora. De esta forma, se obtuvieron los datos de actividad diurna (suma de la actividad de todos los días durante la fase de luz), actividad nocturna (suma de la actividad de todos los días durante la fase de oscuridad) y actividad total (suma de la actividad diurna y nocturna). En los ensayos de contexto social, se contabilizó la actividad de cada individuo de la díada por separado. Además, se estimó la actividad reproductiva a partir de la frecuencia de enterramientos (momento posterior al cortejo, en donde la hembra acepta al macho) ocurridos durante los primeros diez minutos de cada hora. Si bien el enterramiento es un comportamiento conspicuo fácil de identificar, resulta en una medida reproductiva indirecta porque la pareja puede enterrarse sin llegar a desovar (García et al., 2008).

El procesamiento de datos de la actividad locomotora se realizó mediante métodos de análisis de series temporales. Utilizando un software especializado (El Temps, A. Díez-Noguera, Universitat de Barcelona, 1999) se obtuvieron actogramas (diagramas de actividad locomotora a lo largo del día) y valores de acrofase (tiempo en el que se observa el valor máximo de la actividad, en este caso, la hora del día) de cada individuo. Con el fin de evaluar la existencia de un patrón rítmico de la actividad locomotora se utilizó el análisis de cosinor, el cual consiste en ajustar los datos de actividad a una función coseno por el método de los mínimos cuadrados. Mediante el test de Rayleigh se analizó la existencia de un agrupamiento de acrofases. Para realizar comparaciones en la actividad locomotora se aplicaron pruebas estadísticas paramétricas (prueba de t) para muestras pareadas y no pareadas, a menos que no cumplieran las condiciones de normalidad. En estos casos,

se aplicó la prueba no paramétrica correspondiente (prueba de Wilcoxon y Mann-Whitney, respectivamente). Se verificaron los datos para normalidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para la realización de los análisis estadísticos se utilizó el software PAST versión 2.16.

Por otra parte, para evaluar la sincronización en la actividad entre los individuos de una misma pecera en experiencia de contexto social se realizó la función de correlación de Pearson, mediante el software R (R core team, 2018).

RESULTADOS

Actividad locomotora en aislamiento

Los datos obtenidos a partir de la observación de la actividad locomotora son ilustrados mediante actogramas, los cuales se muestran de forma representativa en la Figura 5. Los individuos fueron activos tanto en fase de luz (fotofase) como en fase de oscuridad (escotofase), pero se observaron valores significativamente mayores durante la fase de luz ($65,7 \pm 10,3\%$ de la actividad total, prueba de t para muestras pareadas, $t_9 = 4,79$, $p < 0,001$; Tabla 1).

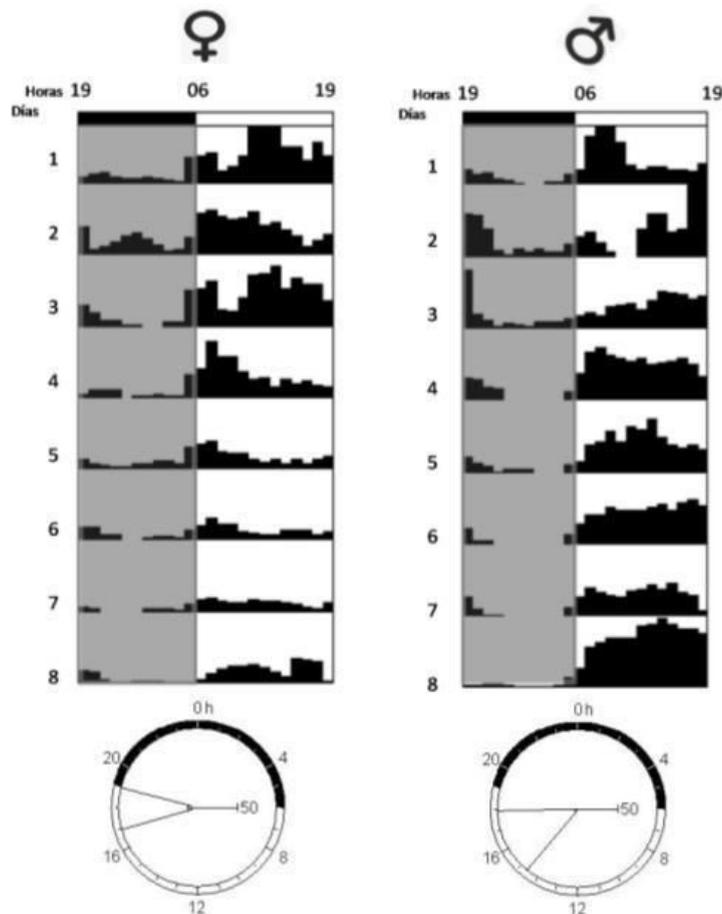


Figura 5. Arriba. Dos actogramas representativos mostrando la actividad locomotora de una hembra (izquierda) y un macho (derecha) de *Austrolebias reicherti*, bajo un ciclo 13:11 (L:O). La zona sombreada indica el período de oscuridad y la zona clara el período de luz. En el eje Y se indican los días. **Abajo.** Se asocian los diagramas de cosinor para cada individuo. En negro las horas de oscuridad. El rango horario determinado entre los radios, indica el momento del día de mayor actividad para ese individuo.

Tabla 1. Total de la actividad (cantidad de veces que cruza la línea) para cada individuo en la fase de luz (☀) y oscuridad (☾). Acrofase (momento del día de mayor actividad), considerando que la luz se apaga a las 19:00.

	ACTIVIDAD		PORCENTAJE		ACROFASE
	☀	☾	☀	☾	
Macho 1	614	343	64.1	35.9	20:35
Macho 2	738	364	67.0	33.0	16:45
Macho 3	1412	395	78.1	21.9	18:00
Macho 4	496	303	62.1	37.9	16:01
Macho 5	887	197	81.8	18.2	19:09
Hembra 1	745	597	55.5	44.5	17:56
Hembra 2	395	273	59.1	40.9	19:43
Hembra 3	719	590	54.9	45.1	19:15
Hembra 4	466	124	78.9	21.1	16:16
Hembra 5	1246	993	55.7	44.3	15:30

La actividad total no difiere entre machos y hembras (prueba de t para muestras independientes, $N_1=N_2=5$, $t_s = 0,23$, $p=0,82$). Sin embargo se puede observar una diferencia marginalmente significativa que resulta en una tendencia relevante. Los machos mostraron mayor proporción que las hembras de actividad durante la fase lumínica (♂67,0 % ±8,8 vs ♀55,5% ±10,2, prueba de Mann-Whitney, $N_1= 5$, $N_2=5$, $z= -1,67$, $p=0,095$) (Figura 6).

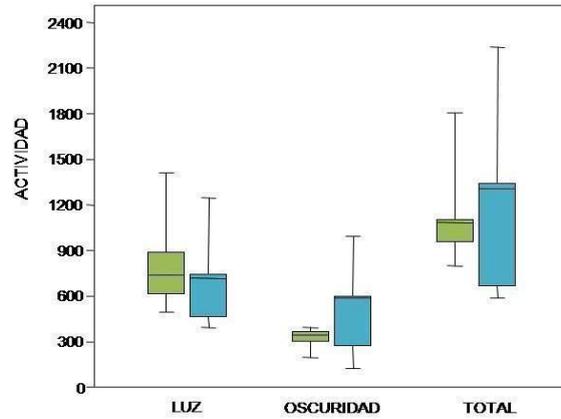


Figura 6. Actividad locomotora en aislamiento (mediana, error estándar, rango) de machos (verde) y hembras (azul) de *A. reicherti*.

Mediante el test de Rayleigh se puede apreciar poca dispersión en el momento de máxima actividad (acrofase) entre los individuos, tanto a nivel intra como inter sexual (Fig.7). Esto determina que entre tres horas antes y una hora después de que se apague la luz, es el momento del día en que tanto hembras como machos son más activos (Figura 7).

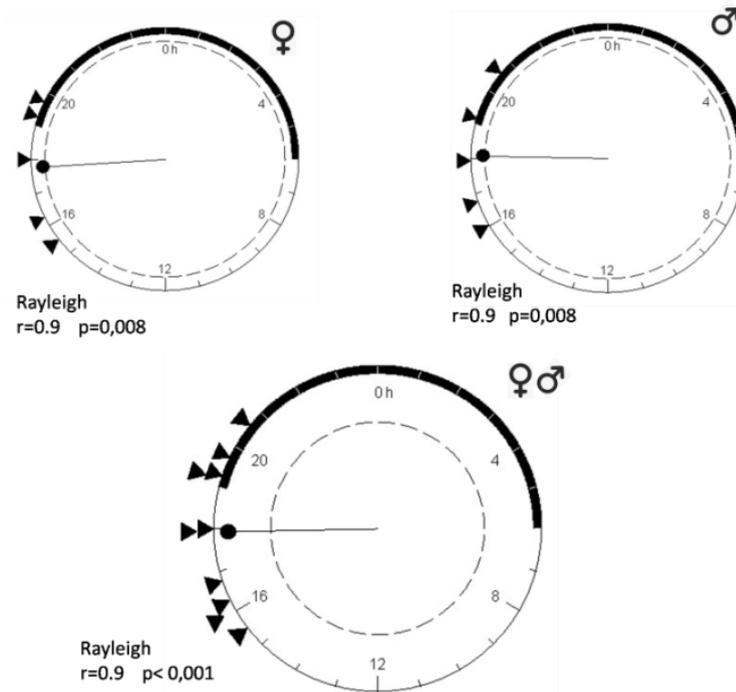


Figura 7. Test de Rayleigh para machos (n=5), hembras (n=5) y ambos sexos juntos (n=10). La barra negra representa la fase oscura. La dirección del radio resaltado indica la acrofase poblacional, y su longitud determina el valor de estabilidad rítmica (línea punteada, $p < 0,01$). El rango del valor de “r” es entre 0 y 1 ($r=1$ máxima coincidencia).

Actividad locomotora en contexto social y reproductiva

Al igual que la actividad locomotora en aislamiento los datos obtenidos se ilustraron mediante actogramas que se observan de forma representativa en la Figura 8. Los individuos muestran actividad tanto en el día como en la noche, aunque significativamente en mayor medida durante la fase de luz ($65,3 \pm 9,4\%$ de la actividad total, prueba de t para muestras pareadas, $N= 10$, $t_9= 5,16$, $p<0,001$; Tabla 2). La actividad locomotora de los miembros de cada díada se correlaciona de forma positiva en todas las parejas (Tabla 3).

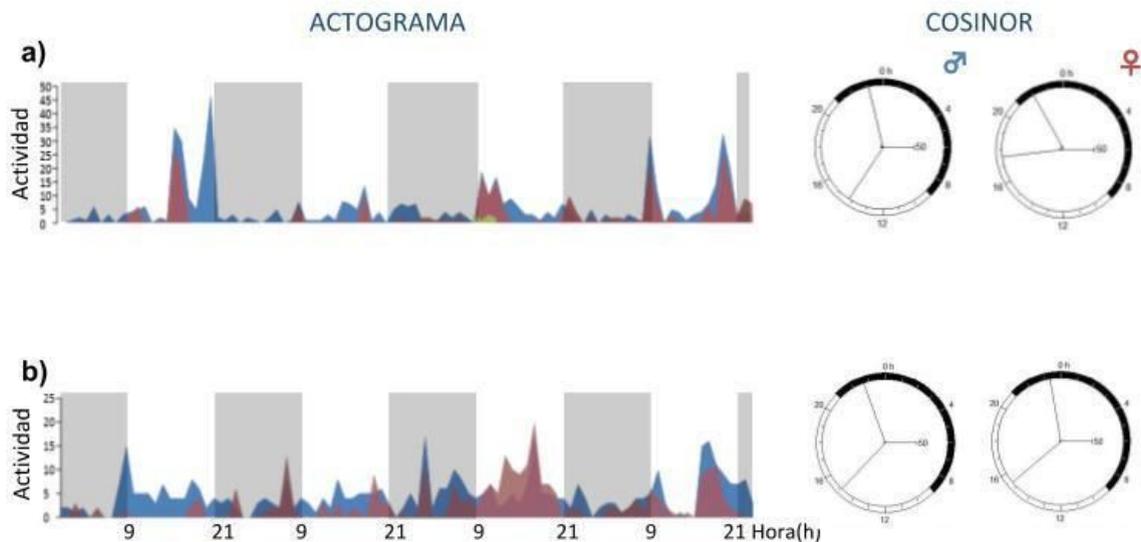


Figura 8. Dos actogramas representativos mostrando la actividad locomotora de dos díadas (a y b) de *A. reicherti*, bajo un ciclo 12:12 (L:O). Actividad de hembras (rojo) y machos (azul). La zona sombreada indica el período de oscuridad y la zona clara el período de luz. A la derecha de los actogramas se asocian los diagramas de cosinor para cada individuo de la pareja. En negro las horas de oscuridad. El rango horario determinado entre los radios, indica el momento del día de mayor actividad para ese individuo.

Tabla 2. Total de la actividad (cantidad de veces que cruza la línea) para cada individuo en la fase de luz (☀) y oscuridad (☾). Acrofase (momento del día de mayor actividad), considerando que la luz se apaga a las 21:00. Cada díada se conforma siguiendo el orden correspondiente (Macho1-Hembra1).

	ACTIVIDAD		PORCENTAJE		ACROFASE
	☀	☾	☀	☾	
Macho 1	542	214	71.7	28.3	18:40
Macho 2	992	262	79.1	20.9	18:24
Macho 3	309	227	57.6	42.4	13:09
Macho 4	429	319	57.4	42.6	21:13

Macho 5	401	294	57.7	42.3	18:47
Hembra 1	283	88	76.3	23.7	19:49
Hembra 2	826	331	71.4	28.6	19:29
Hembra 3	385	376	50.6	49.4	17:13
Hembra 4	306	168	64.6	35.4	20:58
Hembra 5	206	105	66.2	33.8	19:20

Tabla 3. Valores de correlación de la actividad locomotora entre los individuos de una misma pecera.

PAREJA	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (r)	VALOR P
1	0.70	p<0,001
2	0.56	p<0,001
3	0.49	p<0,001
4	0.37	p<0,001
5	0.47	p<0,001

La actividad total no difiere entre machos y hembras (prueba de t para muestras pareadas, N= 5, $t_4 = 1,6$, $p = 0,186$). Sin embargo se observan diferencias marginalmente significativas en la actividad durante la fase de luz (prueba de Wilcoxon N = 5, $z = 1,75$, $p = 0,079$; Figura 9), siendo el macho el más activo.

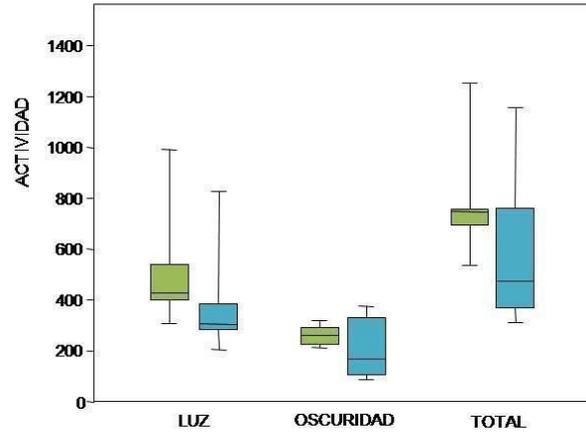
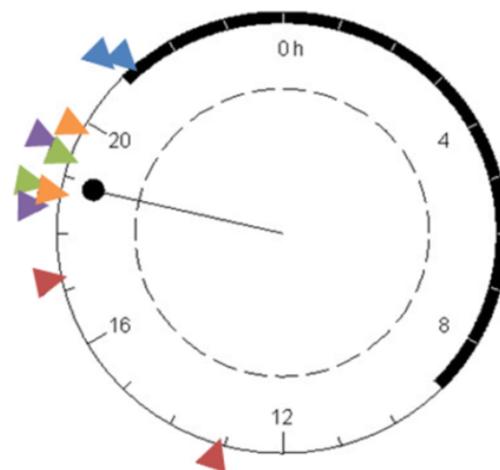


Figura 9. Actividad locomotora en contexto social (mediana, error estándar, rango) de machos (verde) y hembras (azul) de *A. reicherti*.

Mediante el Test de Rayleigh se puede apreciar muy poca dispersión entre los valores de acrofase de toda la población (Figura 10). Este pico máximo de actividad ocurre para la mayoría de los individuos (8 de 10 individuos) entre tres horas antes y una hora después de que se apague la luz. Se observa una relación entre los momentos del día de mayor actividad para los individuos de una misma díaada (Figura 10).



Rayleigh
 $r=0.86$ $p<0,001$

Figura 10. Test de Rayleigh para machos (n=5) y hembras (n=5) diferenciando cada integrante de la díaada con un mismo color. La barra negra representa la fase oscura. La dirección de la flecha indica la acrofase poblacional, y su longitud determina el valor de estabilidad rítmica (línea punteada, $p<0,01$). El rango del valor de “r” es entre 0 y 1 ($r=1$ máxima coincidencia).

Se observó actividad reproductiva en 4 de las 5 diadas. Todos los eventos ocurrieron durante la fase de luz. La mayor intensidad se registró en las primeras 4 horas de luz (59,4 % de la actividad reproductiva total; Figura 11)

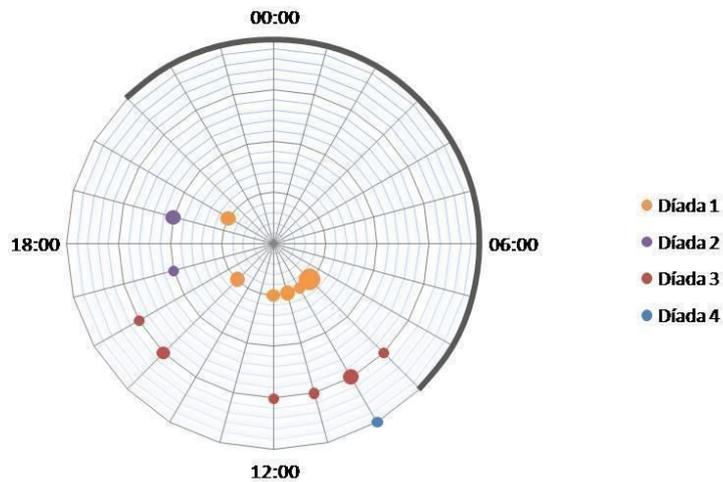


Figura 11. Actividad reproductiva, diferenciando diadas por color y nivel, para una mejor visualización. La ubicación radial indica la hora en la cual fueron registrados los eventos. El diámetro representa la intensidad (entendida como la suma de la actividad reproductiva de todos los días a esa hora, rango 1-6).

Aislamiento vs Contexto Social

Cuando comparamos la actividad total entre las dos poblaciones (aislamiento y contexto social), obtenemos un valor significativamente mayor para los individuos aislados (prueba de Mann-Whitney $N=10$, $z= -2,23$, $p= 0,023$). Estos valores de actividad significativamente mayores se mantienen tanto para la fase de luz como para la fase de oscuridad (☀ prueba de Mann-Whitney $N=10$, $z=-2,23$, $p=0,023$; ☀ prueba de Mann-Whitney $N=10$, $z=-1,9$, $p=0,052$; Figura 12).

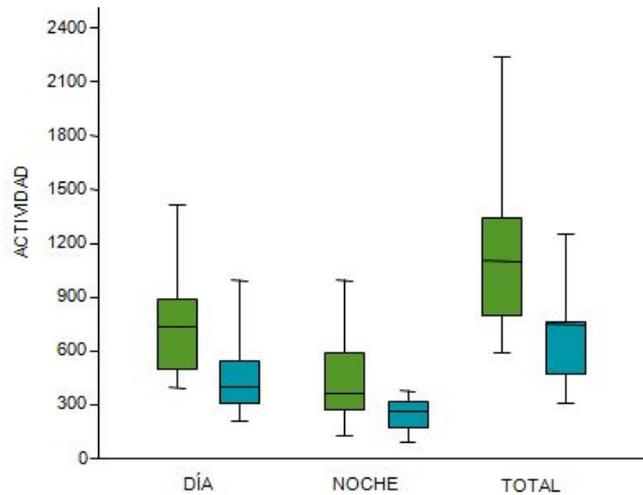


Figura 12. Actividad locomotora (mediana, error estándar, rango) de individuos aislados (verde) y en contexto social (azul) de *A. reicherti*.

DISCUSIÓN

Este trabajo evidencia la existencia de un patrón diario tanto en la actividad locomotora como reproductiva en los peces anuales *Austrolebias reicherti*. Este patrón es preferentemente diurno para la actividad locomotora y exclusivamente diurno para la actividad reproductiva. Por otra parte, se constató que el contexto social afecta el patrón de actividad circadiana, provocando una disminución de la actividad locomotora y la sincronización entre los individuos que interactúan en una misma pecera. Este trabajo representa la primera aproximación al estudio de patrones diarios de actividad en peces anuales Neotropicales.

Actividad locomotora

La actividad locomotora fue significativamente superior durante la fase de luz, tanto en aislamiento como en contexto social, respaldando la primera hipótesis planteada. Si bien este patrón difiere con estudios anteriores en otros teleósteos donde se evidenció que individuos de una misma especie muestran distintos patrones de actividad (Helfman, 1993; Iigo, 1996; Vera, 2009), los resultados son acordes con los reportados para los peces anuales africanos del género *Nothobranchius* (Hass 1976; Lucas-Sánchez, 2011, 2015; Almada-Pagán et al., 2018). Sin embargo, mientras en *Nothobranchius* se reporta una acrofase cercana al medio día, en *Austrolebias* la mayor actividad se observa hacia el ocaso. La diferencia en el momento del día de mayor actividad locomotora entre ambos géneros, puede deberse al habituamiento al régimen alimenticio en *Nothobranchius*. Todos los trabajos publicados en este género fueron realizados bajo un régimen alimenticio constante y diario, al mediodía, lo cual se sabe actúa como un potente sincronizador para

el individuo (Mistlberger, 1993; Singh et al., 2016); coincidiendo la hora de alimentación con el momento de mayor actividad.

A pesar de la diferencia en las condiciones experimentales (contexto de aislamiento/social; fotoperíodo 13:11/12:12), la proporción de actividad locomotora ocurrida durante el día, así como el momento de mayor actividad, fueron similares en ambos ensayos, sugiriendo que la conducta diurna está fuertemente establecida en la especie. El hecho que sean diurnos seguramente se relacione con la importancia de las señales visuales durante la comunicación en estos peces: coloración conspicua e intensificación de la misma durante las interacciones sociales, despliegues de atracción (cortejo) y de amenaza (comportamiento agresivo durante interacción intrasexuales) mediante extensión de aletas y movimientos ondulantes del cuerpo. Además, dentro del complejo *A. Addloffii*, al cual pertenece *A. reicherti*, las especies se distinguen exclusivamente por la coloración de los machos, lo que sugiere que el diseño de pigmentación es un carácter de reconocimiento entre especies, actuando como mecanismos de aislamiento reproductivo (García et al., 2008, Passos et al., 2016).

No hubieron grandes diferencias en los patrones desplegados entre sexos, pero sí se podrían evaluar ciertos aspectos que resultaron en tendencias considerables. En contexto de aislamiento, los machos tendieron a presentar mayor proporción de actividad durante la fase de luz que las hembras, que podría especularse como resultado de una actividad exploratoria en búsqueda de las mismas. En este sentido, se ha documentado para *Nothobranchius* que el aumento y la disminución diaria de los niveles de actividad motora masculina coinciden perfectamente con el momento en que las hembras tienen mayor cantidad de huevos maduros listos para el desove (Hass, 1967). En contexto social, también se evidenció una tendencia a niveles superiores de actividad durante la fase de luz por parte de los machos. En este caso, la mayor actividad podría ser consecuencia de los despliegues de cortejo que realizan los machos, a los que asignan un costo energético muy alto (Lindstrom, 2001).

Actividad reproductiva

Está ampliamente documentado que el momento de la reproducción está controlado por señales externas tales como los cambios estacionales en el fotoperíodo, las señales quimiosensoriales de los conespecíficos y la disponibilidad de alimentos (Fizbein, 2010). En la mayoría de los vertebrados que se reproducen por temporada, incluidos los teleósteos, el pico de la actividad reproductiva generalmente se limita a un momento específico del año (Tikariha, 2008). *Austrolebias reicherti* por la particularidad de su ciclo de vida no presenta estaciones reproductivas sino que por el contrario hay una única estación, extendida desde la madurez sexual a la muerte. A pesar de esta particularidad, los eventos reproductivos registrados mostraron un patrón de distribución similar al de especies estacionales diurnas como *Tilapia zilli* (Coward, 1999) y *Danio rerio*

(Blanco-Vives y Sánchez-Vázquez, 2009). Todos los eventos de enterramiento ocurrieron durante la fase de luz, mayoritariamente durante las primeras 4 horas del día. Estos resultados coinciden con lo reportado para poblaciones naturales en *N. guentheri*, donde la máxima intensidad de desove ocurrió en la mañana (Vrtilek y Reichard, 2016). Sin embargo, en condiciones de laboratorio, esta especie evidenció un pronunciado pico de actividad reproductiva al mediodía (Hass, 1967). Nuevamente, esta diferencia puede estar determinada por un efecto sincronizador del momento de alimentación. El hecho de que la reproducción sea un rasgo exclusivamente diurno, reafirma la relevancia del canal visual para *A. reicherti*, tanto en aspectos morfológicos (coloración, diseño, tamaño corporal), como comportamentales (despliegues de cortejo y de amenaza).

Efecto de la interacción social

Los resultados de este trabajo muestran dos efectos claros y novedosos de la interacción social sobre los patrones de actividad locomotora. Uno de ellos demuestra una clara disminución en los valores de actividad locomotora en contexto social. Por su parte, el otro factor que deriva de la interacción social, es la ajustada sincronización que presentan los individuos de una misma pecera.

Si asumimos que el sincronizador natural por excelencia es el ciclo luz-oscuridad, resultaría poco probable asignarle a las señales sociales un papel importante en la sincronización básica de los organismos con su entorno. En este caso el término señales sociales se refiere a cualquier señal periódica que se origina de un animal que tenga la capacidad de arrastrar los ritmos de otro individuo, a través de un estímulo visual, acústico, olfativo o táctil, o por alguna combinación de estímulos (Rajaratnam y Redman, 1998). Sin embargo, las señales sociales podrían tener un rol trascendente en el ajuste fino de las expresiones circadianas, principalmente, aquellas vinculadas a las interacciones sociales adaptativas (Davison y Menaker, 2003; Gil et al., 2018). El estudio de las interacciones sociales como sincronizador circadiano es sumamente complejo, ya que su efecto va a depender de la historia de vida de cada individuo, las variables ambientales, el tipo de interacción (interespecífica, coespecífica, reproductiva, maternal, agonística), el número de individuos y la edad, entre otras cosas (Oliveira et al., 2009; Favreu et al., 2009). Esto se evidencia por ejemplo en el pez *Fundulus heteroclitus*, donde la actividad circadiana varía en función de la cantidad de individuos en interacción (Kavaliers, 1980). Mientras que algunas especies responden sólo por estímulos olfativos de los conespecíficos (Governale y Lee, 2001), otras requieren contacto físico directo (Erkert y Schardt, 1991). Sin embargo, la gran mayoría de los estudios no investigan el contacto directo entre los individuos, debido a la dificultad que conlleva el registro de la actividad individual de los animales alojados en parejas o grupos. En este marco, los resultados obtenidos en *A. reicherti*, representan uno de los pocos ejemplos de interacción social directa y discriminada individualmente.

Por un lado se obtuvo una disminución considerable en la actividad locomotora en contexto social respecto al contexto de aislamiento. Una disminución en la actividad locomotora debido al efecto social ha sido también evidenciada en *Drosophila melanogaster* (Lone y Sharma, 2011), aunque ésta se analizó un tiempo después de ocurrida la interacción. En este sentido, el presente trabajo significa una novedad en el estudio de la ritmicidad diaria y su sincronización social. La disminución en la actividad locomotora en contexto social observada en *A. reicherti*, podría deberse a tres factores principales. Por un lado, teniendo en cuenta el corto ciclo de vida, que impulsa un rápido crecimiento y una actividad reproductiva sostenida desde la maduración sexual hasta la muerte (García et al., 2008), la mayor actividad locomotora en aislamiento podría ser causa de actividad exploratoria con el propósito de búsqueda de pareja reproductiva. Por otro lado, el aislamiento es considerado como un potente factor de estrés tanto en humanos como en animales (Mumtaza et al., 2018). En este sentido, se ha observado un pico en los niveles de cortisol (la hormona del estrés) anticipando la fase activa en especies de mamíferos (Mohawk y Lee, 2005) y peces (Oliveira et al., 2013). Si bien no hay en la literatura trabajos que relacionan estrés por aislamiento con los ritmos diarios, si se ha documentado en ratones que frente a una situación estresante como la interacción social agonística, el subordinado disminuye significativamente la actividad locomotora (Ota et al., 2018). Sin embargo, aunque disminuya la actividad, la acrofase y período de la actividad se mantiene estable (Ota et al., 2018). Considerando los resultados mencionados y los obtenidos en este trabajo, podríamos suponer que, aunque la actividad locomotora se vea disminuída, el reloj responsable de este ritmo parece no verse afectado por el estrés social. Por último, debe contemplarse la posible consecuencia que pueda tener la presencia del recipiente con sustrato para la oviposición usado exclusivamente en los ensayos de contexto social. Este recipiente, aparte de permitir la restricción de una zona para registrar la actividad reproductiva, puede actuar enriqueciendo el ambiente (puede ser utilizado como refugio), lo que conlleva una disminución del estrés (Fraser, 2009).

Un segundo resultado de la interacción social, es la clara evidencia de una sincronización en la actividad locomotora de la pareja. Este estudio no demuestra la potencialidad del efecto social *per se*, ya que los mismos se ven enmascarados por el ciclo luz-oscuridad. A pesar de este enmascaramiento, la significancia estadística y los valores de correlación positiva presente en todas las parejas, sustenta la segunda hipótesis planteada. Parece haber diferencias entre especies en los aspectos específicos del contacto social que causan el ajuste rítmico, por ejemplo, en roedores priman las señales olfativas (Goel y Lee, 1997), mientras que los estímulos acústicos dominan en aves (Gwinner, 1966). Sin embargo, estos estudios enfatizan en la falta de información con una fuerte estimulación social (Erkert y Shardt, 1991; Rajaratnam y Redman, 1998; Lone y Sharma, 2011).

En el mono tití, las señales acústicas son necesarias para el ajuste social, pero algunos individuos requieren de contacto físico directo (Erkert y Shardt, 1991). Cuando los animales tienen contacto físico directo, la información sobre el comportamiento del otro miembro está disponible a través de todas las modalidades sensoriales (visual, acústica, olfativa y táctil). Es posible que el contacto físico aumente la potencia de las señales sociales y, por lo tanto, la probabilidad de sincronización (Favreu et al., 2009). En consecuencia, el contacto físico directo que se impuso en este estudio permitió maximizar la probabilidad de ocurrencia de efectos sociales.

Restricciones

Durante el análisis de los resultados se evidenciaron ciertas restricciones experimentales que pudieron ser influyentes sobre el desempeño de los individuos. A las antes mencionadas, la diferencia en el fotoperíodo entre los contextos y el efecto del recipiente de oviposición, habría que contemplar otros dos factores. Uno de ellos es la consecuencia sobre la actividad locomotora que tiene el encendido repentino de la luz. Al pasar de un entorno sin luz a recibir toda la luz de forma inmediata se observó un incremento abrupto de la actividad locomotora, apreciándose en los actogramas un pico de actividad en la primera hora de luz. Para evaluar mejor este efecto sería conveniente aumentar y disminuir progresivamente la luz, simulando las condiciones naturales y así evitar los cambios drásticos. La siguiente restricción que surge del análisis de los datos es la necesidad de aumentar en futuras experiencias el número de individuos. Si bien este trabajo resulta en una variedad de datos relevantes y con sostén estadístico, un incremento en la muestra permitirá profundizar en las conclusiones.

Contribuciones y perspectivas

Los resultados obtenidos confirman las hipótesis planteadas, demostrando que en presencia del ciclo luz/oscuridad *A. reicherti* presenta un ritmo diario de actividad locomotora preferentemente diurna, con valores de acrofase cercanos al ocaso fuertemente sostenidos e independientes del contexto social. A su vez, el contexto social afecta la actividad locomotora y provoca la sincronización entre los individuos de una misma pecera, confirmando el rol de la interacción social en el ajuste fino de la ritmicidad diaria. Los resultados en contexto social por contacto directo, considerando la posibilidad de haber discriminado la actividad locomotora de cada miembro de la diada por separado, son aportes novedosos y productivos al estudio de la interacción social como sincronizador. La manipulación del fotoperíodo se está utilizando actualmente en acuicultura para inducir la maduración, controlar el desove y estimular el crecimiento en diferentes especies (Gines et al., 2003), evidenciando un interés comercial sobre la investigación en esta temática. Sin embargo, son muy pocos los estudios sobre la actividad reproductiva circadiana. Por lo

tanto, se requiere más investigación, particularmente estudios que toman en cuenta la complejidad de la vida social, para comprender los efectos de las señales sociales en interacción con las variables ambientales y su efecto sobre los ritmos circadianos.

Aunque en esencia todos los organismos deben adecuar el funcionamiento de su reloj biológico a las variaciones de su ambiente físico y social, las especies con adaptaciones extremas exhiben estrategias más manifiestas y constituyen modelos de elección para profundizar en los mecanismos subyacentes. *Austrolebias reicherti* es un modelo ventajoso para estudiar ritmos de actividad, son individuos con un corto ciclo de vida, con un tamaño relativamente pequeño y una muy buena respuesta a las condiciones de laboratorio, tanto para individuos colectados de un entorno natural como para su cría en laboratorio. El ciclo de vida particularmente corto y sometido a una extrema variabilidad de las condiciones ambientales, generan un contexto inmejorable para estudiar la influencia del ambiente sobre los patrones diarios de actividad. Los resultados que se obtuvieron de este trabajo son relevantes a la hora de planificar futuros ensayos experimentales. Lo primero a proyectar es evaluar los patrones de actividad endógenos bajo condiciones de fotoperíodo constante. En segundo lugar se podría evaluar la influencia de distintas variables ambientales, con extrema variación en condiciones naturales y que podrían ser potentes sincronizadores. En esta tesina se evaluó la influencia de la interacción social homoespecífica, pero se sabe que la información social hetero específica puede afectar cualitativamente las interacciones de las especies permitiendo una coexistencia estable, ya que de lo contrario se produciría una exclusión o extinción competitiva (Gil, 2018). Considerando que *A. reicherti* solapa su distribución con la especie cercanamente emparentada *A. charrua*, en una zona de hibridación, cabría esperar un uso diferencial del espacio y el tiempo como posible mecanismo de aislamiento reproductivo. Esto, podría dar pie a estudiar la interacción social hetero específica y su efecto sobre los patrones de actividad circadiana.

BIBLIOGRAFÍA

Almáida-Pagána P.F., C. Ortega-Sabatera C., A. Lucas-Sánchez A, de Costa J. (2018). Impact of a shift work-like lighting schedule on the functioning of the circadian system in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Experimental Gerontology* 112: 44–53

Arezo M.J., D'Alessandro S., Papa N., de Sá R.O., Berois N. (2007). Sex differentiation pattern in the annual fish *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Tissue and Cell*. 39:89–98.

Aschoff J, PoW H. (1978) Phase relations between a circadian rhythm and its zeitgeber within the range of entrainment. *Naturwissenschaften* 65: 80-84

Aschoff J., Daan S., Groos G.A. (1982). Vertebrate Circadian Systems Structure and Physiology. Cap. 1.2.

Belote D. F., M. Costa (2003). Reproductive behavior of the Brazilian annual fish *Cynolebias albipunctatus*. Arq. Mus. Nac. (Rio de J.) 61: 241-244

Berois N., Arezo M.J., Chalar C., Brauer M.M., Barros C. (2007). Ultrastructure and protein composition of the oocyte envelope in the whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*, Desmarest, 1823, Sciaenidae, Perciformes). Journal of Applied Ichthyology. 23:34–39.

Berois N., Arezo M.J., de Sá R.O. (2014). The neotropical genus *Austrolebias*: An emerging model of annual killifishes. Cell and Developmental Biology 3:136.

Blanco-Vives B., Sánchez-Vázquez F.J. (2009) Synchronisation to light and feeding time of circadian rhythms of spawning and locomotor activity in zebrafish. Physiology & Behavior 98: 268–275.

Campos-Mendoza A., McAndrew B.J., Coward K., Bromage N. (2004) Reproductive response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to photoperiodic manipulation; effects on spawning periodicity, fecundity and egg size. Aquaculture 231: 299 – 314.

Costa W.J. (2006). The South American annual killifish genus *Austrolebias* (Teleostei: Cyprinodontiformes: *Rivulidae*): Phylogenetic relationships, descriptive morphology and taxonomic revision. Zootaxa, 1213: 1–162.

Costa, W.J. (2009). Trophic radiation in the South American annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). Ichthyological Exploration of Freshwaters. 20: 179–191.

Coward K., Bromage N.R. (1999). Spawning periodicity, fecundity and egg size in laboratory-held stocks of a substrate-spawning tilapiine, *Tilapia zillii* (Gervais). Aquaculture 171: 251–267.

Dardente H, Cermakian N. (2007). Molecular circadian rhythms in central and peripheral clocks in mammals. Chronobiol. Int. 24:195–213.

Davidson, A. J., Menaker, M. (2003). Birds of a feather clock together. Sometimes: Social synchronization of circadian rhythms. Current Opinion in Neurobiology. 13:765–769.

Edwards A. L. (1976). The Correlation Coefficient Ch. 4 in *An Introduction to Linear Regression and Correlation*. San Francisco, CA: W. H. Freeman, pp. 33-46.

Erkert, H. G., Schardt, U. (1991). Social entrainment of circadian activity rhythms in common marmosets, *Callithrix jacchus* (Primates). Ethology, 87, 189–202.

Favreau A., Richard-Yris M. A., Bertin A., Houdelier C., Lumineau S. (2009). Social influences on circadian behavioural rhythms in vertebrates. Animal Behavior. 77: 983–989.

- Falcon J. M.C.** (2010). Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol*, 165, 469-82.
- Fiszbein A., Cánepa M., Rey Vázquez G., Maggese G., Pandolfi M.** (2010). Photoperiodic modulation of reproductive physiology and behaviour in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *Physiology & Behavior*. 99: 425-432.
- Fraser D.** (2009). Animal behaviour, animal welfare and the scientific study of affect. *Applied Animal Behaviour Science*. 118: 108-117.
- García G.** (2006). Multiple simultaneous speciation in killifishes of the *Cynolebias adloffii* species complex (Cyprinodontiformes, Rivulidae) from phylogeography and chromosome data. *J. Zool. Syst.* 44: 75-87.
- García D., Loureiro M, Tassino B.** (2008). Reproductive behavior in the fish *Austrolebias reicherti*. (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Neotrop. Ichthyol.* 6: 243-248.
- García D., Loureiro M., Tassino B.** (2009). Reproductive behavior in the fish *Austrolebias reicherti* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Neotrop. Ichthyol.* 6: 243-248.
- Gil M.A., Hein A.M., Spiegel O., Baskett M.L., Sih A.** (2018). Social Information Links Individual Behavior to Population and Community Dynamics. *Trends in Ecology & Evolution*. Vol. 33(7): 535-548.
- Gines R., Afonso J., Arguello A, Zamorano M., Lopez J.** (2003). Growth in adult gilthead sea bream (*Sparus aurata*) as a result of interference in sexual maturation by different photoperiod regimes. *Aquac Res.* 34:73-8.
- Goel, N., Lee, T. M.** (1997). Olfactory bulbectomy impedes social but not photic reentrainment of circadian rhythms in female *Octodon degus*. *J. Biol. Rhythms.* 12:362-370.
- Golombek D., Rosenstein R.** (2010). *Physiol Circadian Entrain.* pp. 1063-1102.
- Governale, M. M., Lee, T. M.** (2001). Olfactory cues accelerate reentrainment following phase shifts and entrain free-running rhythms in female *Octodon degus* (Rodentia). *Journal of Biological Rhythms*, 16, 489-501.
- Gwinner E.** (1966). Periodicity of a circadian rhythm in birds by species specific song cycles (Aves, Fringillidae: *Carduelis spinus, serinus serinus*). *Experientia* 22:765-766.
- Hass R.** (1976). Behavioral Biology of the Annual Killifish, *Nothobranchius guentheri*. *Copeia*, Vol. 1976, No. 1, pp. 80-91.
- Helfman G. S.** (1993). Fish behaviour by day, night and twilight. In Pitcher TJ (ed.) *Behaviour of teleost fishes*. London: Chapman and Hall, pp. 479 -512.
- Helfrich-Forster C., Engelmann W.** (2002). Photoreceptors for the Circadian Clock of the Fruitfly. *Biological Rhythms*, Edited by V. Kumar. 94-106.

Herrero M. J., Madrid J.A., Sanchez-Vazquez F.J. (2003). Entrainment to light of circadian activity rhythms in tench (*Tinca tinca*). *Chronobiol. Int.* 20:1001–1017.

Hurd M.W., Debruyne J., Straume M., Cahill G.M. (1998). Circadian Rhythms of Locomotor Activity in Zebrafish. *Physiology & Behavior*, Vol. 65, No. 3, pp. 465–472.

Iigo M., Tabata M. (1996). Circadian Rhythms of Locomotor Activity in the Goldfish *Carassius auratus* *Physiology & Behavior*. 60(3): 775-781.

Kavaliers, M. (1980). Social grouping and circadian activity of killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Biol. Bull.* 158: 69-76.

Larson E. (2004) Social stress affects circulating melatonin levels in rainbow trout. In *General and Comparative Endocrinology*. 136(3):322-327.

Lindstrom K. (2001). Effects of resource distribution on sexual selection and the cost of reproduction in sand gobies. *Am Nat.* 158: 64–74.

Lone S.R., Sharma V.K. (2011). Circadian Consequence of Socio-Sexual Interactions in Fruit Flies *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* 6(12): e28336.

Loureiro M., de Sá R.O. (1996). External morphology of the chorion of the annual fishes *Cynolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Copeia*. 4:1016–1022.

Loureiro M., García G. (2008). *Austrolebias reicherti*, a valid species of annual fish (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from southwestern Laguna Merín basin. *Zootaxa* 1940: 1–5.

Loureiro M., de Sá R.O. (2016). Diversity of Aplocheiloidei. *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution*. 1: 3-30.

Loureiro M., Borthagaray A., Hernández D., Duarte A., Pinelli V., Arim M. (2016). Diversity of Aplocheiloidei. *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution*. 8: 111-132.

Lucas-Sanchez A., Almada-Pagán P.F., Madrid J.A., de Costa J., Mendiola P. (2011). Age-related changes in fatty acid profile and locomotor activity rhythms in *Nothobranchius korthausae*. *Exp. Gero.* 46: 970–976

Lucas-Sanchez A., Almada-Pagan P.F., Martinez N. (2013). Rest-activity circadian rhythms in aged *Nothobranchius korthausae*. The effects of melatonin. *Exp Gerontol.* 48:507–16.

Lucas-Sanchez A., Martinez N., Madrid J.A., Almada-Pagán P.F., Mendiola P., de Costa J. (2014). Circadian activity rhythms during the last days of *Nothobranchius rachovii*'s life: A descriptive model of circadian system breakdown. *Chronobiol. Int.*

Mistlberger R.E. (1993). Circadian Food-Anticipatory Activity: Formal Models and Physiological Mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. Vol. 18. pp. 171-195.

Mohawk J.A., Lee T.M. (2005). Restraint stress delays re-entrainment in male and female diurnal and nocturnal rodents. *J Biol Rhythms*. 20: 245–256.

Mumtaza F., Khanc M.I., Zubaire M., Dehpoura A.R. (2018) Neurobiology and consequences of social isolation stress in animal model. A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 105: 1205–1222.

Oliveira, C., Vera, L.M., López-Olmeda, J.F., Guzmán, J., Mañanós, E., Ramos, J., Sánchez-Vázquez, F.J. (2009). Monthly day/night changes and seasonal daily rhythms of sexual steroids in Senegal sole (*Solea senegalensis*) under natural fluctuating or controlled environmental conditions. *Comparative biochemistry and physiology. A, Comparative physiology* 152: 168–175.

Oliveira C., Aparicio R., Blanco-Vives B., Chereguini O., Martín I., Sanchez-Vazquez F.J. (2013). Endocrine (plasma cortisol and glucose) and behavioral (locomotor and self-feeding activity) circadian rhythms in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) exposed to light/dark cycles or constant light. *Fish Physiol Biochem*. 39: 479–487.

Otaa S.M., D. Suchecki D., Meerlo P. (2018). Chronic social defeat stress suppresses locomotor activity but does not affect the free-running circadian period of the activity rhythm in mice. *Neurobiology of Sleep and Circadian Rhythms*. 5: 1-7.

Palmer J.D. (2002). *THE LIVING CLOCK: The Orchestrator of Biological Rhythms*. Oxford University Press. 1:1-11.

Papa N.G., Clivio G.A., Montagne J. (2016). Husbandry, Reproduction, and Embryo Culture of Annual Fishes under Laboratory Conditions. *Diversity of Aplocheiloidei. Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution*. 7: 99-110.

Paranjpe D., Kumar V. (2005). Evolution of temporal order in living organisms. *Journal of Circadian Rhythms* 3:7

Passos C., Reyes F., Tassino B., Rosenthal G.G., Gonzalez A. (2013a). Female Annual Killifish *Austrolebias reicherti* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) Attend to Male Chemical Cues. *Ethology* 119: 891–897.

Passos, C., Tassino B., Loureiro, Rosenthal G.G. (2013b). Intra and intersexual selection on male body size in the annual killifish *Austrolebias charrua*. *Behavioral Process* 96: 20–26.

Passos C., Tassino B., Reyes F., Rosenthal G.G. (2014) Seasonal Variation in Female Mate Choice and Operational Sex Ratio in Wild Populations of an Annual Fish, *Austrolebias reicherti*. *PLoS ONE* 9(7): e101649.

Passos C., Tassino B., Jalabert C., Quintana L., Silva A. (2017). Estrés y reproducción en ambientes efímeros. I Reunión de Biología del Comportamiento del Cono Sur. Buenos Aires, Argentina.

Rad F., Bozaoolu S., Gozukara S., Karahan A., Gulderen K. (2006) Effects of different long day photoperiods on somatic growth and gonadal development in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 255:292–300.

Rajaratnam S.M., Redman J.R. (1998). Social Contact Synchronizes Free-Running Activity Rhythms of Diurnal Palm Squirrels. *Physiology & Behavior*. Vol. 66(1): 21–26.

Reyes Blengini, F. (2017a). Rol de la vía estrogénica en la conducta agonística del pez anual *Austrolebias reicherti* (CYPRINODONTIFORMES, RIVULIDAE). I Reunión de Biología del Comportamiento del Cono Sur. Buenos Aires, Argentina.

Reyes Blengini F., Tassinio B., Passos C. (2017b). Females of the annual killifish *Austrolebias reicherti* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) recognize conspecific mates based upon chemical cues. *Behavioural processes*.

Sánchez J.A., López-Olmeda J.F., Blanco-Vives B., Sánchez-Vázquez F.J. (2009). Effects of feeding schedule on locomotor activity rhythms and stress response in sea bream. *Physiology & Behavior* 98: 125–129.

Sassone-Corsi P., Whitmore D., Foulkes N.S. (2000). Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature*. 404:87–91

Schulz U.H., Leuchtenberger C. (2006). Activity patterns of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Braz. J. Biol.* 66:565–574.

Sharma V.K. (1997). Photoperiodism in higher vertebrates: An adaptive strategy in temporal environment. *Indian J. Exp. Biol.* 35:427–437.

Sharma V.K. (2003). Adaptive Significance of Circadian Clocks. *Chronobiol. Int.* Vol. 20, No. 6, pp. 901–919.

Simpson B.R.C. (1979). The phenology of annual killifishes. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 44: 243-261.

Singh D., Trivedi N., Malik S., Sangeeta Rani S., Kumar V. (2016). Timed food availability affects circadian behavior but not the neuropeptide Y expression in Indian weaver birds exposed to atypical light environment. *Physiology & Behavior*. 161: 81–89.

Terzibasi E., Valenzano D.R., Benedetti M. (2008). Large differences in aging phenotype between strains of the short-lived annual fish *Nothobranchius furzeri*. *PLoS ONE*. 3: e3866.

Terzibasi E., Martinez A., Lucas-Sánchez A. (2017). The clock is ticking. Ageing of the circadian system: From physiology to cell cycle. *Seminars in Cell & Develop. Biol.* 70: 164–176.

Tikariha R., Shedpure M. (2009). Surfacing activity rhythm in *Clarias batrachus*: effect of different phases of annual reproductive cycle. *Biological Rhythm Research*. 40(3): 223–234

Vaz-Ferreira R., Sierra B., Scaglia S. (1964). Eco-etología de la reproducción en los peces del género *Cynolebias* Steindachner, 1876. Apartados de los Archivos de la Sociedad de Biología de Montevideo. 26: 44-49.

Vera L.M., Cairns L., Sanchez-Vazquez F.J., Migaud H. (2009). CIRCADIAN RHYTHMS OF LOCOMOTOR ACTIVITY IN THE NILE TILAPIA *Oreochromis Niloticus*. *Chronobiology International*, 26(4): 666–681.

Vrtilek M., Reichard M. (2016). Female fecundity traits in wild populations of African annual fish: the role of the aridity gradient. *Ecology and Evolution*.

Williams D.D. (2006). *The biology of temporary waters*. Oxford University Press, Oxford.

Los resultados generados fueron presentados en forma de póster:

- Silva A., Migliaro M., Olivera A., Seito S., Passos C., “Social modulation of the circadian rhythm in two wild neotropical fish species adapted to extreme environmental constraints”, Participación en póster presentado Society for Research on Biological Rhythms meeting. Amelia Island, Florida 2018
- Olivera A., Migliaro A., Passos C., “Actividad circadiana en condiciones de aislamiento reproductivo y contexto social del pez *Austrolebias reicherti* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). Presentación de poster I Reunión de Biología del Comportamiento del Cono Sur. Buenos Aires 2017
- Olivera A., Migliaro A., Passos C., Variación diaria de la actividad del pez anual *Austrolebias reicherti* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) , Presentación de póster IV Congreso Uruguayo de Zoología. Maldonado 2016