

Tesis de Doctorado

PEDECIBA. Área Biología, 2018

Modulación ambiental y hormonal del ritmo circadiano de la conducta eléctrica

Adriana Migliaro González

Dirección:

Dra. Ana Silva

Dr. Diego Golombek

Tribunal

Dr. Pablo Torterolo (Presidente)

Dr. Leonel Gómez (Vocal)

Dra. Gisele Akemi Oda (Vocal)

Muchas gracias a:

- Pablo Torterolo, Leonel Gómez y Gisele Oda por la dedicación y el respeto con el que leyeron y comentaron esta tesis, aportando al enriquecimiento de mi trabajo

- Diego Golombek por aceptar sumarse a la dirección de esta tesis, por su entusiasmo y respaldo.

- Ana Silva, quien guió este trabajo con la combinación improbable de confianza ciega y supervisión minuciosa. Que me sumó a su maravilloso grupo y me enseñó muchísimo más que la ciencia de hacer Ciencia. El título de Orientadora adquiere otras dimensiones cuando ella lo ejerce, muchas, muchas gracias Ana

-El Departamento de Neurofisiología Celular y Molecular del Instituto Clemente Estable por recibirme en su casa y permitir el desarrollo de este trabajo. A su Director, el Dr. Raúl Russo y a todos sus integrantes

-El Laboratorio de Cronobiología de la Universidad de Quilmes, en particular a su Director, Dr. Diego Golombek y a Carlos Caldart, quienes me recibieron durante mi pasantía de entrenamiento con El Temps

- El Laboratorio de Neurofisiología Celular y Sináptica, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina. A su Director, el Dr. Michel Borde y a mi amiga Virginia Comas quienes me recibieron durante mi pasantía de entrenamiento en registros in vitro del núcleo marcapaso de *G. omarorum*. Gracias también a Esteban Pino, Lucía Zubizarreta y Magdalena Vitar, por hacerme sentir como en mi casa

- La Facultad de Ciencias, que generosamente me permitió cumplir parte de mis tareas en el IIBCE. Una institución que confía en sus docentes y en la honestidad de su trabajo, donde he podido desarrollarme sin más techo que el de mis propias capacidades y circunstancias. A los funcionarios siempre dispuestos a colaborar, a los estudiantes, a mis compañeros docentes, a las autoridades, muchas gracias

- Los que vinieron antes: a Ruben Budelli, Angel Caputi y Omar Macadar, que compartieron conmigo su conocimiento y experiencia, sus historias y sabiduría. Me siento privilegiada.

Tuve la suerte de contar con el trabajo comprometido de muchos compañeros que ayudaron en distintas partes de este recorrido:

- Las personas que participaron y colaboraron en el trabajo de campo: todos mis compañeros del grupo UBNC, a Virginia Comas, Tatiana Seito y Victoria Moreno (incluso con Juan Martín en la panza), gracias por el aguante y el espíritu de trabajo en tan variadas y variables condiciones

- Diego Simón que se enfrascó con los cosinoros y las correlaciones y a Federico Pedraja mi asesor Matlab acá y a la distancia

- Julieta Pomi y Rossana Perrone, por los procesamientos apurados del final

- Laura Quintana por toda su ayuda en la preparación de la presentación

Mi camino siempre es mejor con compañía y por eso quiero agradecer muy especialmente a:

- La maravillosa UBNC: Ana Silva, Rossana Perrone, Cecilia Jalabert, Paula Pouso, Lucía Zubizarreta, Laura Quintana, Federico Reyes, Guillermo Valiño y Julieta Pomi. No encuentro palabras que describan realmente la gratitud de trabajar con compañeros como ustedes, cada salida tiene algo de paseo y cada jornada laboral es un poco visitar a un amigo. Donde el trabajo colectivo se pone a disposición de cada integrante y donde tengo mi lugar.

- Mis compañeras de oficina durante todo este tiempo: por la amistad espalda con espalda de Laura, la complicidad codo con codo de Lu, la visita siempre bienvenida de Roxe y el saludo matinal con Gabi Fabbiani.

- El "piso 4" y sus habitantes. A mis queridísimos compañeros: Fede Pedraja, Leo, Pelo, Yuyo, Diego, Musto, Matías, Felipe, Daniel, Nacho, Francesco, Lucía Ruiz, Gabi Vierci, Antonella y por supuesto, a la enorme presencia de Ruben Budelli. En este lugar aprendí a trabajar en un clima de respeto amistad y compañerismo, hace ya muchos años. Gracias por ser compañeros.

- El incipiente y efervescente grupo cronobiológico: Bettina, las Julietas, los Andreses, Alejo, Caco, Diego y Natxo, por darme marco de referencia, y aguantar los primeros ensayos!

- Mi socia docente y amiga Natalia Uriarte, que me despejó la cancha de clases y otras responsabilidades para que pudiera escribir. A todos los que corrieron a asistirme con mis tareas docentes: Bettina Tassino, Daniella Agratti, Federico Reyes, Diego Simón

Tengo una familia grande y hermosa que me acompaña. Porque la vida es multidimensional mil gracias a:

- Mis hermanas y primas: Lucía, Alicia, Mariana, Natalia y Paula. Rafa, Laura, Mado, la Tía Beatriz, Nacho, Nico y Jaime. Mis adorados sobrinos: Camilo, Lucía, Carmela, Leandro, Manuel, Matilde y Olivia

- Mis padres: Eduardo e Isabel de quienes aprendí el valor del esfuerzo sostenido y la tarea realizada con amor. Que me transmitieron la curiosidad por buscar la belleza que se encuentra en la base de todas las cosas y sorprenderme

-Javier: mi compañero de la vida. Sostén logístico y emocional de tanto más que esta tesis. Sin su amor omnipresente nada de esto hubiera sido posible

- Julia, Violeta y Diego. Es difícil hacer una tesis siendo madre y es difícil tener una madre que hace una tesis. Porque su existencia pone las cosas en su justa medida y así, todo se vuelve realizable.

Contenido

Resumen	6
1. Introducción	7
2. Antecedentes	8
2.1. Ritmos circadianos	8
2.2. Organización de los sistemas circadianos	9
2.3. Modulación hormonal de los ritmos circadianos	15
2.3.1. La melatonina como señal codificadora de fotoperíodo	15
2.3.2. Neuropeptidos hipotalámicos como moduladores sociales del reloj biológico	17
2.3.3. Integración melatonina-vasotocina	18
2.4. Peces eléctricos de descarga débil como modelo de estudios circadianos	19
2.4.1. La Frecuencia Basal de la DOE como conducta eléctrica	19
2.4.2. Modulación vasotocinérgica de la conducta eléctrica	22
2.4.3. Ritmos circadianos en Gymnotiformes	26
2.4.4. Presentación de las especies modelo de esta tesis	27
2.5. Puntos de partida	30
3. Hipótesis y objetivos	33
Objetivo general	33
Hipótesis	33
Hipótesis 1	33
Hipótesis 2	34
Hipótesis 3	35
4. Organización y estrategia	36
5. Metodología general	38
5.1. Colecta de animales y alojamiento	38
5.2. Registro de la conducta eléctrica	40
5.3. Aspectos éticos	42
6. El aumento nocturno de la frecuencia basal de la DOE y su ritmo circadiano	43
En este capítulo partimos de la siguiente hipótesis: el aumento nocturno de la FB-DOE de <i>Gymnotus omarorum</i> es un ritmo circadiano.	52

7. Modulación farmacológica del sistema circadiano y social	55
8. El aumento nocturno de la FB-DOE en el hábitat natural	72
9. Discusión General	84
10. Contribuciones y perspectivas	90

Resumen

Los ritmos circadianos son el producto de la existencia de relojes biológicos endógenos que se sincronizan con variables ambientales del entorno. Los Gymnotiformes son peces eléctricos sudamericanos de descarga débil, caracterizados por la emisión constante de una señal eléctrica que cumple funciones sensoriales y de comunicación en estos animales nocturnos. Las descargas del órgano eléctrico son moduladas por factores ambientales y sociales acoplándose al estado de alerta de los organismos, a su repertorio conductual e incluso a su jerarquía en la población. Esta tesis se enfoca en el análisis del aumento nocturno de la frecuencia de descarga de la señal eléctrica en la especie *Gymnotus omarorum* con un fuerte énfasis en su adaptación a las influencias ambientales y sociales del hábitat natural. Nuestros resultados demuestran que el aumento nocturno es un ritmo circadiano endógeno, que se expresa tanto en el laboratorio como en el hábitat natural, donde es modulado por factores sociales y ambientales. Mostramos también que el aumento nocturno está sometido a la neuromodulación del sistema melatoninérgico, sincronizador circadiano por excelencia y del sistema AVTérgico agente clave en la modulación del funcionamiento del cerebro social.

1. Introducción

Al tiempo es más fácil conocerlo que definirlo y durante siglos nos ha subyugado con su presencia implacable. Determina ciclos y procesos lineales y es una presencia constante en el desarrollo de la vida en nuestro planeta. La existencia de ritmos biológicos, acompasados con los ciclos naturales es una marca que denuncia el origen primigenio de todos los seres vivos y un baño de humildad para quien pretende colocar ciertas especies en sitios de élite.

El atractivo de estudiar los ritmos biológicos en peces eléctricos parece obvio. Su característica principal es una señal cíclica, que se repite unas decenas de veces por segundo y que se acelera y enlentece en respuesta a una gran variedad de estímulos. Esta conducta eléctrica media la percepción y la comunicación en una única señal que varía en respuesta al entorno social, novedad perceptual, momento del día y estación del año. Un ritmo ultradiano, sobre el que se impone un ritmo circadiano y finalmente un ritmo infradiano.

Esta tesis es un puntapié inicial en el estudio del ritmo circadiano de la conducta eléctrica en un modelo icónico para el estudio de las bases neurales de la conducta. Es por eso una confluencia de abordajes metodológicos y un intento de entender cómo se acopla el tiempo individual a la riqueza y complejidad del mundo natural.

2. Antecedentes

2.1. Ritmos circadianos

Los ritmos circadianos son ritmos biológicos de naturaleza endógena que tienen un período cercano a las 24hs (circa=cercano, diano=día), lo que denota la impronta del ritmo común a todos los seres vivos determinado por la rotación del planeta Tierra. Son la expresión de un comando rítmico generado por relojes biológicos endógenos, capaces de sincronizarse con señales externas o "zeitgebers". La generación y mantenimiento de los ritmos depende de la expresión de un grupo de genes reloj, cuya transcripción rítmica controla la actividad circadiana en todos los seres vivos (Albrecht and Eichele, 2003; Holzberg and Albrecht, 2003; Ko and Takahashi, 2006). El término "circadiano" fue introducido por el cronobiólogo Franz Halberg en 1959, aunque la existencia de estos ritmos ya había llamado la atención a varios investigadores. El botánico francés Jean-Jacques de Mairan en 1729 observó en la planta *Mimosa pudica* el ritmo de apertura diurna y cierre nocturno de sus hojas, el cual persistía aun cuando las plantas eran aisladas de la luz del sol (Refinetti et al., 2007). Su interpretación al respecto fue que las plantas recibían la información del ciclo luz/oscuridad por otra vía desconocida. También botánica, la alemana Anthonia Kleinhoonte observó en 1920 que, más allá de la persistencia en oscuridad constante, distintos individuos de la especie *Canavalia ensiformis* presentaban ritmos de apertura foliar con diferentes desfases con el ciclo día/noche. Esto fue una fuerte sugerencia de la existencia de ritmos endógenos, a los que el botánico Erwin Bünning denominó "endodiurnos". Otra importante contribución de este investigador fue la observación de que la periodicidad se mantenía de una progenie a otra, además de extender sus observaciones más allá de los vegetales, trabajando con distintas especies de *Drosophila*. Hoy sabemos que los ritmos circadianos están presentes en todos los grupos de seres vivos, de hongos a mamíferos e inclusive en los procariontes. Otro avance fundamental fue la conceptualización de la existencia de un reloj biológico encargado de generar estos ritmos. El médico francés Julien Joseph Virey en 1915, Bünning en 1936 y el zoólogo estadounidense Maynard Johnson en 1939 fueron pioneros al

mencionar la existencia de relojes biológicos. Fue Colin Pittendrigh quién más tarde completó y expandió la noción de reloj biológico. Su formación en genética y evolución le permitieron generalizar y extender sus observaciones a diversos grupos de organismos. Fueron sus trabajos en el ritmo de eclosión de *Drosophila pseudoobscura* los que derivaron en el concepto de que los relojes biológicos deben ser capaces de compensar las variaciones que la temperatura induce en la frecuencia de los osciladores biológicos. Concluyó que los relojes son entidades independientes de los ritmos que comandan y que su función va más allá de sincronizar al organismo con el entorno ya que tienen un rol temporizador de diversos ritmos en el individuo. La existencia de un reloj endógeno tenía sus detractores que postulaban que siempre era posible que la información sobre la rotación terrestre fuera externa y llegara por vía sensorial. En la década de 1960, con la realización de experimentos que cancelaban todas las influencias externas, incluso la información sobre el campo magnético terrestre, la comunidad científica terminó por aceptar la endogenicidad de los relojes biológicos (Castillo-Ruiz et al., 2012).

2.2. Organización de los sistemas circadianos

Los sistemas circadianos constan en su mínima expresión de un receptor y una vía aferente que transmite información del medio ambiente; un reloj circadiano primario y vías eferentes a través de las cuales el oscilador regula y coordina la expresión de diferentes ritmos (Golombek and Rosenstein, 2010). La ubicación de este reloj primario fue tema de abundante debate en la historia de esta disciplina. Experimentos pioneros de James Truman y Lynn Riddiford (Truman and Riddiford, 1970) realizados en polillas demostraron que el reloj biológico que comandaba la fase del ritmo de eclosión se encontraba en el cerebro ya que su remoción abolía dicho ritmo. Además, demostraron que la comunicación con el resto del organismo ocurría por vía endócrina, ya que el ritmo podía recuperarse por implante del cerebro en el abdomen y que existían diferencias especie específicas codificadas por las estructuras neurales implantadas. Más adelante se identificaron relojes endógenos en el lóbulo óptico de la cucaracha

(*Leucophaea maderae*), glándula pineal del gorrión (*Passer domesticus*) y núcleo supraquiasmático de rata (*Rattus norvegicus*) en este orden.

Los relojes circadianos están conformados por células donde la expresión rítmica de ciertos genes, denominados genes reloj, produce oscilaciones con un período determinado que posteriormente modulan la emergencia de conductas y/o la ocurrencia de procesos fisiológicos. En animales vertebrados y artrópodos un marcapaso neuronal central sincroniza la actividad de múltiples osciladores presentes en el organismo.

2.2.1. El sistema circadiano en mamíferos

En mamíferos el marcapaso circadiano “maestro” está ubicado en el núcleo supraquiasmático (NSQ), ubicado sobre el quiasma óptico en el hipotálamo ventral. Su endogenicidad ha sido demostrada por experimentos *in vitro*, su necesidad y suficiencia por experimentos de lesiones y trasplantes (Ibuka et al., 1977; Inouye and Kawamura, 1979; Ralph et al., 1990). El reloj maestro coordina la actividad de los demás relojes del organismo. En mamíferos, los primeros ejemplos de estos relojes secundarios fueron descritos en las glándulas adrenales en el hámster y corazón de rata, estructuras que demostraron tener ritmos endógenos al analizarse en preparaciones aisladas (Andrews and Edgar Folk, 1964; Tharp and Edgar Folk, 1965).

El reloj central debe sincronizarse con el ciclo diario día-noche para poder ofrecer una representación adecuada de los cambios en el entorno. La señal externa más conspicua es el ciclo día/noche, que además tiene una óptima relación señal-ruido. La temperatura también presenta un ciclo diario asociado a la rotación terrestre y es una señal sincronizadora para los relojes circadianos. Otros sincronizadores ambientales son los ciclos diarios de la lluvia en algunas zonas ecuatoriales, disponibilidad de comida, ritmo de actividad de los predadores o la propia actividad de la comunidad (Bovet and Oertli, 1974; Davidson and Menaker, 2003). El mecanismo de sincronización de los ritmos del organismo con el ciclo diario terrestre se denomina “entrainment” en cronobiología que podría traducirse como “enganche de fase”. En los sistemas circadianos este acoplamiento es mediado por señales sensoriales que sincronizan al reloj maestro que a su vez produce información temporalmente ajustada la cual regula la actividad de otros sectores del organismo. Estos

blancos pueden ser a su vez relojes endógenos secundarios y puede tratarse de estructuras centrales o periféricas. El NSQ de los mamíferos está innervado por el haz retino hipotalámico, formado por axones de un subgrupo de células ganglionares que contienen el fotorreceptor melanopsina (Hattar et al., 2002). La señal cíclica de luz y oscuridad entrena el ritmo endógeno de los NSQ, que a su vez comanda la producción de melatonina en la glándula pineal. La melatonina es la hormona temporizadora del organismo y su ritmo de secreción en mamíferos está estrechamente ligado a la actividad de los NSQ. En un organismo sincronizado con el ciclo día/noche, la melatonina presenta un patrón de secreción que coincide estrictamente con la noche señalando su ocurrencia y duración. La melatonina actúa a nivel de múltiples blancos en el organismo con diversas acciones reguladoras. La condición de diurnidad o nocturnidad depende entonces del circuito neural que interpreta la señal hormonal nocturna (Idda et al., 2012).

2.2.2. El sistema circadiano en peces teleósteos

La identificación de modelos experimentales novedosos para el estudio cronobiológico es de fundamental importancia para el conocimiento de las estrategias generales y mecanismos subyacentes a la organización temporal de los sistemas biológicos. Los modelos tradicionales de artrópodos y mamíferos han dado lugar a importantes avances en el conocimiento en esta área, mostrando que la coexistencia de distintos modelos es también una estrategia ventajosa para su estudio. Si bien en mamíferos el sistema circadiano es mayoritariamente lineal y jerárquico, otros vertebrados, así como los insectos, presentan variaciones a este esquema, con osciladores endógenos distribuidos y acoplados. En vertebrados no mamíferos existen tres estructuras centrales que funcionan como relojes circadianos: el núcleo supraquiasmático, la glándula pineal y la retina. En distintas especies alguno de éstos, dos o los tres relojes pueden estar actuando como relojes acoplados para marcar el ritmo circadiano del organismo (Menaker et al., 1997).

Gran parte del conocimiento sobre el sistema circadiano en peces proviene del pez cebra, *Danio rerio*, modelo abundantemente usado por sus diversas ventajas entre las que se cuentan la batería de herramientas moleculares y genómicas disponibles, así como su alta tasa de reproducción (Haffter et al., 1996). Se han

descrito múltiples relojes, a nivel central y periférico que son endógenos y fotosensibles lo cual establece las bases de su potencial capacidad de sincronizarse con el ciclo día/noche (Cahill et al., 1998; Hurd et al., 1998; Whitmore et al., 2000), situación que se asemeja a lo descrito en algunas especies del género *Drosophila* (Plautz et al., 1997), poniendo en evidencia un diseño conservado en la evolución. La actividad locomotora del pez cebra también está regulada por el sistema circadiano y se han identificado mutantes que presentan ritmos alterados a nivel celular, tisular y conductual (Cahill et al., 1998).

Contrariamente a lo que ocurre en mamíferos, el sistema circadiano en peces muestra una impresionante flexibilidad tanto en su organización como en la plasticidad de los ritmos que coordina, ilustrada por ejemplo por la existencia de especies de peces que exhiben conductas diurnas y pueden cambiar su fase de activación dependiendo de la estación o incluso en la ontogenia (Idda et al., 2012).

A nivel del sistema nervioso, tanto la retina como la glándula pineal son osciladores circadianos endógenos sincronizables con el fotoperíodo. El reloj circadiano endógeno se sincroniza con el ambiente mediante su asociación con fotorreceptores que contienen melanopsina y sensan la luminosidad ambiente. La producción endógena de melatonina tiene un ritmo circadiano comandado por este reloj e inhibido por la presencia de luz ambiental. Al igual que en el resto de los vertebrados, la melatonina se secreta durante toda la fase de oscuridad, su síntesis y liberación están en fase con el ciclo día/noche. Mientras que la melatonina retiniana tiene función parácrina, la melatonina secretada por la glándula pineal es liberada al torrente sanguíneo (Falcon et al., 2010; Idda et al., 2012).

En los vertebrados no mamíferos, la glándula pineal contiene todos los elementos requeridos para ser considerada un reloj endógeno: es fotosensible y contiene un oscilador intrínseco (Falcon et al., 2010), y es considerada el reloj o marcapaso maestro de los peces. Los fotorreceptores de la glándula pineal comparten propiedades estructurales y funcionales con los receptores de la retina incluso a nivel génico y el fotopigmento involucrado es la melanopsina (Migaud et al., 2010).

La influencia temporizadora de la glándula pineal tiene dos vías, la endócrina, mediada por la melatonina y la neural sostenida por las proyecciones de las neuronas pineales a diversas áreas centrales diencefálicas como el área preóptica del hipotálamo (POA) y el NSQ (Masai et al., 1997; Yáñez et al., 2009). Por lo tanto, la glándula pineal transduce la información fotoperiódica en una señal neuronal y endócrina (Figura 2.1).

Las estructuras blanco de la glándula pineal pueden a su vez ser relojes circadianos endógenos y fotosensibles (Falcon et al., 2010). En este punto vale la pena mencionar la importante diferencia en la jerarquía que ocupa el NSQ de los teleósteos respecto a lo observado en mamíferos. Del tradicional esquema retina-NSQ-glándula pineal que caracteriza a estos últimos, se pasa a un sistema donde el NSQ es uno más de tantos osciladores bajo la influencia de la glándula pineal, que tampoco es el único reloj circadiano endógeno del cerebro.

En la vecindad del NSQ, el POA es un reloj endógeno, blanco melatoninérgico, área de síntesis de AVT y de integración y modulación del cerebro social (Dewan et al., 2008; Falcon et al., 2010; Maruska, 2009; Perrone et al., 2014) y es por lo tanto un área de gran importancia en el vínculo entre los ritmos circadianos y la conducta.

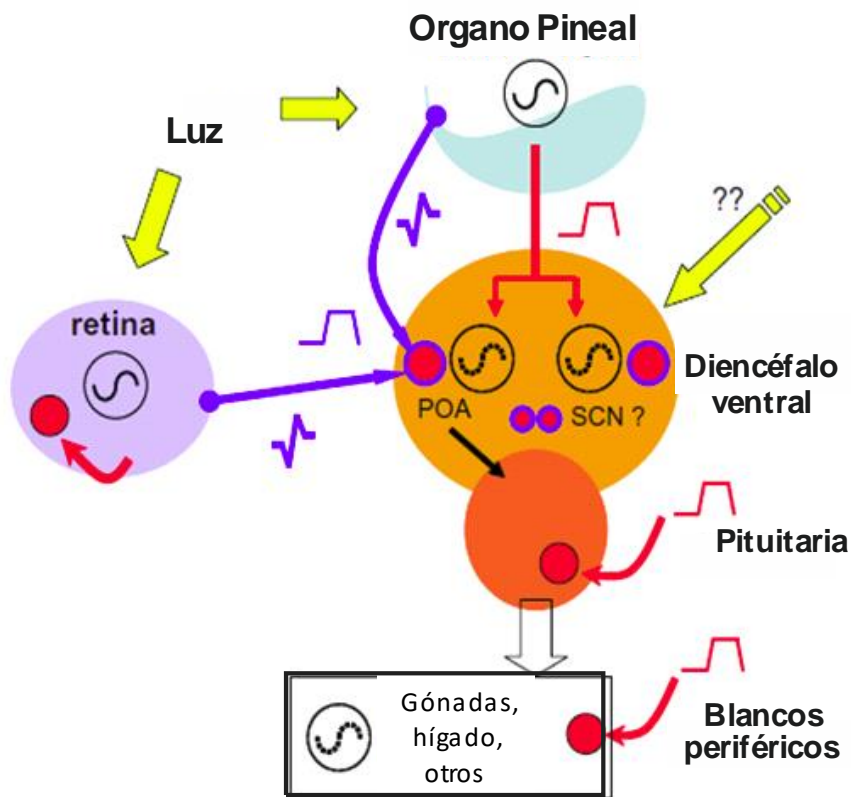


Figura 2.1. Esquema de la regulación fotoneuroendócrina en teleosteos. La luz (flechas amarillas) sincroniza los relojes endógenos de la glándula pineal y la retina. La luz también puede actuar sobre otras estructuras fotosensibles del diencéfalo como POA y estructuras hipotalámicas, además de sincronizar osciladores periféricos. En respuesta al estímulo luminoso la retina y la glándula pineal generan dos tipos de información rítmica. La neural (flechas violetas) alcanza el diencéfalo por los haces retinohipotalámico y pineal respectivamente. Estas vías proveen información sobre la duración del día así como sobre variaciones sutiles en la iluminación ambiente. La vía hormonal melatoninérgica (flechas rojas) provee información sobre la duración del día y la estación del año. Tiene función parácrina y autócrina en la retina mientras que la melatonina sintetizada en la glándula pineal se libera al líquido cefaloraquídeo y sangre actuando en los sitios blanco a través de receptores específicos (círculos rojos). La melatonina puede sincronizar otros osciladores (?) a distintos niveles del sistema nervioso central y tejidos periféricos. Tomado de Falcón et al, 2010.

2.3. Modulación hormonal de los ritmos circadianos

2.3.1. La melatonina como señal codificadora de fotoperíodo

El reloj pineal comanda la síntesis rítmica de melatonina cuyos niveles aumentan en la noche y disminuyen en el día como resultado de la regulación sobre la transcripción de la serotonina N-acetyl-transferasa (AANAT), una enzima clave de su síntesis (Figura 2.2). Esta enzima es codificada por los genes: *aanat1* de expresión retineana y *aanat2* que se expresa en la pineal (Falcón et al., 2003; Gothilf et al., 1999). La expresión de esta enzima es modulada por el reloj circadiano y suprimida ante la presencia de luz incluso durante la noche (Appelbaum et al., 2006; Ziv et al., 2007).

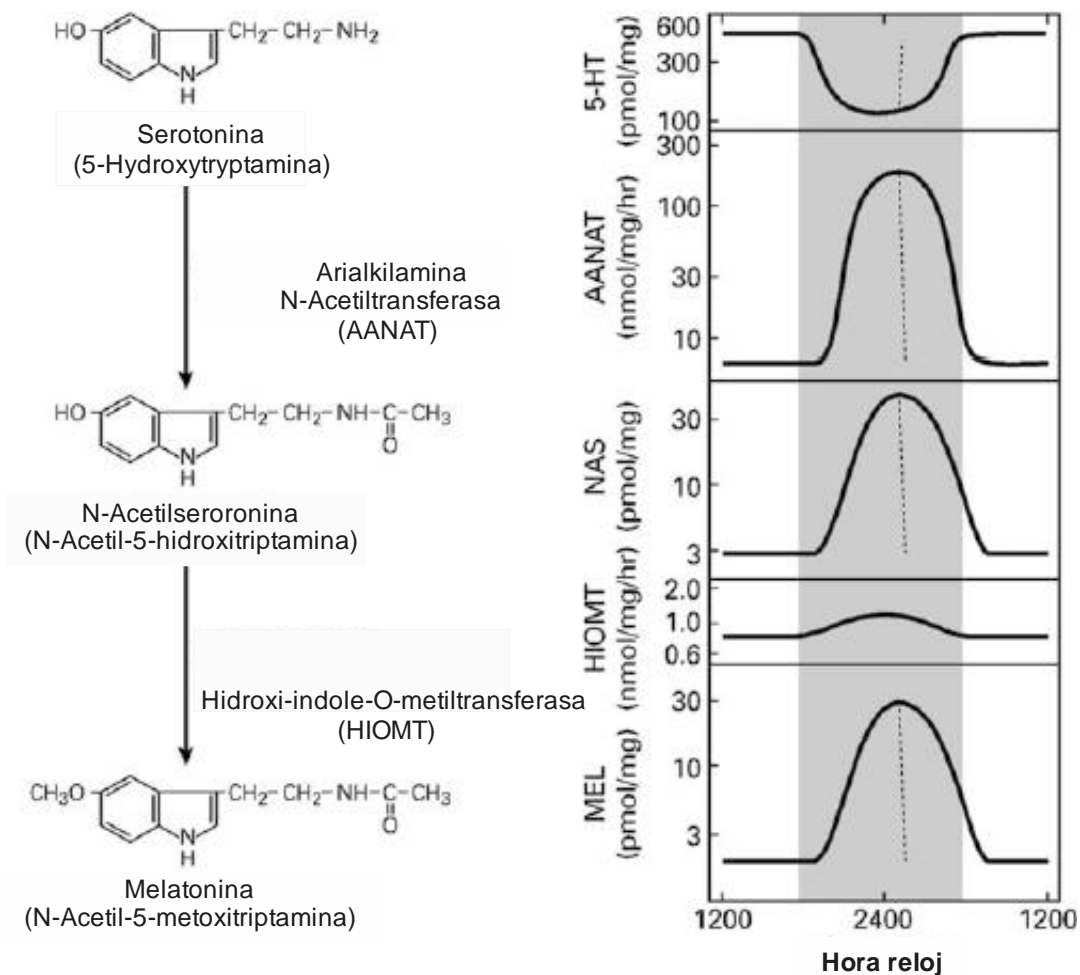


Figura 2.2. Síntesis de melatonina. A la izquierda la vía de síntesis de melatonina a partir de la serotonina. A la derecha, ritmo diario de concentraciones en plasma de las enzimas y productos ilustrados en la vía melatoninérgica. El área sombreada representa las horas de la noche. Tomado de Falcón et al, 2010.

La concentración de melatonina en sangre presenta un pico en la fase de oscuridad en todos los vertebrados. Dicho pico de melatonina está regulado en duración y amplitud por distintos factores relacionados con la señal luminosa: duración de la fase de oscuridad, intensidad de la luz y componente espectral de la misma. También la temperatura es capaz de regular el pico de la señal debido a las variaciones que induce en la actividad de la enzima AANAT. Esto hace de la melatonina una señal ideal para reflejar cambios circadianos y circaanuales, regulando diversas funciones del organismo. Mientras que en mamíferos, la glándula pineal es la fuente melatoninérgica por excelencia, en los demás vertebrados la melatonina producida en la retina e incluso en otras áreas fotosensibles del organismo, tiene un rol igualmente importante como señal circadiana. La organización circadiana de vertebrados no mamíferos parece ser una red más o menos descentralizada de osciladores circadianos ubicados en distintas áreas, con distinto grado de conectividad entre sí (Menaker et al., 1997). Las variaciones circadianas del sistema melatoninérgico no se restringen a la síntesis y liberación de la melatonina. Los receptores melatoninérgicos presentan variaciones circadianas en su expresión y distribución en un amplio abanico de especies. En ratas, se observó que los receptores del tipo MT1 se encuentran en el NSQ y el quiasma óptico al atardecer, pero solamente en el NSQ a medio día (Waly and Hallworth, 2015). En el pez teleósteo *Carassius auratus* se ha demostrado un ritmo circadiano de la densidad de sitios de unión de la melatonina en retina y pineal, con un máximo próximo al atardecer y un mínimo cercano al amanecer tanto en animales mantenidos en ciclo 12:12 como en oscuridad constante (Iigo et al., 2007). En esta línea, el pez *Paralichthys olivaceus* muestra un ritmo circadiano de expresión de los receptores de melatonina en las mismas áreas, que aumenta en la noche y disminuye en el día (Shin et al., 2011).

La melatonina presenta regularidades casi universales en las especies que la expresan: es la señal temporizadora por excelencia, tiene un ciclo de síntesis y liberación extremadamente preciso y sincronizado con la noche y sus receptores se distribuyen en zonas análogas del cerebro. La señal melatoninérgica media la sincronización temporal en una gran variedad de funciones neuroendócrinas y comportamentales, en particular las relacionadas con la alimentación y el crecimiento, la función reproductiva y las interacciones intraespecíficas (Pinillos

et al., 2001). Sin embargo, vale la pena mencionar que estos efectos varían según la especie y pueden ser incluso opuestos, particularmente entre especies que explotan distintos nichos temporales. Explorar esta diversidad es esencial para entender de qué manera esta hormona coordina temporalmente las respuestas fisiológicas y conductuales de los organismos.

2.3.2. Neuropeptidos hipotalámicos como moduladores sociales del reloj biológico

El comportamiento social en vertebrados está regulado por una red conservada de estructuras altamente interconectadas del sistema límbico en cerebro anterior y mesencéfalo, la red del cerebro social (RCS) (Goodson, 2005; Goodson and Kabelik, 2009; Newman, 2006). Las variaciones en la actividad de esta red generan la diversidad de comportamientos observables entre individuos de distintas especies, de coespecíficos en una misma población, o incluso en un mismo individuo en diferentes etapas de su ontogenia. Las modulaciones de esta red dependen de la acción de neuromoduladores entre los que se destacan los neuropeptidos hipotalámicos (Goodson and Kabelik, 2009). Las variaciones diarias de la conducta evidencian una regulación temporizadora de la RCS y varias de las áreas que la conforman son blanco de la modulación melatoninérgica (Falcon et al., 2010; Newman, 2006). El neuropeptido hipotalámico arginina vasotocina (AVT) y su homólogo en mamíferos, arginina vasopresina, es un integrador clave en la modulación especie específica de la conducta en vertebrados a nivel sexual, individual y grupal (Goodson, 2008; Goodson and Bass, 2001; Insel and Young, 2000). La estructura de AVT y de sus receptores está altamente conservadas, lo cual contrasta con la alta especificidad de sus acciones en las diversas especies estudiadas. El AVT se ha relacionado con cambios conductuales asociados a la estacionalidad y a las variaciones diarias de la conducta (De Vries and Panzica, 2006; Goodson, 2008; Goodson and Bass, 2001). Los estudios comparativos del sistema AVTérgico han sido extremadamente valiosos para comprender la evolución en los mecanismos neurales que regulan la conducta social en mamíferos (Wang et al., 1998), aves (Goodson, 1998), y peces (Dewan et al., 2008). En vertebrados anamniotas (anfibios y peces) las neuronas AVTérgicas se localizan en el POA en forma homóloga a la ubicación en los amniotas en los núcleos supraóptico y

paraventricular del hipotálamo (Moore and Lowry, 1998). En algunos teleósteos, se han descrito neuronas AVTérgicas en otras áreas hipotalámicas (Thompson and Walton, 2009) aunque no hay reportes de su presencia en la glándula pineal. En cambio, en la glándula pineal de mamíferos hay poblaciones de células AVTérgicas que han sido implicadas en la regulación del sueño (Badiu et al., 1999; Pavel et al., 1975).

La relación entre el sistema circadiano y el cerebro social en teleósteos es bidireccional. Por un lado, la glándula pineal ejerce una influencia temporizadora por vía neural y endócrina sobre núcleos involucrados en la regulación de la conducta, en particular sobre el POA. A su vez, el POA está postulado como reloj endógeno en algunas especies (Falcón et al., 2010). Asimismo, el AVT producido por el POA actúa a nivel de los núcleos de la RCS y de efectores de conductas adaptables al contexto social y temporal (Goodson, 2005). Se ha demostrado por otra parte, la acción melatoninérgica en estos núcleos (Feng and Bass, 2016) y en consecuencia su efecto temporizador sobre conductas sociales.

2.3.3. Integración melatonina-vasotocina

La regulación del comportamiento debe necesariamente adaptarse al ritmo circadiano y estacional de la especie, adaptación en la cual la señal melatoninérgica tiene un papel esencial. Su efecto temporizador alcanza diversas respuestas fisiológicas y conductuales adecuando su expresión y sus ciclos al nicho temporal explotado por los organismos. Junto con el ritmo diario de secreción melatoninérgica existe un ritmo estacional ya que tanto la temperatura como la duración de la noche afectan la secreción de melatonina en amplitud y duración respectivamente (Falcon et al., 2010). Este ritmo estacional está en la base de la ritmicidad anual, infradiana, que caracteriza procesos fisiológicos y conductuales como los de la reproducción o hibernación. Es relativamente poco lo que se sabe sobre la influencia de la melatonina en las bases neurales de la conducta social. Sin embargo, algunos autores han puesto en evidencia el vínculo entre el sistema melatoninérgico y las vías de neuropéptidos hipotalámicos y neuroesteroides en teleósteos (Falcon et al., 2010; Maitra et al., 2012), en anfibios (Lutterschmidt and Wilczynski, 2012), aves (Chowdhury et al., 2010) y mamíferos (Pavel S Fau - Goldstein et al.). En el

teleósteo diurno *Halichoereste nuiispinis* la abundancia del transcripto de AVT (ARNm de AVT) es mayor a mediodía que a medianoche y el tratamiento con melatonina las 11:00 hs la disminuye (Kulczykowska, 1999). La acción melatoninérgica sobre la abundancia de neuronas que contienen AVT puede presentar además ritmos estacionales y dimorfismo sexual (Lutterschmidt and Wilczynski, 2012). Los cambios en el fotoperíodo señalizados internamente por cambios en el pulso de melatonina influyen sobre el sistema AVTérgico y vasopresinérgico induciendo cambios diarios y estacionales en la conducta y el estado reproductivo en peces y ratones (Ben-Zaken et al., 2013; Rodríguez-Illamola et al., 2011).

2.4. Peces eléctricos de descarga débil como modelo de estudios circadianos

El Orden Gymnotiformes incluye a todas las especies de peces eléctricos neotropicales de agua dulce de hábitos nocturnos que emiten continuamente descargas eléctricas de baja intensidad (cientos de mV). Estas descargas son producto de la activación de un órgano eléctrico (OE) periférico y se denominan descargas del órgano eléctrico (DOE). Forman parte de una refinada modalidad sensorial denominada electrorrecepción activa (Lissmann, 1958) que permite al animal localizar objetos de conductividad eléctrica distinta de la del agua. La DOE se repite con una frecuencia basal (FB-DOE) estable que depende de la especie y a su vez es modulada por factores perceptuales y sociales, siendo al mismo tiempo portadora de estímulos sensoriales para el propio pez y canal de comunicación entre individuos de la misma especie.

2.4.1. La Frecuencia Basal de la DOE como conducta eléctrica

La DOE de los peces Gymnotiformes es una señal especie específica cuya forma de onda resulta del patrón de inervación y la secuencia de activación de las células que componen el órgano eléctrico (electrocitos). Según su patrón de descarga se clasifican en peces de onda y peces de pulso. Los de onda presentan descargas sinusoidales y continuas mientras que los de pulso tienen DOEs cortas (pocos ms) separadas por intervalos donde no hay descarga. La duración de estos intervalos o el período de la onda sinusoidal determinan la FB-

DOE. La generación y FB-DOE es comandada por un núcleo del tronco encefálico denominado Núcleo Electromotor Bulbar (NEB) o núcleo marcapaso, mientras que la forma de onda depende de la secuencia de activación y excitabilidad del OE (Figura 2.3). El NEB y el OE tienen una relación de activación 1:1. El NEB está compuesto por dos tipos de neuronas (Bennett et al., 1967): las células marcapaso (MP) y las relé (R). Las MP están acopladas entre sí y excitan a las R a través de sinapsis mixtas. Estas últimas proyectan sus axones hacia las electro motoneuronas espinales que inervan los electrocitos del OE (Caputi & Trujillo-Cenóz, 1994). En condiciones basales, la FB-DOE está determinada por las MP que, a su vez, son moduladas por núcleos superiores (premarcapaso: diencefálico y sublemniscal) que activan vías que inducen los cambios de frecuencia de descarga en contextos conductuales específicos (Zakon, 1993). Los cambios en el entorno del animal producen cambios en el patrón de emisión de la DOE. Existen al menos dos estructuras premarcapaso cuya actividad incide en la estructura temporal de la DOE: la región denominada "complejo del núcleo central posterior talámico" y el núcleo premarcapaso (CP/PPN respectivamente) (Heiligenberg et al., 1981) y el núcleo sublemniscal (sPPN) (Kawasaki and Heiligenberg, 1989; Keller et al., 1991). El NEB es entonces modulado por señales de diversa procedencia, las cuales inciden en su actividad y, por esta vía, en la FB-DOE, así como en cambios breves y abruptos en la estructura temporal del tren de descargas denominados "señales eléctricas sociales" tales como aceleraciones breves (chirps) o interrupciones y que tienen un rol comunicativo (Hagedorn and Heiligenberg, 1985). Tanto las estructuras pre-marcapaso como el NEB reciben la inervación de fibras AVTérgicas que podrían actuar en la modulación social de este canal de comunicación (Perrone et al., 2014; Pouso et al., 2017).

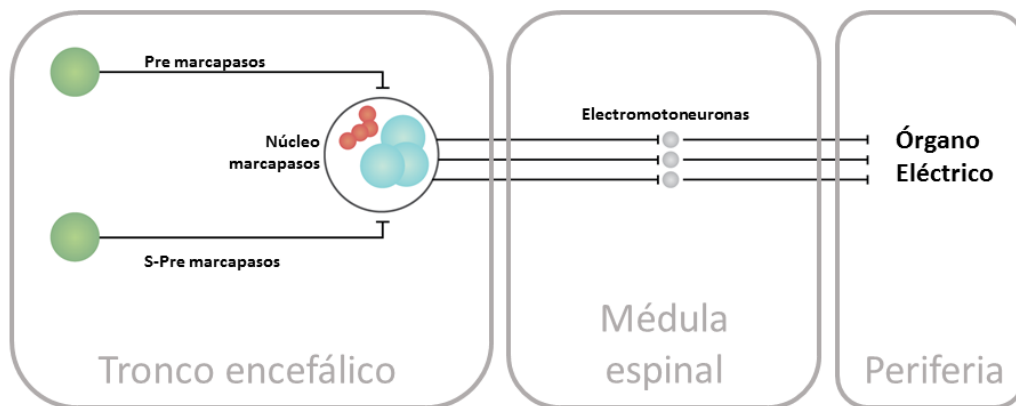


Figura 2.3. Esquema de la vía electrogénica. El núcleo marcapaso o NEB presente en el tronco encefálico comanda la DOE mediante la activación de las motoneuronas espinales que a su turno inducen la descarga de los electrocitos presentes en el órgano eléctrico. El NEB puede ser modulado por influencias de los núcleos premarcapasos.

La DOE es un despliegue conductual que codifica información, en su frecuencia y forma de onda, sobre la identidad, sexo y estado fisiológico del individuo (Bullock et al., 2005). Las modulaciones de la FB-DOE dependen de factores ambientales, en particular y en forma muy importante, de la temperatura del agua, en una relación directa determinada por la influencia térmica sobre los procesos fisiológicos de los poiquiloterms (Ardanaz et al., 2001). Por otra parte la DOE es la energía portadora de los estímulos electrosensoriales (Aguilera et al., 2001). La alerta en los peces eléctricos implica un incremento en la FB-DOE que tiene como consecuencia un aumento en la cantidad de información sensorial disponible para el sistema perceptual. Los movimientos exploratorios, la respuesta a estímulos inesperados, la respuesta de escape e incluso la voluntad, se asocian con incrementos en la FB-DOE. En los peces eléctricos sudamericanos, la detección de un estímulo novedoso se asocia con un incremento rápido y transitorio de la FB-DOE, de algo menos de 1 s de duración, modulación conocida como respuesta de novedad (Capurro, 1994; Caputi et al., 2003). La activación de la célula de Mauthner que desencadena la respuesta de

escape también genera un aumento en la FB-DOE, repentino y algo más prolongado que la respuesta de novedad (Falconi et al., 1995). En estudios previos sobre las variaciones de la FB-DOE basal, estas se han registrado asociadas a variaciones en la locomoción. Ambos despliegues se encuentran aumentados en la noche en varias especies de Gymnotiformes (Black-Cleworth, 1970; Jun et al., 2014; Kawasaki and Heiligenberg, 1989). Hasta el momento no se ha determinado si la ocurrencia conjunta de estos despliegues se debe a un comando común o si podrían ser dissociables. Si bien la nocturnidad de los gymnotiformes no está en discusión, así como tampoco el incremento en la actividad exploratoria que ocurre en la noche, es fundamental la segregación de los componentes locomotor y eléctrico que están involucrados en esta conducta de exploración. La mutua influencia de ambos componentes ha sido una dificultad a la hora de analizarlos por separado como características independientes.

Más aún, recientemente se ha demostrado la ocurrencia de incrementos transitorios en la FB-DOE inmediatamente antes del inicio del movimiento, un despliegue conductual que ha sido señalado como evidencia de voluntad (Jun et al., 2014). A grandes rasgos, se podría considerar que los factores que modulan la FB-DOE pertenecen a dos categorías: los que incrementan el flujo de información sensorial (por ejemplo, la respuesta de novedad) o los que adecúan las emisiones del animal a un cierto contexto social (señales eléctricas sociales). De esta manera, la modulación de la FB-DOE estaría asociada a la función electroreceptiva o a la electrocomunicativa, respectivamente. En este marco, se concibe a la DOE como un despliegue conductual, una conducta eléctrica, y a la FB-DOE como el parámetro fundamental para explorar las modulaciones que el sistema nervioso central ejerce sobre esta conducta para adecuarla a las demandas del ambiente tanto físico como social.

2.4.2. Modulación vasotocinérgica de la conducta eléctrica

El contexto social es un importante modulador de la FB-DOE así como un determinante de la producción de señales eléctricas sociales (Perrone and Silva, 2018). En línea con lo reportado en forma general en vertebrados, la modulación social de la conducta eléctrica está consistentemente asociada a la acción de neuropéptidos hipotalámicos, y en particular del AVT. En otras especies de

peces teleósteos se ha demostrado que la administración exógena de AVT modula el comportamiento de cortejo en machos (Goodson and Bass, 2000; Oldfield and Hofmann, 2011; Salek et al., 2002; Semsar et al., 2001) y presenta efectos sobre comportamientos sociales que son fenotipo-dependiente, y dependientes del contexto social (Goodson & Bass, 2000; Oldfield & Hofmann, 2011; Semsar & Godwin, 2004; Semsar et al., 2001; Thompson & Walton, 2004). También se ha reportado que en algunas especies de teleósteos, el AVT modula el comportamiento agonístico (Larson et al., 2006; Santangelo and Bass, 2006; Yaeger et al., 2014) y el cambio de sexo modulado por contexto social (Semsar and Godwin, 2004).

En Gymnotiformes, el AVT es sintetizado en neuronas exclusivamente localizadas en el POA (Pouso et al., 2017). Dentro del POA, al igual que en otros peces teleósteos, se reconocen tres grupos de neuronas AVTérgicas: parvocelulares, gigantocelulares y magnocelulares (Silva & Pandolfi, 2018). Se postula que las primeras, de localización ventrorostral, son homólogas al núcleo supraóptico, mientras que las dos últimas, de ubicación más caudal, son homólogas al núcleo paraventricular (Godwin & Thompson, 2012). En contraste con la restringida localización de sus somas, y además del voluminoso haz de proyección sobre la neurohipófisis, se ha demostrado que las neuronas AVTérgicas proyectan ampliamente sobre diversos sectores del sistema nervioso central en Gymnotiformes y cíclidos (Pouso et al., 2017; Silva & Pandolfi, 2018). En peces eléctricos, estos sitios de proyección incluyen núcleos de la RCS en el telencéfalo, regiones premarcapaso y el NEB, que por tanto aportan el sustrato material potencial para sostener las modulaciones AVTérgicas de la conducta eléctrica (Perrone et al., 2014; Pouso et al., 2017). Hasta el momento, no hay reportes de la presencia de proyecciones AVTérgicas sobre la glándula pineal en teleósteos, pero esto no significa que no existan dado que, al menos en peces eléctricos, la glándula pineal no fue incluida en los cortes de cerebro en los que se buscaron fibras de proyección (P. Pouso, comunicación personal).

Las principales evidencias de modulación AVTérgica de la conducta eléctrica provienen de las dos especies de Gymnotiformes utilizadas como modelo de la presente tesis y, por tanto constituyen antecedentes inmediatos relevantes. Como se ilustra en la Figura 2.4, se han demostrado modulaciones AVTérgicas

de la conducta eléctrica dependientes del contexto social. En *Gymnotus omarorum*, especie modelo por presentar el único ejemplo descrito en teleósteos de agresión territorial independiente de hormonas gonadales (Quintana et al., 2016) se demostró que la administración de AVT en peces subordinados exacerba las señales eléctricas sociales de sumisión incluyendo la disminución de la FB-DOE, pero no afecta la conducta eléctrica en peces dominantes, lo que constituye un claro ejemplo de modulación AVTérgica de la conducta agonística dependiente del estatus (Perrone & Silva, 2018). Por otra parte, en *B. gauderio* el AVT provoca un incremento de la FB-DOE si es administrado durante la fase diurna de reposo en individuos aislados y experimentos *in vitro* en rodajas de cerebro que contienen al NEB demostraron que el AVT actúa directamente sobre el NEB para producir este efecto en esta especie. Este efecto es parcialmente contrarrestado por aplicación previa de su antagonista competitivo Manning Compound (Perrone et al., 2010). Como antecedente directamente relacionado con la interacción del sistema AVTérgico con el sistema circadiano, se ha encontrado que en *B. gauderio* existe un aumento nocturno de la FB-DOE modulado por AVT de acuerdo con el contexto social. En presencia de potenciales parejas, los machos de *B. gauderio* en período reproductivo producen un aumento nocturno de la FB-DOE mayor que cuando se registran aislados (Figura 2.4A; Silva et al., 2007). Este aumento adicional se potencia por la administración de AVT y se abole al administrar Manning Compound previo al atardecer (Figura 2.4B).

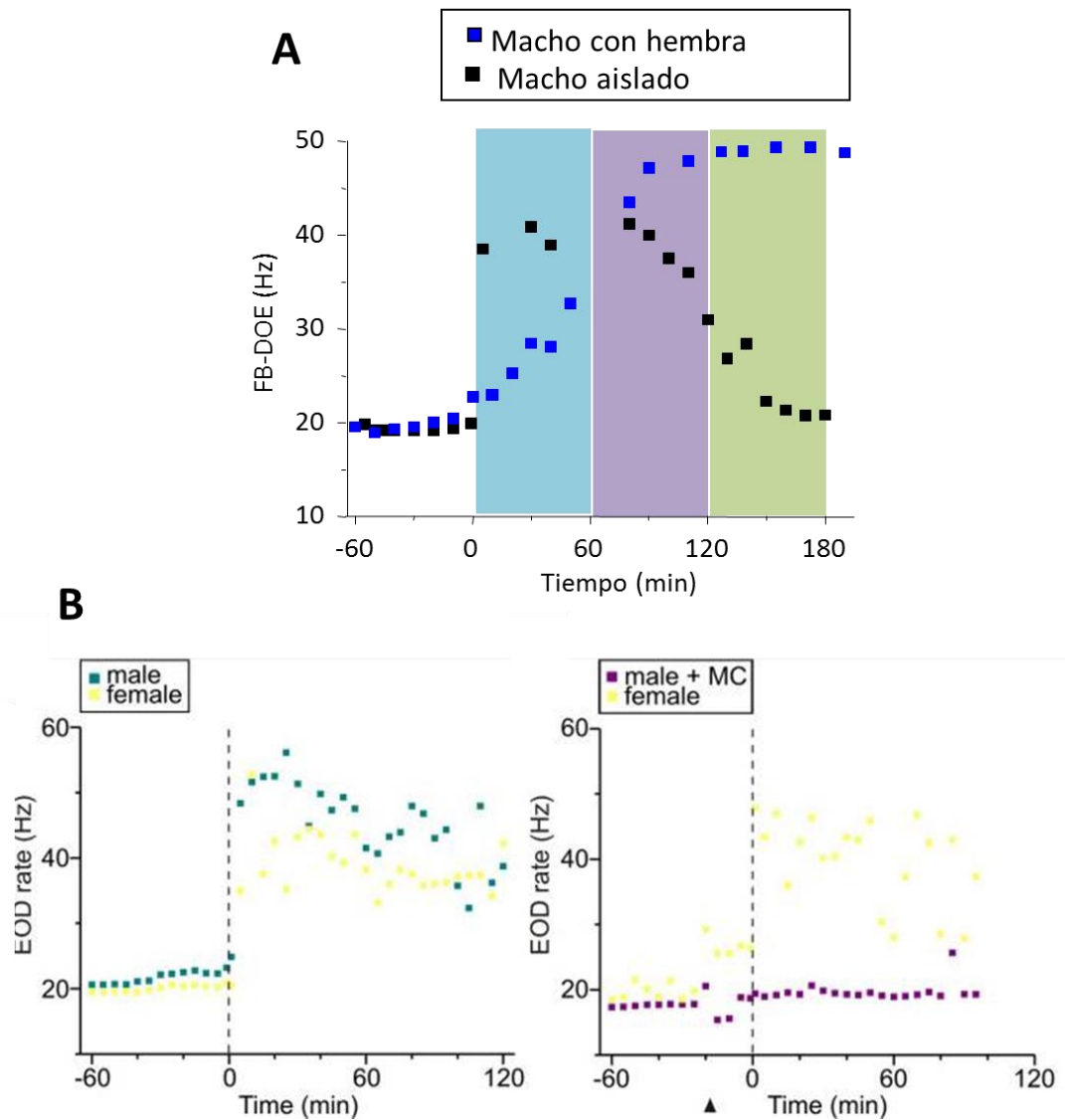


Figura 2.4. Modulación social del aumento nocturno en *Brachyhyppopomus gauderio*. **A)** Efecto del contexto social sobre la duración y amplitud del aumento nocturno de la FB-DOE. Las áreas coloreadas señalan las 3 primeras horas de la noche (modificado de Silva et al., 2007). **B)** El componente social del aumento nocturno es dependiente de la modulación AVTérgica (verde=macho, amarillo=hembra, violeta=macho tratado con Manning compound (MC), tomado de Perrone et al., 2010).

En resumen, estos antecedentes inmediatos obtenidos a partir de las dos especies modelo de esta tesis, *Gymnotus omarorum* y *Brachyhypopomus gauderio*, señalan un rol fundamental contexto dependiente del AVT sobre la modulación de la conducta eléctrica en diferentes situaciones conductuales en ambas especies. Al mismo tiempo, y a pesar de que el aumento nocturno de la FB-DOE no fue analizado previamente en *G. omarorum*, estos antecedentes sugieren interesantes diferencias entre especies en la modulación AVTérgica de la FB-DOE, que no dependen de una organización anatómica diferencial de las neuronas AVTérgicas ni de sus proyecciones, pero que probablemente estén relacionados con los diferentes niveles de socialidad que despliegan ambas especies.

2.4.3. Ritmos circadianos en Gymnotiformes

La nocturnidad de los peces eléctricos sudamericanos ha sido analizada con diversas aproximaciones en algunas especies (Black-Cleworth, 1970; Kawasaki & Heiligenberg, 1989; Lissmann & Schwassmann, 1965; Silva et al., 2007; Stoddard et al., 2007; Zupanc, 2001). En sus estudios de doctorado en 1970, Patricia Black-Cleworth mostró que en una población de *Gymnotus carapo* se observaban variaciones diarias en la actividad locomotora constatando que los individuos abandonaban sus refugios en la noche para explorar el entorno. Este aumento nocturno generalizado en la actividad exploratoria fue demostrado también en *Gymnotus omarorum* al observar que individuos aislados colocados en un ambiente enriquecido exploran solamente durante la noche y permanecen refugiados durante el día (Marchal & Silva, 2014).

Existen escasos reportes de variaciones diarias de la conducta eléctrica en Gymnotiformes y la caracterización rigurosa de su endogenicidad circadiana en registros prolongados de individuos aislados en curso libre no se ha conseguido hasta el momento. Por ejemplo, en *Apteronotus leptorhynchus*, se observó un ritmo diario de producción de señales eléctricas sociales, las cuales ocurren en la noche (Zupanc, 2001). En *Eigenmannia virescens*, se reportaron algunos ejemplos individuales de variaciones diarias de la FB-DOE que persisten en oscuridad constante (Deng and Tseng, 2000). *Brachyhypopomus gauderio* es la especie gymnotiforme que presenta mayor plasticidad en su señalización eléctrica, por lo que no sorprende que sea en esta especie que se concentre la

mayor cantidad de reportes sobre variaciones diarias de la conducta eléctrica. Por un lado, se ha reportado en *B. gauderio* un aumento nocturno de la FB-DOE y la persistencia de un ritmo diario de la FB-DOE en condiciones de luz y oscuridad constante para animales en contexto social (Stoddard et al., 2007). Como se mencionó previamente la FB-DOE de parejas (macho-hembra) aumenta en forma significativa en la noche y este aumento es mayor en individuos en contexto social reproductivo que en individuos aislados, y en individuos sexualmente diferenciados durante el período reproductivo que fuera del mismo (Silva et al., 2007). Estas evidencias sugieren la existencia de una intermodulación entre ritmos circadianos y circaanuales con probable asiento en el NEB, en el que se han demostrado variaciones funcionales estacionales y sexualmente dimórficas (Pouso et al., 2010; Quintana et al., 2011a; Quintana et al., 2011b). Por otro lado, la forma de onda de la DOE también presenta variaciones circadianas en *B. gauderio* ya que los machos sexualmente diferenciados regulan la forma de la DOE de manera de maximizar sus rasgos masculinos en las primeras horas de la noche (Franchina & Stoddard, 1998). Esta variación que se efectiviza a nivel periférico (es decir, en el OE), se ve influenciada por el entorno social y por la acción de neuromoduladores de la red del cerebro social (Franchina et al., 2001; Stoddard et al., 2003).

Aún no se ha explorado en Gymnotiformes la organización circuital del sistema circadiano. Sería esperable que las diferencias encontradas entre especies se originen precisamente en los sistemas neuromoduladores que le confieren plasticidad a estructuras más conservadas como el NEB. Por un lado, el NEB se comportaría como un marcapaso circadiano secundario, controlando las variaciones circadianas de la conducta eléctrica que por una parte señalizan el estado de alerta de los individuos, y por otra parte aseguran la disponibilidad de información sensorial. Pero, además, el NEB funcionaría como integrador del sistema circadiano con sistemas de señales contextuales, particularmente sociales.

2.4.4 Presentación de las especies modelo de esta tesis

Las dos especies de Gymnotiformes más abundantes de Uruguay, *Brachyhypopomus gauderio* (Giora & Malabarba, 2009) y *Gymnotus omarorum* (Richer-de-Forges et al., 2009) son hoy modelos consolidados en la

investigación en Neurociencias (Goldina et al., 2011; Pereira et al., 2005; Silva & Pandolfi, 2018) (Figura 2.5).

Ambas especies habitan zonas litorales de cursos de agua dulce con poca corriente, densamente cubiertos por vegetación superficial. Su hábitat natural se caracteriza por la presencia de extensiones de camalotes (parches) de la especie *Eichhornia crassipes*, entre cuyas raíces los individuos se alojan durante las horas del día. Esta especie vegetal bloquea el pasaje de la luz solar (Fontanarrosa et al., 2010) sugiriendo que estos peces tienen una muy baja exposición a la luz en la naturaleza.

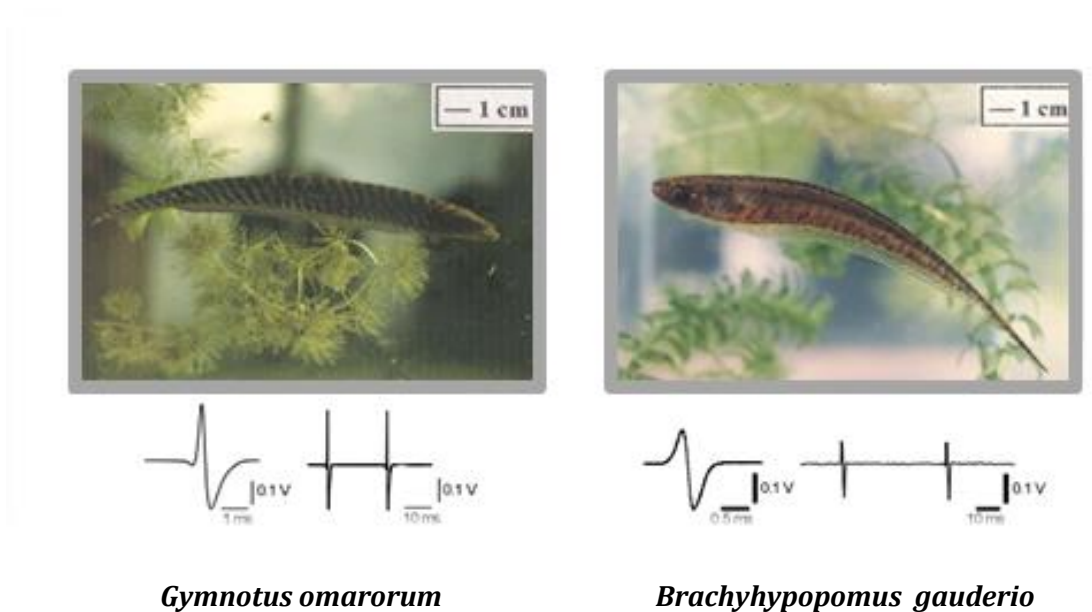


Figura 2.5. *Gymnotus omarorum* y *Brachyhypopomus gauderio*, su forma de onda y frecuencia de descarga ilustrativa.

Gymnotus omarorum

Es un pez gymnotiforme de pulso que se encuentra ampliamente distribuido en Uruguay (Silva et al., 2003). Es una especie sexualmente monomórfica en su morfología y en las características de su DOE tanto en ritmo como en forma de onda (Richer-de-Forges et al., 2009). Lleva su nombre en homenaje a los dos científicos uruguayos, Omar Macadar y Omar Trujillo-Cenóz, que iniciaron el estudio de los peces eléctricos en Uruguay con esta especie en la década de 1980's. Como se muestra en la Figura 2.5, la DOE especie específica presenta una FB-DOE de 25-40 Hz (registrado en reposo a 20°C), y una forma de onda trifásica en la que se reconocen 4 componentes que implican la activación diferencial de distintos sectores del OE y de las caras caudal y rostral de los electrocitos (Trujillo-Cenóz et al., 1984). En el límite sur de la distribución de Gymnotiformes en América, es un reproductor estacional, que ubica la reproducción en la primavera tardía y comienzos del verano (noviembre-enero), por lo que las crías solamente se encuentran en los meses de verano en la naturaleza. Son territoriales, con alta fidelidad al sitio a lo largo de todo el año. En base a experimentos conductuales en díadas intra e intersexuales realizados en el laboratorio, se ha demostrado que el comportamiento territorial del período no reproductivo está mediado por encuentros agonísticos no sesgados por el sexo y en los que el único predictor significativo del resultado de la contienda es la asimetría de peso corporal (Batista et al., 2012; Perrone & Silva, 2018; Quintana et al., 2016). Los mecanismos de generación del patrón espacial de la DOE en Gymnotiformes de pulso y la forma en que estos peces forman y procesan imágenes eléctricas han sido dilucidados utilizando esta especie como modelo (Caputi & Trujillo-Cenóz, 1994; Caputi, 1999; Sanguinetti-Scheck et al., 2011). Más recientemente, *G. omarorum* también se ha instalado como un modelo ventajoso para comprender los mecanismos neuroendócrinos de la conducta agresiva (Quintana et al., 2016; Silva & Pandolfi, 2018).

Brachyhypopomus gauderio

Es un gymnotiforme de pulso que se encuentra en la región noreste de nuestro país, reproductor estacional con un marcado dimorfismo sexual morfológico y electrofisiológico también estacional (Silva et al., 1999; Silva et al., 2003). Como se muestra en la Figura 2.5, la DOE especie específica presenta una FB-DOE

de 15-20 Hz (registrado en reposo a 20°C), y una forma de onda bifásica que depende la activación diferencial de las caras caudal y rostral de los electrocitos (Stoddard et al., 2006). Son peces gregarios y no presentan defensa de territorio (Miranda et al., 2008). La enorme plasticidad de su señalización eléctrica pasible de modulaciones hormonales que actúan tanto en niveles centrales como periféricos, han transformado a *B. gauderio* en un modelo fundamental para comprender las bases neuroendócrinas de la comunicación eléctrica. La demostración en esta especie de modulaciones circadianas y circanuales sobre el ritmo ultradiano de la FB-DOE hacen de esta especie un modelo excepcionalmente atractivo para el estudio de las estrategias neurales del procesamiento temporal y fundamental para el desarrollo de esta tesis.

2.5. Puntos de partida

A partir de los antecedentes presentados destacamos los siguientes puntos de partida para esta tesis:

- Los ritmos diarios de actividad y reposo en la gran mayoría de especies animales son ritmos circadianos. Esto significa que dependen de la actividad de un reloj circadiano endógeno modulado por influencias ambientales (principalmente fotoperíodo y temperatura) y sociales.
- Los peces eléctricos son un buen modelo para el estudio de la integración de factores ambientales y sociales en la modulación de un ritmo circadiano, debido al extenso conocimiento de su sistema electrogenerador, a la accesibilidad para el registro de la conducta eléctrica que es modulada por ambos factores, y a la posibilidad de combinar experimentos de laboratorio con estudios en la naturaleza.
- La conducta eléctrica presenta cambios diarios en algunas especies del orden Gymnotiformes, que no pueden calificarse como circadianos (endógenos) porque solo se mantienen en contexto social. En la especie gregaria *Brachyhypopomus gauderio*, se ha demostrado un aumento nocturno de la FB-DOE en individuos aislados y en díadas reproductivas, que persiste en curso libre solamente en contexto social. Este aumento presenta un componente dependiente de la liberación del AVT,

neuropéptido hipotalámico fuertemente asociado a la modulación del comportamiento social. En la especie territorial *Gymnotus omarorum*, se han comprobado la acción estatus-dependiente del AVT sobre la frecuencia de la conducta eléctrica. También se han descrito variaciones diarias en la conducta exploratoria, que ocurre fundamentalmente en la noche, pero no se han reportado hasta el momento variaciones circadianas de la FB-DOE.

- El modelo actualmente aceptado del sistema circadiano cerebral en teleósteos (Figura 2.1) tiene dos nodos clave (la glándula pineal y el POA) que interactúan para modular variaciones diarias de la conducta y sincronizarlas con las variaciones diarias del ambiente físico y social. La Figura 2.6 plantea el caso particular para peces eléctricos de este modelo general en sus configuraciones diurna y nocturna, en el que se agrega el NEB como núcleo comando de la conducta eléctrica y evidencias previamente reportadas de vías de interacción entre la glándula pineal, POA y NEB en las que se pretende ahondar durante el desarrollo de esta tesis.

Relación de los sistemas melatonérgico y AVTérgico en el control de los cambios diarios de la FB-DOE

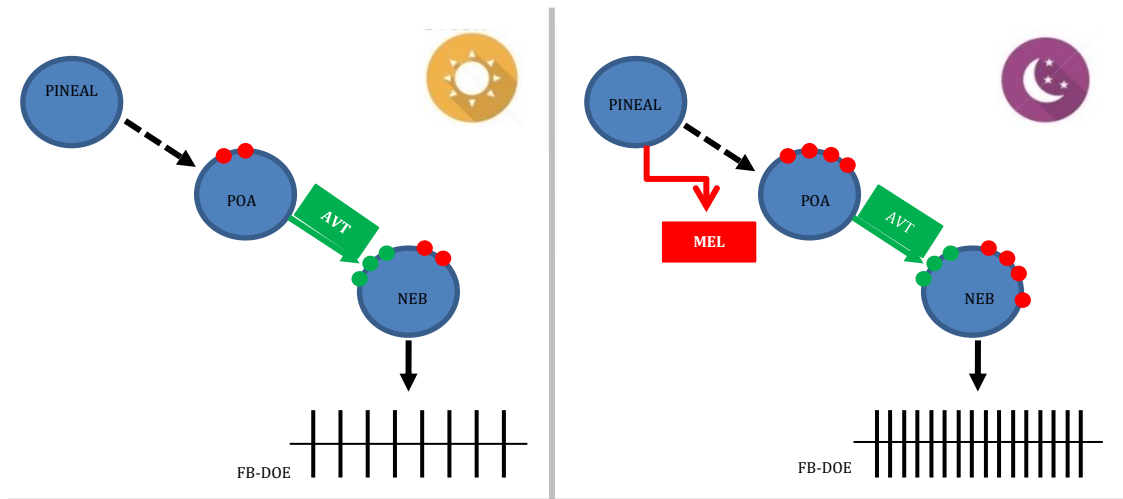


Figura 2.6. El patrón general del sistema melatonérgico en teleósteos indica que: 1) la melatonina se sintetiza en la glándula pineal durante la noche, 2) el AVT se sintetiza en el POA, 3) existen proyecciones de la glándula pineal al POA, 4) hay receptores melatonérgicos (puntos rojos) en el POA, 5) hay cambios diarios en la densidad de receptores melatonérgicos en el cerebro (comparar día-noche) (Tomado de Falcón et al., 2010; SukShin, 2011; Silva & Pandolfi 2018). Estas evidencias previas permiten proponer la participación de los sistemas melatonérgico y AVTérgico en el control del aumento nocturno de la FB-DOE en *Gymnotus omarorum*:

- Las neuronas AVTérgicas se ubican en el POA y existen proyecciones AVTérgicas POA-NEB (Pouso et al., 2017)
- Existen receptores melatonérgicos (puntos rojos) en el POA (L. Quintana, comunicación personal) y en el NEB (por su existencia en el núcleo vocal análogo de *Porichthys notatus*, Feng & Bass, 2016)
- Existen receptores AVTérgicos en el NEB (puntos verdes, demostrados por la acción de AVT in vitro en *Brachyhyopomus gauderio*, Perrone et al., 2010)

3. Hipótesis y objetivos

Objetivo general

- Analizar la ritmicidad circadiana de la conducta eléctrica y su modulación por factores ambientales y sociales.

En otras palabras, buscamos:

- Determinar el rol de la neuromodulación circadiana y social en el aumento nocturno de la FB-DOE.
- Determinar el rol de la neuromodulación por melatonina como mediador del ambiente físico (ciclo día/noche) y del AVT como mediador del contexto social sobre el aumento nocturno de la FB-DOE en dos especies de peces eléctricos que despliegan diferentes niveles de socialidad.

Hipótesis

Hipótesis 1

La variación diaria de la de la FB-DOE de *Gymnotus omarorum* es un ritmo circadiano.

De esta hipótesis surgen:

a) Predicciones

- a. El aumento nocturno de la FB es independiente de los movimientos exploratorios que ocurren en la noche.
- b. El aumento nocturno de la FB persiste en registros prolongados de peces aislados con ciclos luz-oscuridad controlados y temperatura constante.
- c. El aumento nocturno de la FB persiste en registros prolongados de peces aislados en condiciones de oscuridad y temperatura constante.

b) Objetivos específicos

- a. Determinar si existe un aumento nocturno de la FB-DOE independiente de la actividad locomotora.
- b. Evaluar la ritmicidad de la FB-DOE en registros prolongados (10 días) de individuos aislados, manteniendo condiciones controladas del ciclo luz-oscuridad 12:12 y temperatura constante.
- c. Evaluar la endogenicidad de este ritmo manteniendo a los individuos en condiciones de oscuridad y temperatura constante.

Hipótesis 2

La FB-DOE de *Gymnotus omarorum* es modulada por los sistemas AVTérgico y melatoninérgico actuando a nivel del NEB.

De esta hipótesis surgen las siguientes:

a) Predicciones

- a. La administración intraperitoneal de melatonina y AVT emulan el aumento nocturno de la FB-DOE en animales aislados durante el día.
- b. El bloqueo de los receptores de melatonina y AVT impide el aumento nocturno de la FB-DOE en animales aislados.
- c. La frecuencia de descarga del NEB aumentará frente a la aplicación de AVT y melatonina.

b) Objetivos específicos

- a. Evaluar el efecto de la manipulación farmacológica de los sistemas melatoninérgico y AVTérgico sobre la FB-DOE durante el día, en individuos aislados de *G. omarorum*.

- b. Determinar si la liberación endógena de melatonina y/o AVT son responsables del aumento nocturno de la FB-DOE en individuos aislados de *G. omarorum*.
- c. Determinar si el NEB es el órgano blanco de los sistemas melatoninérgico y AVTérgico en *G. omarorum*.

Hipótesis 3

En el hábitat natural, las variaciones circadianas de la FB-DOE persisten sin claves lumínicas y son moduladas por el contexto social.

De esta hipótesis surgen las siguientes:

a) Predicciones

- a. La conducta eléctrica registrada en el hábitat natural presenta un ritmo diario caracterizado por un aumento nocturno de la FB-DOE.
- b. La ritmicidad de los cambios diarios de la FB-DOE es modulada por factores ambientales y sociales.

b) Objetivos específicos

- a. Registrar las variaciones diarias de temperatura y luminosidad subacuáticas a las que están expuestos los individuos registrados.
- b. Evaluar el aumento nocturno de la FB-DOE en individuos aislados en el hábitat natural con acceso a claves lumínicas.
- c. Evaluar el aumento nocturno de la FB-DOE en individuos en contexto social en el hábitat natural en oscuridad constante.
- d. Analizar el rol del sistema melatoninérgico sobre el aumento nocturno de la FB-DOE en individuos en contexto social en el hábitat natural en oscuridad constante.

4. Organización y estrategia

La estrategia de este trabajo se funda en los siguientes pilares que justifican la secuencia lógica de los abordajes utilizados y de los resultados presentados en los capítulos 6 a 8 de esta tesis:

- Se establece que la conducta eléctrica es la DOE, es decir la salida del sistema electromotor. Por el extenso conocimiento del circuito de comando de la DOE, se selecciona a la FB-DOE como el parámetro fundamental para explorar la ritmicidad circadiana de la conducta eléctrica y las modulaciones que el sistema nervioso central ejerce sobre esta conducta para adecuarla a las demandas del ambiente tanto físico como social.
- Se utiliza la modulación hormonal del sistema melatoninérgico porque se concibe a la melatonina como principal señal de transducción interna de los cambios diarios del ambiente físico, especialmente del fotoperíodo.
- Se utiliza la modulación hormonal del sistema AVTérgico por su reconocido rol como modulador de la conducta social en vertebrados y por los reportes previos de la acción del AVT como modulador de la conducta eléctrica en forma dependiente del contexto social.
- Los capítulos 6, 7 y 8 ponen a prueba las hipótesis 1, 2, y 3, respectivamente. Se enfocan a la caracterización de la ritmicidad circadiana de la conducta eléctrica de *Gymnotus omarorum*, inexplorada hasta el momento, y a reportar su modulación por factores ambientales físicos y sociales en el laboratorio y en la naturaleza.
- Los capítulos 7 y 8 aportan evidencias experimentales al modelo del sistema circadiano cerebral de teleósteos, que permiten la construcción de un modelo particular para Gymnotiformes de las interacciones del sistema melatoninérgico y AVTérgico en la modulación de la ritmicidad circadiana de la conducta eléctrica, que se presenta y discute en el capítulo 9.
- En el anexo 1 se muestran los resultados de la exploración del aumento nocturno de la FB-DOE en *Brachyhyppopomus gauderio* y su modulación. La exploración se origina en un intento de encontrar similitudes y

diferencias en la modulación circadiana, ambiental y social de las variaciones diarias de la conducta eléctrica, consecuentes con la diferencia en estructura social de ambas especies: la especie territorial *Gymnotus omarorum* y la especie gregaria *Brachyhyopomus gauderio*.

5. Metodología general

5.1. Colecta de animales y alojamiento

Los peces fueron detectados y colectados en la Laguna Lavalle, Departamento de Tacuarembó (31°48'S, 55°13'W, *Brachyhypopomus gauderio*), y en la Laguna del Sauce, Departamento de Maldonado (34°51'S, 55°07'W, *Gymnotus omarorum*) usando un detector de señales eléctricas que permite la pesca individual como ha sido descrito previamente (Quintana et al., 2004; Silva et al., 2003) (Figura 5.1A). El alojamiento se realizó en el Bioterio de animales poiquiloterms del IIBCE. Los peces de la especie *B. gauderio* fueron alojados en tanques exteriores de 500 litros en grupos sociales conformados por 3 hembras por cada macho. En estos tanques machos y hembras desarrollan un ciclo reproductivo normal sincronizado con el observado en la naturaleza (Quintana et al., 2004; Silva et al., 2003). Los individuos de la especie *G. omarorum* se mantuvieron en tanques similares provistos de recintos individuales (20x20x50 cm). La temperatura del agua de los tanques varió de 8 a 33 °C a lo largo del año, lo cual se encuentra dentro del rango natural (Silva et al., 2003). Temperaturas extremas más allá de este rango fueron evitadas colocando una cubierta plástica en invierno y una tela sombra durante el verano. El rango del fotoperíodo natural oscila desde 10 hs de luz a 14 hs de oscuridad (10:14) en invierno a 14:10 en verano. La conductividad del agua fue ajustada y mantenida por debajo de 150 µS/cm agregando agua desionizada. La superficie del agua fue cubierta por plantas acuáticas (*Eichornia crassipes*, *Pistias tratiotes*, *Salvinia sp*) lo cual proveyó refugio adicional. Los peces fueron alimentados con *Tubifex tubifex* ad libitum.

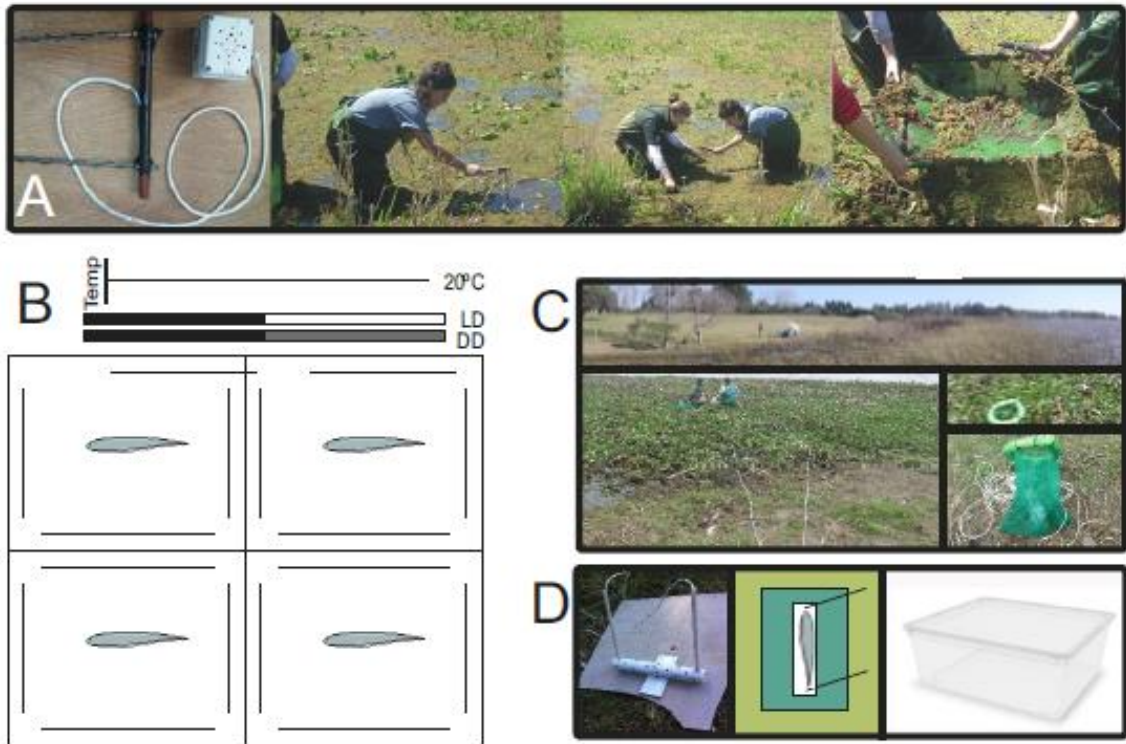


Figura 5.1. Métodos de captura y registro. **A)** Procedimiento de colecta. **B)** Sistema de registro de animales aislados en la estación conductual. **C)** Sistema de registro de animales en el hábitat natural. **D)** Sistema de aislamiento y registro seminatural.

5.2. Registro de la conducta eléctrica

5.2.1. Registros de la conducta eléctrica en el laboratorio

Los registros de conducta eléctrica en condiciones controladas de laboratorio que se presentan en los capítulos 6, 7 y anexo 1 de esta tesis se realizaron en la estación experimental conductual instalada en la Unidad Bases Neurales de la Conducta del Departamento de Neurofisiología Celular y Molecular del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Esta estación insonorizada está adaptada para mantener animales aislados, con temperatura y fotoperíodo controlados y con agua de conductividad eléctrica $<150\mu\text{S}/\text{cm}$. La estación cuenta con 4 peceras (50x30x20 cm) equipadas con 2 pares de electrodos ortogonales cada una (Figura 5.1B). La conducta eléctrica se registró por los electrodos fijos a las paredes de cada pecera, conectados a dos amplificadores (CygnusTech, FLA-01). Las señales eléctricas fueron digitalizadas y adquiridas por tarjetas de sonido (Audigy Sound Blaster) y almacenadas en una computadora para su posterior análisis.

5.2.2. Registros de la conducta eléctrica en la naturaleza

Los registros de conducta eléctrica en condiciones naturales que se presentan en los capítulos 6, 8 y anexo 1 de esta tesis se realizaron en el hábitat natural del que provienen los animales: Laguna del Sauce, Maldonado, para *Gymnotus omarorum* (equinoccio de primavera) y Laguna Lavalle, Tacuarembó, para *Brachyhypopomus gauderio* (equinoccio de otoño).

Los individuos fueron colectados y ubicados en bolsas de malla plástica (red, 80x50 cm con una abertura de 40cm de diámetro), provistas de un par de electrodos y un flotador en el borde superior (Figura 5.1C). Las bolsas se cubrieron con la vegetación natural y se ubicaron en mismo sitio de colecta. En estas condiciones de registro los individuos pueden moverse dentro de la bolsa y percibir todas las variables ambientales del entorno así como la presencia de coespecíficos, como se evidencia por el registro transitorio de señales eléctricas de otros individuos intercaladas en el registro de la DOE del pez que se encuentra dentro de la red. Se tomaron medidas de la FB-DOE por 30 s, una vez por hora, durante 72 horas utilizando una tarjeta de sonido para digitalización (Realteck) previa amplificación (WorldPrecision Instruments DAM50). La

luminosidad y temperatura del agua y del ambiente externo se monitorearon cada 30 minutos con sensores ubicados en la zona de registro y fuera del agua en las cercanías de la orilla (Sensores: HOBOPendant Data Logger MicroDAQ: UA-002-08. Rangos de medida, Temperatura: -20° to 70°C; Luminosidad: 0 a 320,000 lux (0 a 30,000 lumens/ft²).

Alternativamente se realizaron registros de FB en individuos mantenidos en el hábitat natural en condiciones de aislamiento. Para esto se ubicaron individuos recientemente colectados en recipientes plásticos de 50 l de capacidad en la orilla de la laguna, cubiertos con la vegetación natural. Cada recipiente contiene un cilindro plástico (refugio) de 12 cm de longitud y 3 cm de diámetro interno, provisto de un par de electrodos en cada extremo (Figura 5.1D). La luminosidad y temperatura se monitorearon con un sensor subacuático (ver descripción arriba) ubicado en uno de los recipientes. Se tomaron medidas de la DOE durante 30 s, una vez por hora, durante 24 hs utilizando una tarjeta de sonido para digitalización (Realtek) previa amplificación (WorldPrecision Instruments DAM50). En cada registro se controló que los animales estuvieran inmóviles al no detectarse cambios en la forma de onda de la DOE. Los registros en la naturaleza se realizaron próximos al equinoccio de primavera de 2015 (18 a 21 de setiembre).

5.2.3. Cálculo y análisis de la FB-DOE

Tanto en los registros realizados en la estación conductual como en los realizados en el hábitat natural, el valor de la FB-DOE promedio se determinó a partir de los intervalos inter DOE incluidos en registros de 30 s de duración. La determinación de los intervalos se realizó mediante el protocolo de detección por umbral implementado en el programa Clampfit (Axon Instruments). A partir de las frecuencias instantáneas para cada intervalo se calculó la frecuencia media para ese registro (FB-DOE) que se muestra en las gráficas como media \pm SD. Para eliminar los efectos directos e inmediatos de la temperatura del agua sobre la FB-DOE, los valores registrados se corrigieron usando el valor Q_{10} para ajustar la FB-DOE a la que se registraría a 20 °C (Dunlap et al., 2000; Silva et al., 2007):

$$Q_{10} = \text{FB-DOE}(T) / \text{FB-DOE}(T+10) = 1.5$$

Los cambios en la FB-DOE provocados por la manipulación farmacológica o por el pasaje del día a la noche (FB_{post}) deben ser evaluados tomando en cuenta la frecuencia basal en la condición previa (FB_{pre}) para normalizar las variaciones interindividuales. Para esto calculamos el índice de cambio de la frecuencia basal (FBIn):

$$FBIn = (FB_{post} - FB_{pre}) / FB_{pre}$$

En cada capítulo se determinarán y especificarán distintos momentos a comparar ajustando esta fórmula a las preguntas que lo guían.

5.2.4. Procesamiento estadístico

Para el análisis de la variación en la FB-DOE utilizamos pruebas no paramétricas dada la naturaleza de los datos. De acuerdo al tipo de comparación se usaron pruebas pareadas (test pareado de Wilcoxon y prueba de Friedman) y no pareadas (test U de Mann-Whitney y prueba de Kruskal-Wallis). Por la misma razón los datos se expresan en mediana \pm MAD.

Para el análisis circadiano se utilizó el programa El Temps (Diez-Noguera, 1999) para la confirmación estadística del ajuste a un período circadiano (análisis de cosinor), el cálculo de la acrofase para cada individuo y condición (LD y DD) y la realización de test de Rayleigh para comparación entre individuos.

5.3 Aspectos éticos

La colecta de animales y todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo a las pautas establecidas por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República y la Comisión Nacional de Experimentación Animal y siguiendo protocolos de experimentación previamente aprobados por la Comisión de Ética en el Uso de Animales del IIBCE (CEUA IIBCE 004/05/2016). Asimismo, el Instituto Clemente Estable está autorizado para la colecta de peces eléctricos autóctonos por la Dirección Nacional de Recursos Acuáticos del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca.

6. El ritmo circadiano de la frecuencia basal de la DOE

Objetivos

- a) Determinar si existe un aumento nocturno de la FB-DOE independiente de la actividad locomotora.
- b) Evaluar la ritmicidad de la FB-DOE en registros prolongados (10 días) de individuos aislados, manteniendo condiciones controladas del ciclo luz-oscuridad 12:12 y temperatura constante.
- c) Evaluar la endogenicidad de este ritmo manteniendo a los individuos en condiciones de oscuridad y temperatura constante.

Métodos

- Ritmo diario de la FB-DOE en animales en reposo voluntario.

Se colocaron individuos aislados (n=5), recientemente colectados en Laguna del Sauce, en los recipientes plásticos descritos en el capítulo 5 (Figura 5.1D). Se tomaron medidas de la DOE durante 30 s, una vez por hora, durante 24 hs. En cada registro se controló que los animales estuvieran inmóviles al no detectarse cambios en la forma de onda de la DOE.

- Aumento nocturno temprano de la FB-DOE.

Los individuos (n=9) fueron alojados en peceras individuales en la estación conductual descrita en el capítulo 5 (Figura 5.1B), a 20°C, con un ciclo luz/oscuridad 12:12. Se realizaron registros continuos de la conducta eléctrica durante 2 hs entorno al apagado de la luz. La FB-DOE se calculó cada 10 min con el objetivo de determinar la dinámica temporal del aumento.

- Análisis de la ritmicidad circadiana de la FB-DOE

Con el objetivo de determinar si las variaciones diarias de la FB-DOE son un ritmo circadiano se estudiaron individuos aislados en peceras individuales (n=6), ubicadas dentro de la estación conductual descrita en el capítulo 5 (Figura 5.1B). Los individuos se mantuvieron con fotoperíodo artificial 12/12 (LD) a temperatura constante (20° C) durante 10 días de manera de caracterizar los cambios circadianos en frecuencia basal de la DOE. Posteriormente se los mantuvo en condiciones de oscuridad constante (DD) durante 5 días. Los datos obtenidos se

procesaron mediante el protocolo de umbral implementado en el software Clampfit (Axon Instruments) aplicado a segmentos de 30 s en cada hora de registro para el cálculo de la FB media.

- Procesamiento de datos y estadística

Se calcularon los índices de aumento de la FB-DOE (FBIn) para la comparación de los momentos de interés en cada caso como se describe en el capítulo 5. Para animales en reposo voluntario se calculó el $FBIn_{max/-60}$ entre el máximo valor nocturno (FB_{max}) y el valor en la hora previa al atardecer (FB_{-60}).

Para animales en libre movimiento en la estación conductual se calcularon el FBIn a los 10 min de apagado de la luz ($FBIn_{10/-60}$) y a los 60 min ($FBIn_{60/-60}$)

El análisis de la ritmicidad circadiana se realizó utilizando el programa El Temps como se describe en el capítulo 5. Para el análisis de cosinor los datos de frecuencia basal se ajustan a una función coseno con un período determinado. Para esto se minimiza la suma del cuadrado de la diferencia entre los datos originales y los ajustados. Cuanto mayor es el residuo de esta suma mayor es la incertidumbre del test. Los ajustes cuyos resultados se incluyen en un límite de confianza del 95% tiene valores de p menores a 0,05. Para los individuos en LD se utilizó un período de ajuste de 24 hs, para los individuos en DD se probaron períodos de entre 20 y 28 hs y se muestra el que presenta un mejor ajuste estadístico.

Resultados

La figura 6.1 muestra el registro de la FB-DOE durante 24 hs en animales aislados que se encuentran en reposo voluntario. En los 5 individuos analizados, la FB-DOE aumenta durante la noche como se observa en los gráficos de FB-DOE para las 24 hs registradas (Figura 6.1A). El aumento medio registrado en la noche es de un 26% ($FBIn = 0,26 \pm 0,14$), siendo la FB_{max} mayor que la FB_{-60} ($n=5$; test pareado de Wilcoxon; $p=0,04$; figura 6.1B).

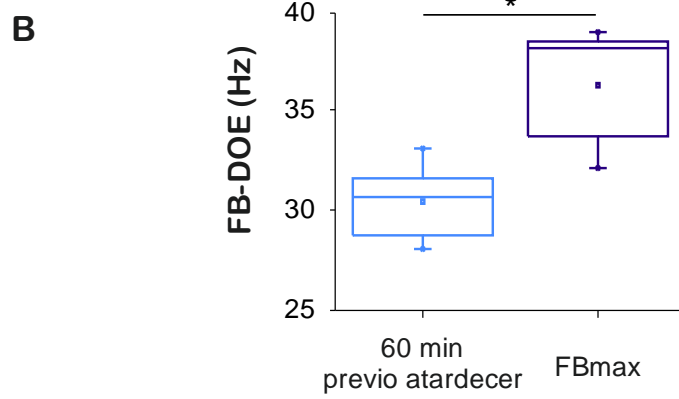
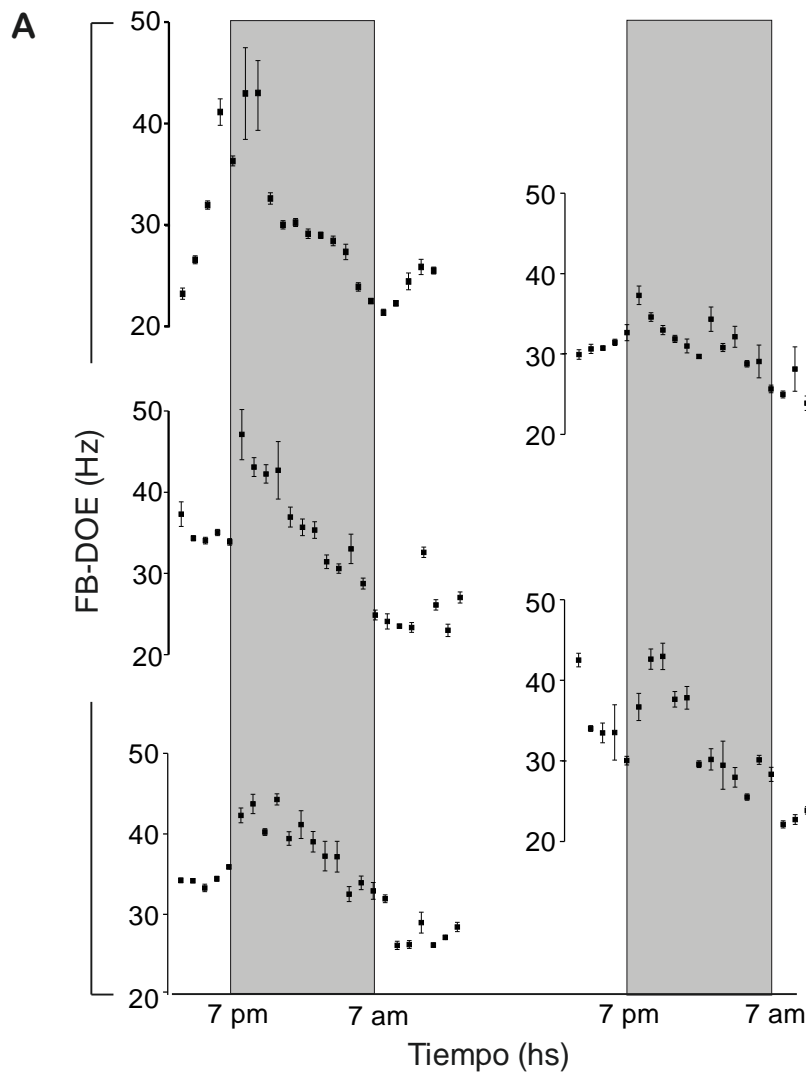


Figura 6.1. Aumento nocturno de la FB-DOE en animales en reposo voluntario. **A)** FB-DOE promedio calculada para cada hora durante 24 hs en 5 individuos. Los rectángulos en gris corresponden a la noche (19:00 a 7:00). **B)** Boxplot para la comparación de la FB-DOE una hora antes del atardecer (FB_{-60}) y en el máximo registrado (FB_{max}). Comparaciones pareadas a distintos tiempos, $n=5$, test pareado de Wilcoxon, $*/p \leq 0,05$.

El análisis del aumento nocturno en condiciones controladas se inició considerando la variación en la FB-DOE durante primera hora de la noche. La figura 6.2 muestra a modo de ejemplo la variación de la FB-DOE en un individuo, para este intervalo de tiempo (Figura 6.2A). Todos los individuos analizados mostraron un aumento discreto (12%) cuyo máximo se registró a los 10 min de apagado de la luz ($FB_{In_{10/-60}}=0,12 \pm 0,05$). Se compararon los valores de la hora previa (FB_{-60}) al apagado de la luz en la estación conductual (tiempo=0), así como valores intermedios hasta completar la primera hora (FB_{60}). En todos los individuos los valores de FB a los 10 minutos son mayores que una hora antes de pagarse la luz de la estación, decayendo hacia el fin de la primer hora, (FB_{-60} vs FB_{10} vs FB_{60} ; $n=9$; prueba de Friedman; $p=0,001$; figura 6.1B). Consecuentemente el aumento nocturno de la FB-DOE en relación al valor diurno (FB_{In}) es mayor a los 10 min ($FB_{In_{10}}$) que a los 60 min ($FB_{In_{60}}$) ($n=9$; test pareado de Wilcoxon; $p=0,01$; figura 6.2C).

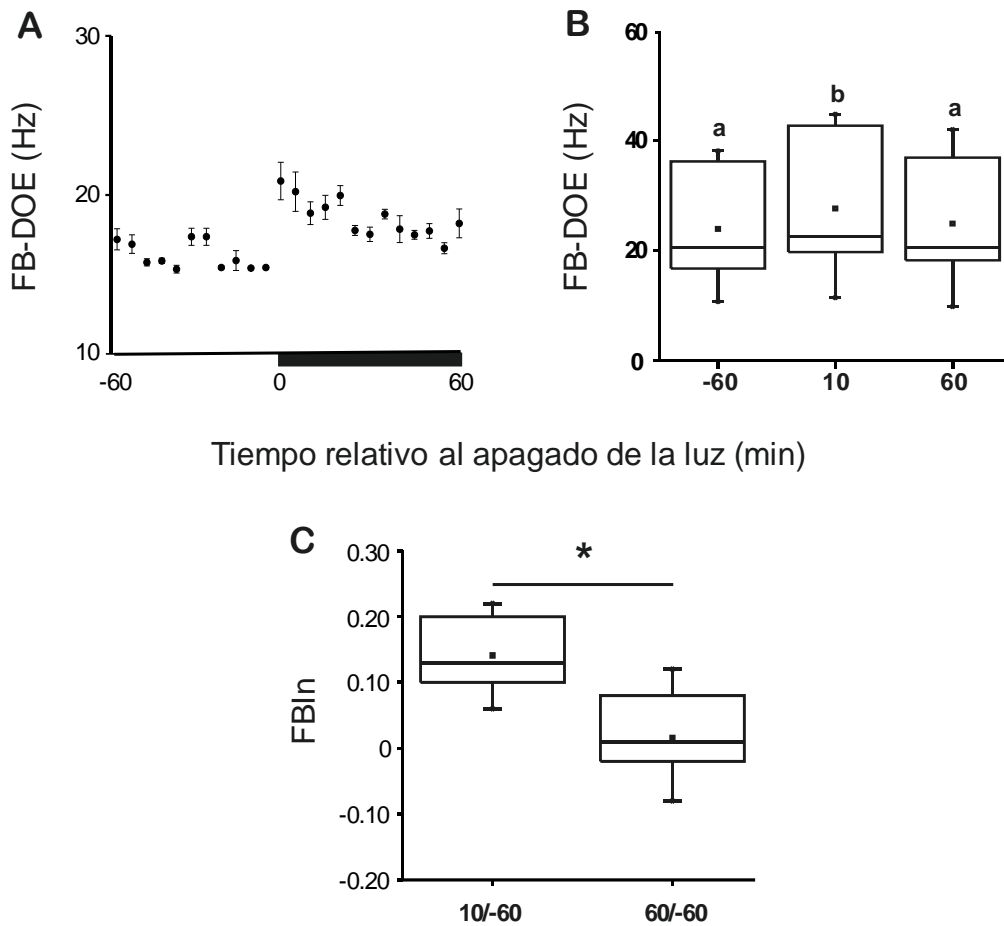


Figura 6.2. Aumento nocturno temprano de la FB-DOE en laboratorio. **A)** Ejemplo representativo de la variación de la FB-DOE (media±SD) calculada cada 10 min durante una hora antes (-60) y una hora después (60) del apagado de la luz (0). **B)** Boxplot para la comparación de la FB-DOE una hora antes del atardecer (FB₋₆₀), 10 y 60 min después del atardecer (FB₁₀, FB₆₀). Comparaciones pareadas a distintos tiempos: n=9, prueba de Friedman, letras iguales: no significativo, letras diferentes/*: p≤0.01. **C)** Box plot para la comparación de los FBIn a los 10 y 60 minutos luego del apagado de la luz. Comparaciones pareadas a distintos tiempos, n=9, test pareado de Wilcoxon, */p≤0,01.

Las variaciones diarias de la conducta eléctrica se analizaron en el laboratorio en individuos aislados, a temperatura constante (20 °C). El ciclo de luz/oscuridad se mantuvo en régimen 12:12 (LD) durante 10 días y en oscuridad constante (DD, libre curso) durante 5 días. La figura 6.3 muestra la variación diaria de la frecuencia basal durante todo el período de registro, en 3 individuos representativos.

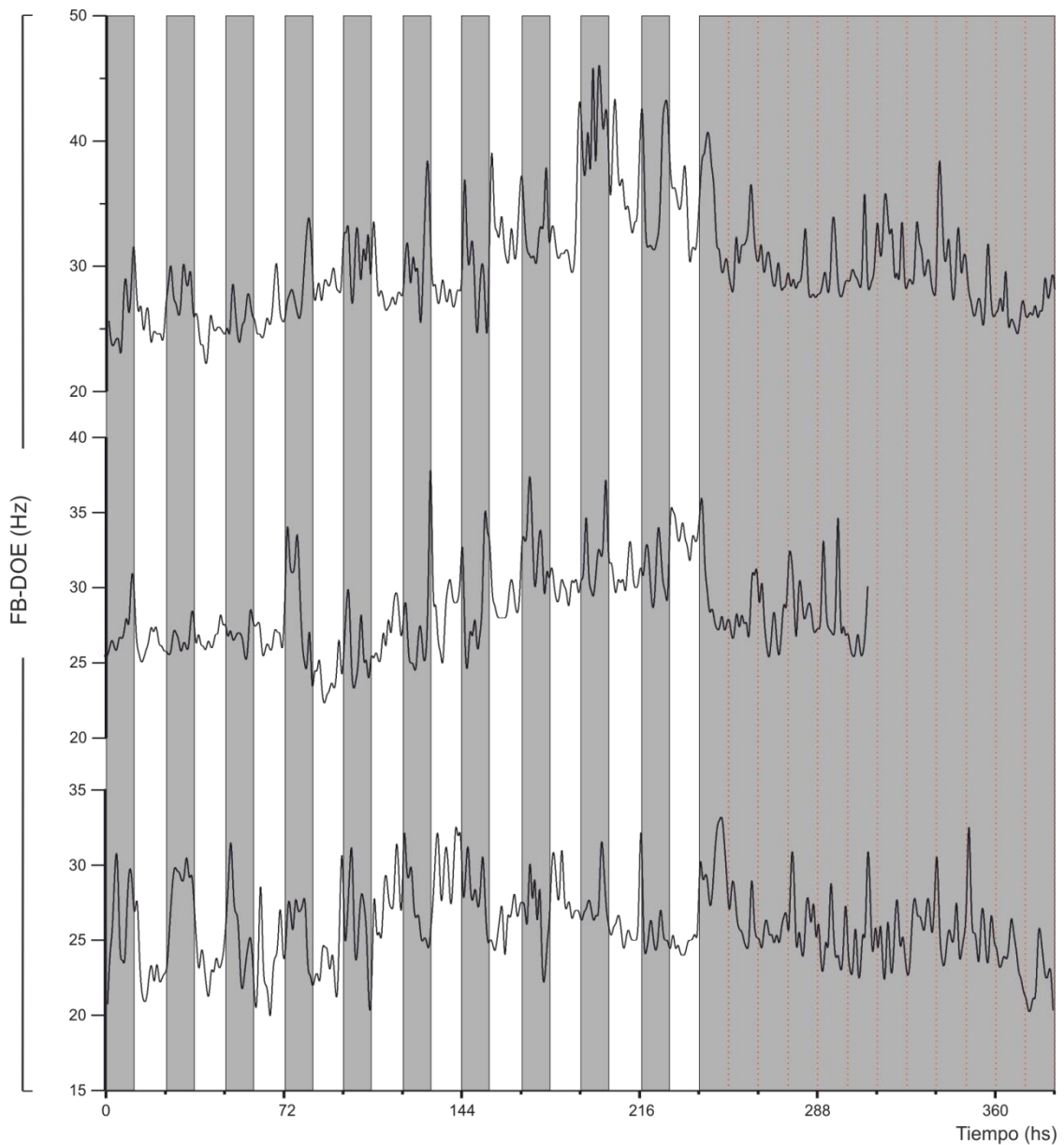


Figura 6.3.. Registro de la FB-DOE en individuos aislados mantenidos durante 10 días en LD y 5 días en DD. Se muestran tres individuos representativos.

La importante variación inter e intraindividual dificulta la detección de ritmos aún en condiciones de LD. En DD se evidencian distintos escenarios. El pez 1 presenta dos ciclos con período menor a 24 hs, mientras que el pez 2 tiene un ciclo con período menor a 24hs. En los ciclos siguientes el análisis cualitativo no permite discriminar claramente un ritmo. A pesar de esta variabilidad, en todos los casos se observa un aumento endógeno de la FB-DOE en la primer noche subjetiva en DD.

La figura 6.4 muestra los análisis de cosinor para la variación de la FB-DOE a lo largo de 10 días en la estación conductual a una temperatura constante de 20 °C, con un ciclo luz/oscuridad (LD) 12/12, seguido de 5 días en oscuridad constante (DD). De los 6 animales analizados solo 4 presentaron ritmicidad diaria en LD y esos son los que se muestran en este análisis. La tabla 6.1 muestra la acrofase y la bondad de ajuste a la función coseno con un período de 24 hs para todos los individuos (n=4) en LD y la tabla 6.2 muestra los mismos datos para DD considerando períodos de 20 a 28 hs.

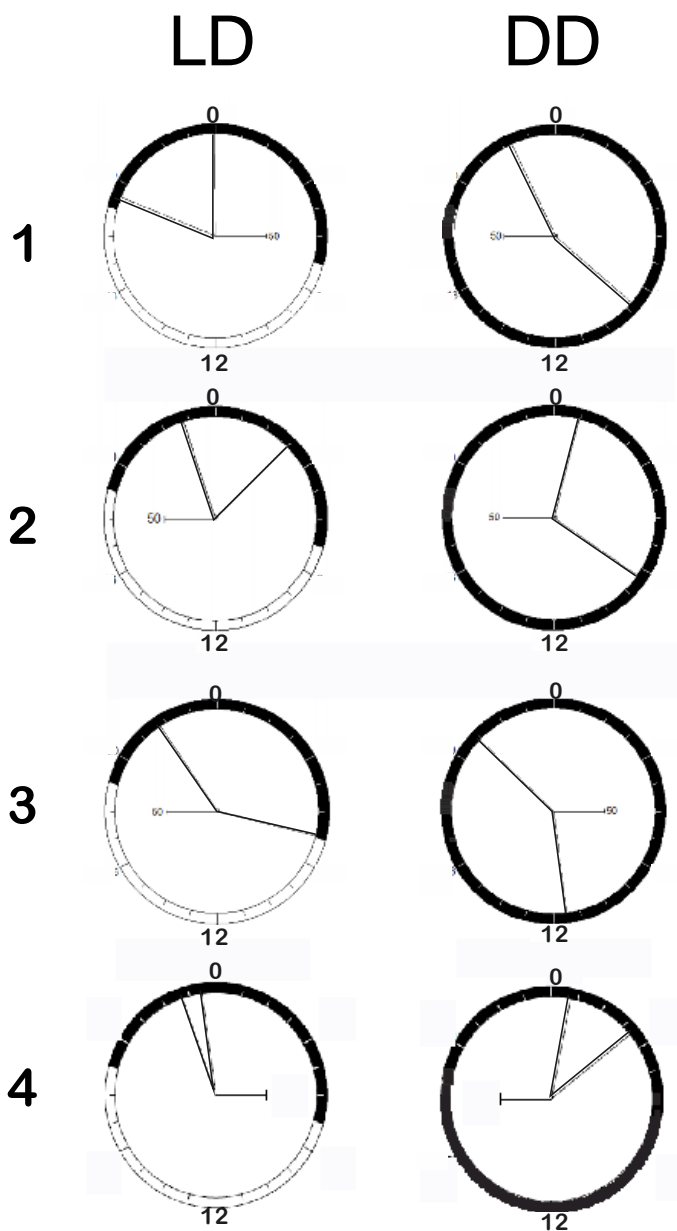


Figura 6.4. Diagramas de cosinor para el análisis de ritmicidad circadiana en animales aislados en la estación conductual. Todos los individuos representados tienen ritmos circadianos significativos (ver tabla 6.1) de 24 hs en LD y de entre 20 y 28 hs en DD. La porción negra de la circunferencia representa las horas de oscuridad y la blanca las de luz. La fracción señalada por los dos radios representa el rango de variación de la acrofase.

Individuos en LD

Individuo	Período (hs)	Acrofase (hs)	p
1	24	21,71	$7,65 \times 10^{-5}$
2	24	0,87	$2,17 \times 10^{-5}$
3	24	2,33	0,03
4	24	23,01	$3,56 \times 10^{-6}$

Tabla 6.1. Período, acrofase y validación estadística para el análisis de cosinor para cada individuo en los 10 días de LD

Individuos en DD

Individuo	Período (hs)	Acrofase (hs)	p
1	20	2,89	0,044
2	25	7,11	0,012
3	28	12,42	0,028
4	24	2,15	0,036

Tabla 6.2. Período, acrofase y validación estadística para el análisis de cosinor para cada individuo en DD

Discusión

En este capítulo partimos de la siguiente hipótesis: la variación diaria de la de la FB-DOE de *Gymnotus omarorum* es un ritmo circadiano.

Los datos presentados abonan a favor de esta hipótesis. El aumento nocturno de la FB-DOE es considerada una característica común entre los peces sudamericanos de descarga débil que coincide con un estado de alerta de estos animales nocturnos. Sin embargo, su condición de ritmo circadiano no ha sido totalmente establecida. Como se menciona en los antecedentes de esta tesis existen reportes en algunas especies de Gymnotiformes del aumento en la actividad exploratoria (Black-Cleworth, 1970) y en la emisión de señales sociales eléctricas durante la noche (Zupanc, 2001). Estas últimas muestran un ritmo circadiano que se mantiene en fase con la noche subjetiva en condiciones de oscuridad constante. En el mismo sentido se reportó para *Brachyhyppopomus pinnicaudatus* (hoy reclasificada como *B. gauderio*) un ritmo circadiano de la FB-DOE dependiente del contexto social (Stoddard et al., 2007) al punto que en animales aislados no fue posible demostrar su persistencia. Por lo tanto, no existen reportes de un ritmo circadiano de la FB-DOE en verdaderas condiciones de libre curso.

Elegimos mostrar la existencia de un aumento nocturno en animales en su hábitat natural, brindando condiciones que favorecen el reposo voluntario, indispensable para demostrar que el aumento en la FB-DOE no es secundario al aumento locomotor asociado a la actividad exploratoria. El aumento nocturno es un rasgo en sí mismo y es esperable encontrarlo en su máxima expresión en animales habitando en la naturaleza. En esta tesis mostramos que los individuos en reposo locomotor muestran un aumento nocturno de la FB-DOE. Trabajos anteriores de nuestro grupo habían constatado la existencia de una abundante actividad exploratoria nocturna contrastando con la permanencia en el refugio en horas del día, en animales ubicados en tanques grandes (500 l) con un ambiente enriquecido con doce refugios (Marchal & Silva, 2014). En nuestros experimentos usamos un espacio reducido, ocupado en gran medida por el refugio y constatamos que en esta disposición los animales tienden a permanecer refugiados aún durante la noche. En este reposo voluntario, los

animales aumentan la FB-DOE en la noche, manteniendo solamente uno de los componentes de su la actividad exploratoria.

El aumento nocturno de la FB-DOE es un correlato esperable de la fase de mayor alerta en tanto cada DOE constituye un patrón de energía portador de información sensorial y por lo tanto una mayor frecuencia de emisión conlleva un incremento en la cantidad de información por unidad de tiempo de la que dispone el sistema nervioso. En esta línea se ha descrito un incremento en la FB-DOE de *Gymnotus carapo* previo al inicio del movimiento, que ha sido señalado por los autores de este trabajo como un correlato de la voluntad, y que ocurren con mayor probabilidad durante la noche (Jun et al., 2014).

El aumento nocturno observado en estas condiciones pudo analizarse en detalle en el laboratorio, durante la primera hora de la noche. Trabajos previos en *B. gauderio* habían mostrado la existencia de un aumento nocturno de algo más de una hora de duración en animales aislados (Silva et al., 2007). Elegimos la misma ventana de tiempo para analizar la variación en la FB-DOE de *G. omarorum* en respuesta al apagado de la luz en la estación conductual, la cual se realizó en sincronía con el atardecer al cual estaban sometidos los individuos en su alojamiento. En estas condiciones constatamos un aumento discreto con un máximo a los 10 min posteriores al apagado de la luz y que 60 minutos después retorna a valores similares a los diurnos. El curso temporal de esta respuesta permite descartar que se trate de una respuesta de novedad, la cual tiene unos pocos segundos de duración y requiere una alta intensidad de estimulación para ser desencadenada por la vía visual (Capurro, 1994; Caputi et al., 2003).

Para demostrar que el aumento nocturno constituye un ritmo circadiano es necesario poner en evidencia su endogenicidad en condiciones de laboratorio, aislando toda posible clave temporal, así como su sincronización con el ciclo luz/oscuridad. Los registros prolongados en la estación conductual muestran que la FB-DOE tiene una importante variación intraindividual que dificulta la detección cuanti y cualitativa del ritmo (Figura 6.3). Por ejemplo el valor máximo registrado en un ciclo de 24 hs puede ser de los valores más bajos en el ciclo siguiente. A pesar de estas dificultades se destacan dos líneas argumentales en favor de la existencia del ritmo circadiano de la conducta eléctrica: 1) Aplicando el análisis estándar de cosinor, 4 de los 6 individuos registrados presentan un

ritmo diario en LD, con un período de 24 hs y acrofases nocturnas que persiste en DD (Figura 6.4) y 2) El análisis cualitativo de los registros crudos (Figura 6.3) muestra un aumento endógeno de la FB-DOE coincidente con el inicio de la primer noche subjetiva en DD. Este constituye el primer registro prolongado de Gymnotiformes en libre curso en condiciones de aislamiento. Nuestros resultados muestran la necesidad de profundizar en el análisis de la ritmicidad circadiana con procedimientos ajustados a las características de los datos

7. Modulación farmacológica del sistema circadiano y social

Objetivos:

- a) Evaluar el efecto de la manipulación farmacológica de los sistemas melatoninérgico y AVTérgico sobre la FB-DOE durante el día, en individuos aislados de *G. omarorum*.
- b) Determinar si la liberación endógena de melatonina y/o AVT son responsables del aumento nocturno de la FB-DOE en individuos aislados de *G. omarorum*.
- c) Determinar si el NEB es el órgano blanco de los sistemas melatoninérgico y AVTérgico.

Métodos:

-Registro de la FB-DOE

Los individuos (n=46) fueron alojados en peceras individuales en la estación conductual descrita en la sección 5.2.1 (Figura 5.1B), el día previo a la manipulación. La temperatura se mantuvo constantemente a 20°C con un fotoperíodo de 12:12. La iluminación ambiente es de 300 lux de 7 a 19 hs y 0 lux de 19 a 7 hs. Se realizaron registros continuos de la conducta eléctrica desde una hora antes del tratamiento farmacológico y hasta dos horas después en individuos aislados en libre movimiento. Los registros se realizaron en 2 ventanas temporales: durante el día (de 10:00 a 13:00 hs) y al atardecer (de 18:00 a 21:00 hs) con el apagado de la luz en la estación conductual fijado a las 19:00 hs. El análisis se realizó mediante la medida de los intervalos inter descarga en ventanas de 10 s cada 10 min. Para la medida de los intervalos se utilizó el protocolo de umbral del programa Clampfit (Axon). A partir de los intervalos medidos se calculó el valor promedio de frecuencia.

Se calcularon los índices de aumento de la FB-DOE (FBIn) para la comparación de los momentos de interés en cada caso (cap. 5). Para animales tratados durante el día se comparó el valor máximo de la FB-DOE en la hora posterior al

tratamiento con el valor registrado una hora antes del mismo ($FBIn_{max/-60}$). Para los individuos tratados al comienzo de la noche los índices se calcularon comparando los valores alcanzados a los 10 min posteriores al apagado de la luz ($FBIn_{10/-60}$) ya que es el momento de máximo aumento nocturno durante la ventana temporal analizada.

-Manipulaciones farmacológicas

Los individuos fueron tratados en grupos experimentales (n=6 cada uno) los cuales recibieron inyecciones intraperitoneales (ip) de melatonina (Sigma, M5250), AVT (American Peptide Company), Luzindole (antagonista de receptores melatoninérgicos MT_1 y MT_2 , Sigma, L2407), Manning Compound (MC, antagonista de receptores de AVT V_{1a} , Bachem, 4031349) o solución salina (NaCl 0,9%). Los fármacos fueron administrados en un volumen final de 0,1ml de solución salina, de acuerdo a las siguientes dosis:

- AVT: 10 μ g/g de peso corporal (Perrone et al., 2010)
- MC: 2 μ g/g de peso corporal (Perrone et al., 2010)
- Melatonina: 2 μ g/g de peso corporal (Pinillos et al., 2001)
- Luzindole(antagonista melatoninérgico): 1 μ g/g de peso corporal (Pinillos et al., 2001).

Todos los fármacos se administraron en la mañana (11:00hs, Figs. 7.1-7.4) en peces con 24 hs previas de aclimatación a la estación de registro. Los bloqueantes luzindole y MC se administraron 30 min antes del apagado de la luz (Figs. 7.5 y 7.6) en la segunda noche de permanencia en la estación de registro. El aumento nocturno de la FB-DOE de la primera noche se registró como referencia de individuo intacto.

-Registro del NEB *in vitro*

Obtención del preparado: Los individuos fueron anestesiados (pentobarbital sódico 1 μ g/g de peso corporal) y eutanizados por medios mecánicos. Se extrajo el cerebro y se lo mantuvo bañado en una solución de extracción rica en sacarosa. Se obtuvieron rebanadas de 600-700 μ m de espesor conteniendo el NEB. Las rebanadas se mantuvieron bañadas por una solución fisiológica en la cubeta de registro.

Soluciones fisiológicas (Spiro, 1997):

- Extracción (mM): 213 Sacarosa; 3 KCl; 0,75 KH₂PO₄; 1,2 MgSO₄; 24 NaHCO₃; 10 D-Glucosa; 1,6 CaCl; pH: 7,2 - 7,4 posterior a burbujeo con carbógeno (O₂ 95%, CO₂ 5%)
- Registro (mM): 124NaCl; 3 KCl; 0,75 KH₂PO₄; 1,2 MgSO₄; 24 NaHCO₃; 10 D-Glucosa; 1,6 CaCl; pH: 7,2 - 7,4 posterior a burbujeo con carbógeno (O₂ 95%, CO₂ 5%)

AVT se aplicó a la solución de registro a una concentración de 1 μ M (n=6) por períodos de 20 min con posterior lavado. MC (n=4 de los tratados con AVT) se aplicó a una concentración de 10 μ M previo a la aplicación de AVT.

La actividad del NEB se registró en forma extracelular utilizando pipetas de vidrio llenas de solución salina (4-8 M Ω) ubicadas en la proximidad de los somas neuronales. Los registros fueron amplificados (Axoclamp 2B) y digitalizados (Digidata 1322A) para su posterior procesamiento mediante el software Axon (Clampfit). Se tomaron registros de 30s cada minuto a partir de los cuales se calculó la frecuencia promedio. Estos experimentos formaron parte de una pasantía de entrenamiento realizada bajo la supervisión del Dr. Michel Borde en el Laboratorio de Neurofisiología Celular y Sináptica del Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina.

Resultados

Modulación farmacológica de la FB-DOE

La Figura 7.1A muestra el resultado del tratamiento diurno con melatonina en comparación al tratamiento con solución salina en un individuo aislado representativo de *Gymnotus omarorum*. La melatonina produjo un aumento significativo en la FB-DOE del 36% (FBIn_{Mel}=0.36 \pm 0,15) respecto a su valor pre-tratamiento (FB₋₆₀ vs FB_{Mel}; n=6, test pareado de Wilcoxon, p=0.015). El máximo efecto se alcanzó en los 30 min siguientes a la inyección (FB_{Mel}), momento en el cual se calculó en FBIn_{Mel} el cual presenta valores significativamente superiores a los alcanzados en animales tratados con solución salina (FBIn_{Sal} vs FBIn_{Mel};

n=6; test *U* de Mann-Whitney, $p=0.013$, Figura 7.1B). Una hora después de la inyección, el aumento no es significativo en comparación con el tratamiento con solución salina (FBIn_{Sal60} vs FBIn_{Mel60}; n=6; test *U* de Mann-Whitney, $p=0,25$; Figura 7.1B).

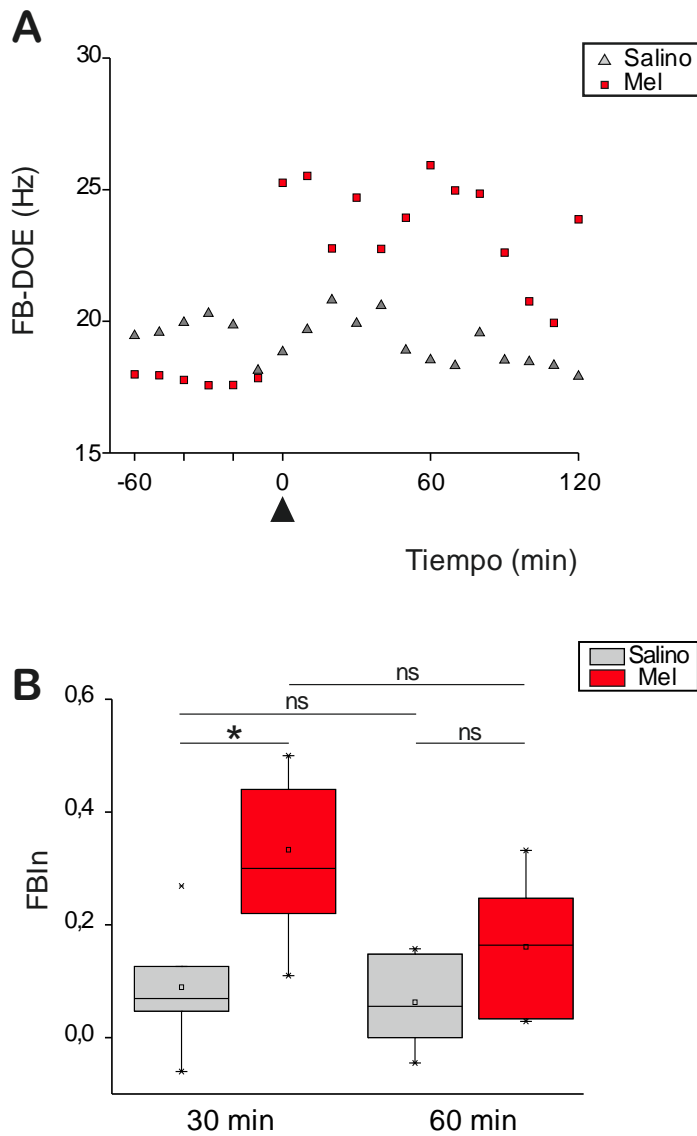


Figura 7.1. Efecto del tratamiento con melatonina sobre la FB-DOE en individuos aislados de *G. omarorum* durante el día. **A)** Valores de FB-DOE en media (\pm SD) en un individuo tratado con melatonina (rojo) en comparación a otro individuo control inyectado con solución salina (gris) a las 11:00 hs (la flecha señala el momento de las inyecciones). **B)** Box plot del efecto de la inyección de melatonina sobre el FBIn en los primeros 30 min y una hora después de la inyección. Comparaciones no pareadas con distintos tratamientos: $n_{\text{melatonina}}=6$, $n_{\text{salino}}=6$, barra sólida: test *U* de Mann-Whitney, ns: no significativo, *: $p<0.05$.

La Figura 7.2A muestra el resultado del tratamiento diurno con AVT en comparación al tratamiento con solución salina en un individuo aislado representativo de *Gymnotus omarorum*. El AVT produjo un aumento significativo en la FB-DOE cercano al 30% ($FB_{InAVT}=0.31 \pm 0,15$) respecto a su valor pre-tratamiento (FB-60 vs FBAVT; $n=6$, test pareado de Wilcoxon, $p=0,03$). El máximo efecto se alcanzó en los 10 min siguientes a la inyección (FBAVT), momento en el cual el índice de aumento presenta valores significativamente superiores a los alcanzados en animales tratados con solución salina (FB_{InSal} versus FB_{InAVT} ; $n=6$; test U de Mann-Whitney, $p=0,03$; Figura 7.2B). Media hora después de la inyección, el aumento no es significativo en comparación con el tratamiento con solución salina ($InFBSal30$ versus $InFBAVT30$; $n=6$; test U de Mann-Whitney, $p=0,29$; Figura 7.2B).

El mismo protocolo de tratamiento se llevó a cabo durante el día utilizando los bloqueantes específicos de melatonina y AVT, luzindole y MC respectivamente. Como era esperable, ni luzindole ni MC tuvieron efecto sobre la FB-DOE (FB_{Luz} vs FB_{Sal} ; $n=6$; test *U* de Mann-Whitney; $p=0,76$), (FB_{MC} vs FB_{Sal} ; $n=6$; test *U* de Mann-Whitney; $p=0,16$). La Figura 7.3A muestra que el tratamiento con estos bloqueantes no produce cambios en la FB-DOE a lo largo de la primer hora posterior al tratamiento (FB_{InSal} versus FB_{InMC} vs FB_{InLuz} , $n=6$, test de Kruskal-Wallis, $p=0,46$). Es interesante observar en la Figura 7.3B que la administración previa de MC fue capaz de bloquear el aumento de la FB-DOE producido por el tratamiento con melatonina (FB_{InSal} vs FB_{InMel} vs $FB_{InMC-Mel}$, $n=6$, test de Kruskal-Wallis, $p=0.05$).

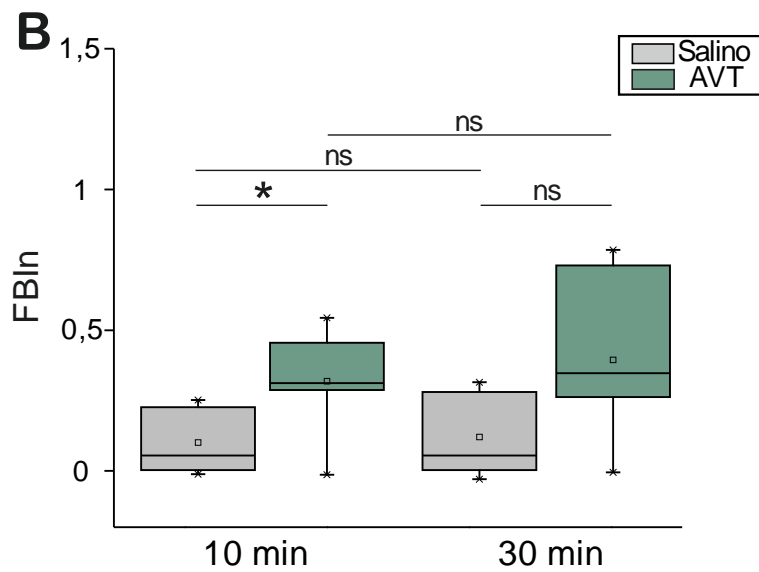
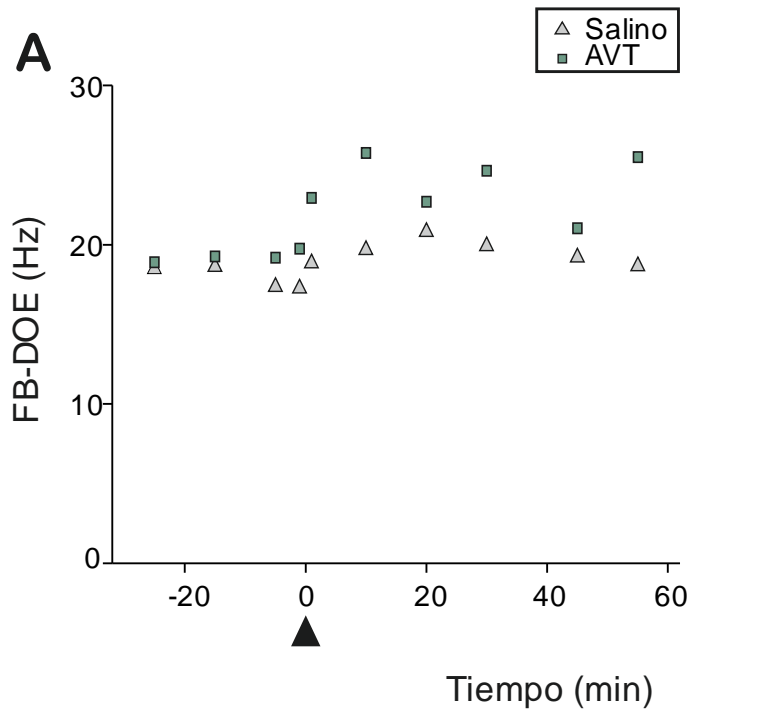


Figura 7.2. Efecto del tratamiento con AVT sobre la FB-DOE en individuos aislados de *Gymnotus omarorum* durante el día. **A)** Valores de media (\pm DS) de la FB-DOE en un individuo tratado con AVT (verde) en comparación a otro individuo control inyectado con solución salina (gris) a las 11:00 hs (la flecha señala el momento de las inyecciones). **B)** Box plot del efecto de la inyección de melatonina sobre el FBIn que es máximo y significativamente mayor que el efecto de la administración de solución salina luego de los primeros 10 min y a los 30 min cuando ya no es significativamente diferente de la inyección de solución salina. $n_{AVT}=6$, $n_{control}=6$, barra sólida: test *U* de Mann-Whitney, ns: no significativo, *: $p<0.05$.

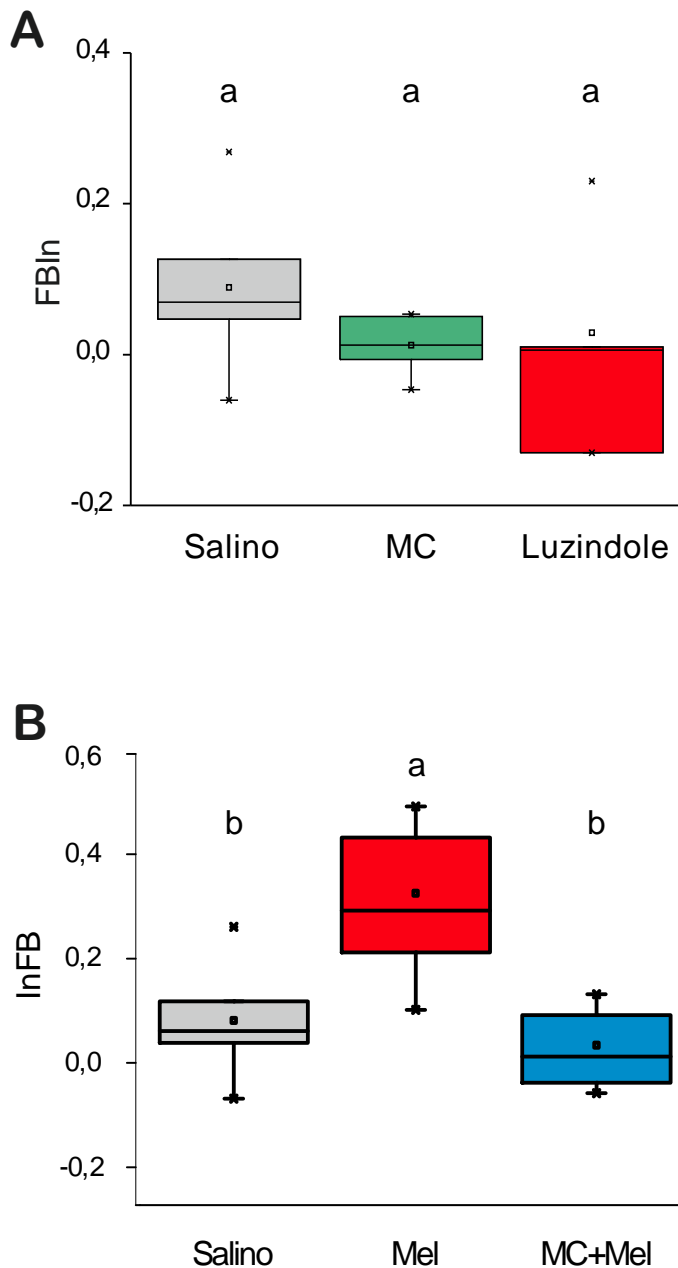


Figura 7.3. Efecto del tratamiento con MC y luzindole sobre la FB-DOE en individuos aislados de *Gymnotus omarorum* durante el día. **A)** Box plot para la comparación de los efectos de la administración de solución salina, luzindole y MC sobre la FB-DOE durante el día, medidos por el FBIIn respectivo que no presenta cambios significativos entre estos tratamientos. **B)** Box plot para la comparación de los efectos de la administración de solución salina, melatonina y la combinación de MC+melatonina sobre la FB-DOE medidos por el InFB respectivo que no muestra que el MC bloquea el efecto de la melatonina. $n_{\text{melatonina}}=6, n_{\text{salino}}=6, n_{\text{luzindole}}=6, n_{\text{MC}}=6, n_{\text{MC+melatonina}}=6$, test de Kruskal-Wallis, letras iguales: no significativo, letras diferentes: $p<0.05$.

El tratamiento diurno con melatonina y AVT emula el aumento nocturno descrito para la primera hora de oscuridad en el laboratorio. En la figura 7.4A y B se incluye la descripción del aumento nocturno presentada en el capítulo 6 (Figura 6.2). En la figura 7.4C mostramos que el aumento nocturno de la FB-DOE de animales tratados con solución salina, medido 10 min después del atardecer (FB-DOE en el momento de máximo aumento nocturno, FB_{Sal}), fue similar al obtenido por el tratamiento diurno con melatonina y AVT (FB_{InSal} vs FB_{InMel} vs FB_{InAVT} , test de Kruskal-Wallis, $n=6$, $p=0,82$).

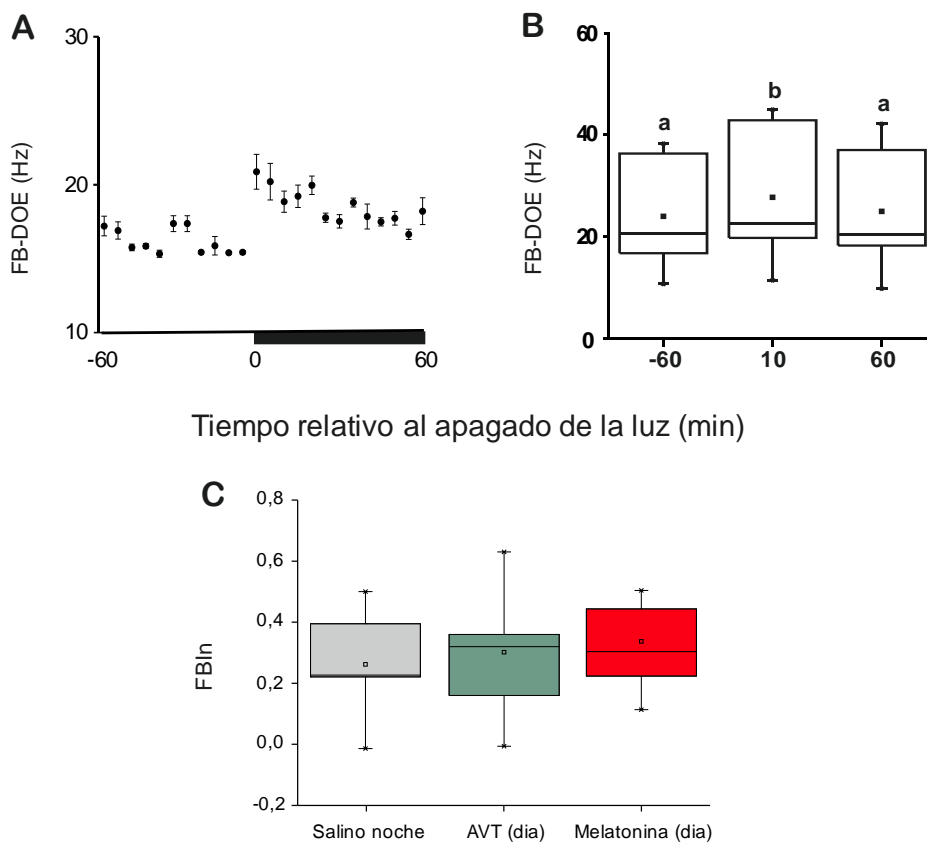


Figura 7.4. Aumento nocturno temprano de la FB-DOE en laboratorio. **A)** Ejemplo representativo de la variación de la FB-DOE (media \pm SD) calculada cada 10 min durante una hora antes (-60) y una hora después (60) del apagado de la luz (0). **B)** Boxplot para la comparación de la FB-DOE una hora antes del atardecer (FB_{-60}), 10 y 60 min después del atardecer (FB_{10} , FB_{60}). Comparaciones pareadas a distintos tiempos: $n=9$, prueba de Friedman, letras iguales: no significativo, letras diferentes/*: $p<0.05$. **C)** Box plot para la comparación de los FBIn obtenidos luego del aumento nocturno de la FB-DOE y luego del tratamiento diurno con melatonina y AVT ($n=6$, test de Kruskal-Wallis). Letras iguales: no significativo.

Para analizar el rol de la melatonina y el AVT en el aumento nocturno de la FB-DOE de *Gymnotus omarorum*, realizamos inyecciones de sus antagonistas 30 min antes del apagado de la luz en individuos aislados en la estación conductual. La Figura 7.5A muestra, con un ejemplo representativo, que el tratamiento con luzindole abolió el aumento nocturno de la FB-DOE, comparado con el registrado para el mismo animal durante la noche anterior. Cuando se comparó el aumento nocturno de la FB-DOE en cada individuo entre la noche 1 (intactos) y la noche 2 (tratados con luzindole), en el punto máximo de aumento, se observó un decremento significativo en el aumento nocturno en la noche correspondiente al tratamiento ($FB_{\text{intactos}} \text{ vs } FB_{\text{luz}}$; $n=6$; test pareado de Wilcoxon, $p=0.034$). Bajo el efecto de luzindole, los valores de FB-DOE registrados 60 y 10 min antes y 10 y 60 min después de apagada la luz, son similares entre sí (FB_{-60} , vs FB_{-10} vs FB_{10} vs FB_{60} ; $n=6$; Prueba de Friedman; $p=0,6$; Figura 7.5B). Se analizaron e incluyeron los valores de FB-DOE registrados 10 min antes del apagado de la luz con el objetivo de contar con una medida posterior a la manipulación de los individuos pero anterior al aumento nocturno. A los 10 min de apagada la luz los individuos tratados con luzindole presentaron un aumento de la FB-DOE (medido por el $FBIn_{\text{Luz}10/-60}$) significativamente inferior al que alcanzan los tratados con solución salina ($FBIn_{\text{Sal}10/-60}$ vs $FBIn_{\text{Luz}10/-60}$; $n=6$; test U de Mann-Whitney; $p=0.032$; Figura 7.5C).

La Figura 7.6A muestra con un ejemplo representativo que el tratamiento con MC previo al comienzo de la noche no modificó el aumento nocturno de la FB-DOE observado en individuos intactos y tratados con solución salina. Bajo el efecto de MC, los valores de FB-DOE registrados 60 y 10 min antes y 60 min después de apagada la luz son similares entre sí, pero se observa un aumento significativo a los 10 min de comenzada la noche (FB_{-60} vs FB_{-10} vs FB_{10} vs FB_{60} ; $n=6$; Prueba de Friedman; $p=0001$; Figura 7.6B). Más aún, los índices de aumento de la FB-DOE a los 10 min del apagado de la luz en individuos tratados con MC no fueron significativamente diferentes de los registrados en animales tratados con solución salina ($FBIn_{\text{Sal}10/-60}$ vs $FBIn_{\text{MC}10/-60}$; $n=6$; test U de Mann-Whitney; $p=0,08$; Figura 7.6C).

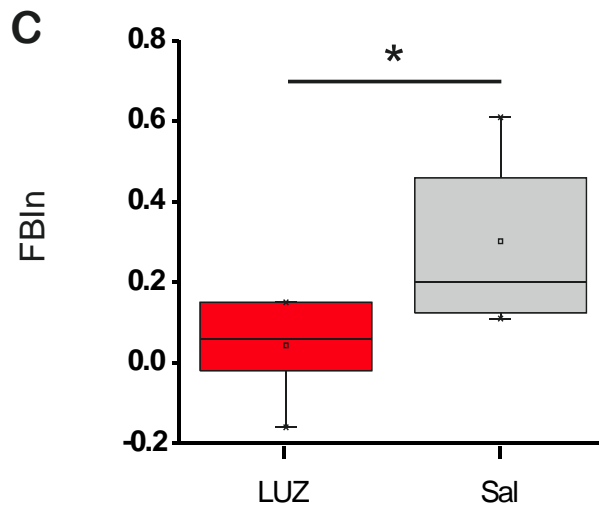
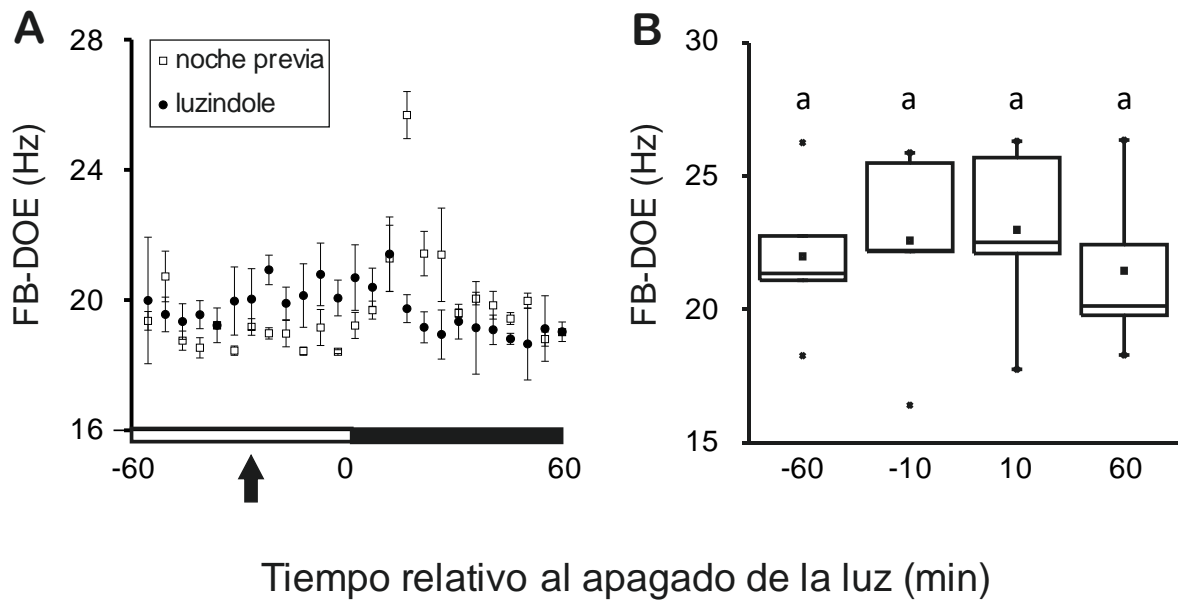


Figura 7.5. Efecto del tratamiento con luzindole sobre el aumento nocturno de la FB-DOE en individuos aislados de *Gymnotus omarorum*. **A)** FB-DOE en la hora previa y la hora posterior al apagado de la luz en un individuo representativo en dos noches sucesivas. La flecha indica el momento de la inyección de luzindole en la segunda noche de registro. **B)** Box plot para la comparación de la FB-DOE una hora antes (FB₋₆₀), 10 minutos antes (FB₋₁₀), 10 minutos después (FB₁₀) y 60 minutos después (FB₆₀) del apagado de la luz en la estación conductual en la segunda noche bajo los efectos del tratamiento con luzindole (n=6, Prueba de Friedman). **C)** Box plot para la comparación de los InFB obtenidos 10 min después del apagado de la luz entre individuos tratados con solución salina y con luzindole (n=6, test U de Mann-Whitney). Letras iguales: no significativo, *: p<0.05.

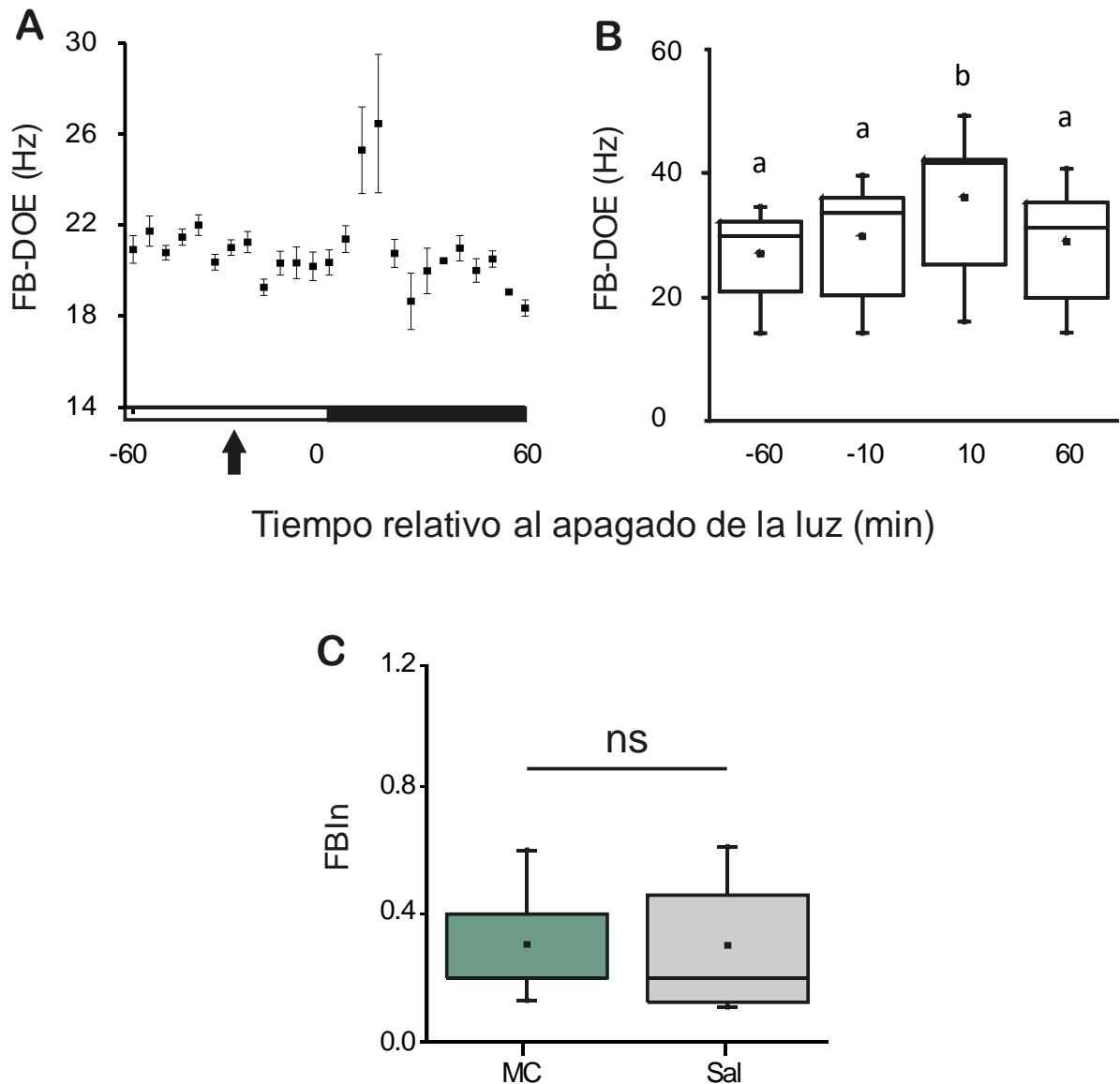


Figura 7.6. Efecto del tratamiento con MC sobre el aumento nocturno de la FB-DOE en individuos aislados de *Gymnotus omarorum*. **A)** FB-DOE en la hora previa y la hora posterior al apagado de la luz en un individuo representativo. La flecha indica el momento de la inyección de MC. **B)** Box plot para la comparación de la FB-DOE una hora antes (FB₋₆₀), 10 minutos antes (FB₋₁₀), 10 minutos después (FB₁₀) y 60 minutos después (FB₆₀) del apagado de la luz en la estación conductual bajo los efectos del tratamiento con MC (n=6, Prueba de Friedman). **C)** Box plot para la comparación de los FBIn obtenidos 10 min después del apagado de la luz entre individuos tratados con solución salina y con MC (n=6, test U de Mann-Whitney). Letras iguales/ns: no significativo, letras diferentes: p<0.05.

Registro de la actividad del NEB

El efecto de la aplicación de AVT sobre la actividad espontánea del NEB se ilustra en la Figura 7.7. La actividad espontánea basal del NEB registrado *in vitro* presentó frecuencias de descarga de entre 21 y 28 Hz ($n=6$; $24,03 \pm 2,31 \times 10^{-5}$ Hz). El tratamiento con AVT produjo un incremento relativo a la frecuencia basal de $1,58 \pm 0,44$ Hz ($n=6$; test pareado de Wilcoxon; $p=0,028$) equivalente a un $7,2 \pm 2,4 \times 10^{-5}$ %. La respuesta al tratamiento alcanzó valores máximos en aproximadamente 10 minutos ($12,00 \pm 2,48$ min). La respuesta fue autolimitada ya que aún en presencia de AVT la frecuencia tendió a disminuir, llegando a la línea de base unos 20 min después del tiempo al máximo (tiempo de caída $20,02 \pm 6,27$ min). La reproducibilidad de los datos se confirmó por lavado con posterior re-aplicación de AVT ($n=2$) en la misma rodaja. La respuesta fue bloqueada por aplicación previa de MC ($n=4$).

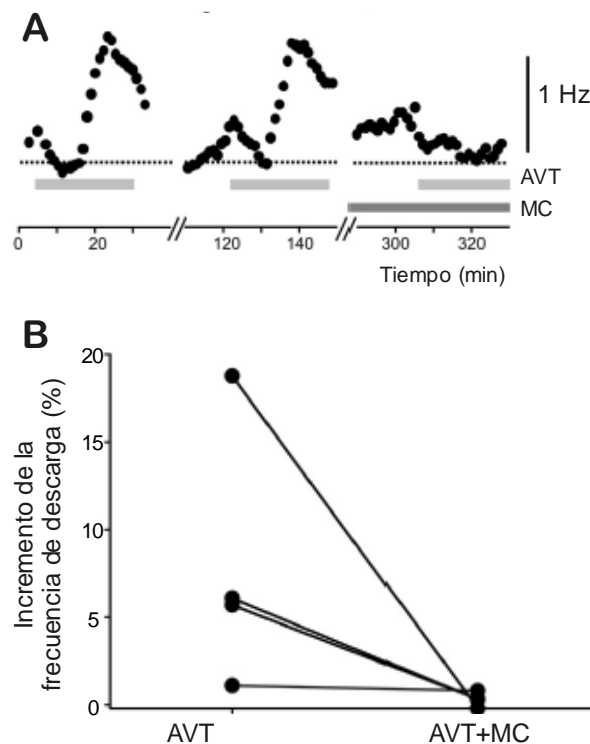


Figura 7.7. Efecto de la aplicación de AVT sobre la actividad espontánea del NEB de *Gymnotus omarorum* en una preparación *in vitro*. **A)** El tratamiento con AVT provoca un incremento de la frecuencia de descarga del NEB que alcanza el máximo a los 10 minutos y decae 20 minutos después. El efecto es reproducible (1 y 2) y se bloquea por aplicación previa de MC (3). **B)** La aplicación de MC tuvo un efecto consistente en los cuatro casos estudiados.

Discusión

En este capítulo partimos de la siguiente hipótesis:

La FB-DOE de *G. omarorum* es modulada por los sistemas AVTérgico y melatoninérgico actuando a nivel del NEB.

Los datos presentados en este capítulo refrendan parcialmente la hipótesis planteada sobre la neuromodulación del aumento nocturno de la FB-DOE en *Gymnotus omarorum*. Tanto la melatonina como el AVT inyectados intraperitonealmente aumentan la FB-DOE durante el día. Esto confirma nuestra primer predicción mostrando que estos neuromoduladores son suficientes para provocar un incremento en la FB-DOE y por lo tanto un incremento en la frecuencia de descarga del NEB el cual puede ser directo (por acción sobre las neuronas que lo componen) o indirecto (por acción a nivel de otra estructura central cuya actividad module al NEB). El aumento provocado en ambos casos es rápido, con un tiempo al máximo de 10 a 30 minutos y un efecto autolimitado que se agota una hora después de la inyección. Por otra parte, demostramos que no existe un tono endógeno de estos sistemas de neuromoduladores durante el día, ya que el tratamiento con sus antagonistas específicos no produce ningún efecto sobre la FB-DOE diurna. En el capítulo 6 mostramos que los individuos aislados en la estación conductual tienen un aumento nocturno temprano, ligeramente mayor al 10%, al inicio de la noche (10 minutos después del apagado de la luz) que es de corta duración. Este aumento nocturno es emulado en el día por la acción de melatonina y AVT tanto en magnitud como en dinámica temporal.

El bloqueo de los receptores de melatonina pero no los de AVT abolen el aumento nocturno de la FB-DOE que ocurre al principio de la noche. Concluimos entonces que el aumento nocturno de este parámetro de la conducta eléctrica en individuos aislados está sujeto a la modulación temporizadora que ejerce el sistema melatoninérgico, pero no a la modulación social del sistema AVTérgico. A nivel del sistema nervioso central el tratamiento con AVT produce un incremento en la frecuencia de descarga espontánea del NEB, indicando que su acción sobre la FB-DOE ocurre a este nivel. El NEB, núcleo comando de la DOE

y efector último de las modulaciones descendentes e influencias neuroendócrinas, es una ventana directa a los mecanismos que subyacen el rico repertorio de la conducta eléctrica (Hagedorn and Heiligenberg, 1985; Silva et al., 2007; Silva et al., 2002; Silva et al., 2013). El tratamiento con AVT produce un aumento en frecuencia, análogo al observado en la FB-DOE en respuesta al mismo tratamiento, evidenciando la relación 1:1 en la actividad del NEB y del OE. La influencia endógena del AVT sobre la actividad del NEB se sustenta anatómicamente por la evidencia de terminales AVTérgicas en la vecindad del núcleo (Perrone et al., 2014; Pouso et al., 2017). El MC impide este efecto, sugiriendo la participación de los receptores AVTérgicos de tipo V1a en la respuesta descrita. El curso temporal de la respuesta observada, con un incremento gradual y duración que se mantiene por decenas de minutos, es indicador de una acción neuropeptidérgica (van den Pol, 2012). La activación de los receptores V1a desencadena una cascada de transducción asociada a proteínas G cuyo mecanismo no está del todo dilucidado. La evidencia experimental indica que la activación de los receptores promueve un aumento de la excitabilidad posiblemente a través de la activación de una corriente catiónica ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) entrante, lenta y sostenida, o por la inhibición de una conductancia de K^+ de reposo (Neumann and van den Burg, 2013; Raggenbass, 2008). Si bien este efecto directo parece probable, no puede descartarse que la acción AVTérgica esté ocurriendo en interneuronas locales o en terminales presinápticas contenidas en la rodaja. La demostración de un efecto directo requeriría que se observara un efecto depolarizante generado por la aplicación de AVT en presencia de TTX en neuronas marcapaso o que el efecto de AVT sobre la actividad de las neuronas marcapaso se mantuviera en presencia de bloqueantes de los neurotransmisores involucrados en el control de la actividad del NEB (glutamato y GABA). Existe amplia evidencia que indica que la mayor parte de la modulación en gymnotiformes se basa en proyecciones que llegan al NEB desde estructuras pre-marcapaso localizadas en el diencefalo, mesencefalo, área octavolateral y bulbo raquídeo (Comas and Borde, 2010; Dye and Meyer, 1986; Heiligenberg et al., 1981; Kawasaki and Heiligenberg, 1989; Kawasaki et al., 1988; Keller et al., 1991; Keller et al., 1990; Metzner, 1999; Zupanc and Heiligenberg, 1992). Estas estructuras pre-marcapaso son consideradas sitios de integración y concebidas como la interfase neural entre el

sistema electromotor y centros superiores implicados tanto en el procesamiento sensorial (Keller et al., 1991; Metzner, 1999; Wong, 1997; Zupanc and Horschke, 1996) como en la organización de salidas motoras (Comas and Borde, 2010). Las estructuras pre marcapaso también pueden integrar entradas relacionadas con la modulación adaptativa de la conducta eléctrica (Zupanc, 2002) y la electrocomunicación (Giassi et al., 2012; Wong, 1997).

El aumento nocturno en la FB-DOE es una característica esperable en una especie nocturna, cuyo nivel de alerta general aumenta en la noche. La DOE es una señal portadora de información sensorial cuya frecuencia determina la cantidad de información que recibirá el sistema nervioso en un tiempo dado. Por otra parte, la FB-DOE es una señal de comunicación modulada en forma importante por el cerebro social. El sistema melatoninérgico, clave en la organización temporal de la conducta así como el sistema AVTérgico, de vital importancia en la modulación social, son capaces de modular la FB-DOE en animales aislados en horas de la mañana. Ambos fármacos producen un aumento en la FB-DOE cuyo curso temporal remeda el del aumento nocturno registrado en la especie. Este resultado surge probablemente de la modulación de la actividad basal del NEB provocada por los mismos fármacos. Vale la pena considerar que la FB-DOE registrada durante el día no se basa en un tono melatoninérgico o AVTérgico ya que el tratamiento con luzindole y MC no provocó efecto alguno sobre la FB-DOE.

Una de las predicciones que guiaron este capítulo consideraba la modulación melatoninérgica y la AVTérgica como las responsables del aumento nocturno de la FB-DOE. Nuestros resultados refrendan parcialmente esta hipótesis ya que la inhibición de la acción melatoninérgica abole el aumento nocturno mientras que la inhibición de la acción AVTérgica no lo abole. La ausencia de efecto del tratamiento con MC, en una especie en la que su eficacia como bloqueante ya ha sido demostrada, resultó sorprendente dado el efecto consistente de AVT sobre la FB-DOE y la robustez del efecto de MC. La ausencia de tono AVTérgico en el aumento nocturno de un individuo aislado no nos permite descartar la posibilidad de que el sistema AVTérgico medie modulaciones de la DOE inducidas socialmente en peces en contexto social. Es ampliamente conocido que los neuropéptidos sociales como AVT tienen acciones moduladoras

dependientes de la estación, fenotipo y del contexto (Goodson and Bass, 2000; Insel and Young, 2000; Lutterschmidt and Wilczynski, 2012).

La melatonina es la hormona temporizadora del cerebro en diferentes taxa y señala tanto la ocurrencia como la duración de la noche (Falcon et al., 2010; Maitra et al., 2012). Dado su rol central como modulador del sistema circadiano en teleósteos es un candidato natural para conocer y modular el incremento basal de la conducta eléctrica. Los resultados de este capítulo mostraron que el bloqueo de la acción melatoninérgica con luzindole inhibió el aumento nocturno normal de la FB-DOE. Este es hasta ahora el primer reporte de la acción melatoninérgica en peces eléctricos de descarga débil. Más aún, la acción del sistema melatoninérgico aparece como más compleja de lo que se esperaría ya que se evidenció que el aumento de la FB-DOE diurno generado por la inyección de melatonina es inhibido por el tratamiento previo con MC. Estudios recientes han reportado interacciones entre AVT y melatonina en el control de variables diarias y estacionales (Howard and Lutterschmidt, 2015). Es interesante considerar que el POA ha sido señalado al mismo tiempo como reloj endógeno y blanco de la acción melatoninérgica (Falcon et al., 2010) y por otra parte como el núcleo donde se localizan las células AVTérgicas en varias especies de teleósteos incluido *G. omarorum* (Dewan et al., 2008; Maruska, 2009; Pouso et al., 2017). Las proyecciones AVTérgicas del POA en *G. omarorum* alcanzan el NEB (Perrone et al., 2014; Pouso et al., 2017) determinando un posible sustrato anatómico para esta interacción.

La acción de estos neuromoduladores endógenos requiere considerar la regulación diferencial de la FB-DOE en las dos fases del ciclo día/noche. La liberación endógena de la melatonina ocurre en fase con la noche y el bloqueo de los receptores melatonérgicos al inicio de la noche pone en evidencia su rol mediador en el aumento nocturno. El sistema AVTérgico, en cambio, no parece ser esencial para el aumento nocturno temprano en individuos aislados. Sin embargo, la modulación diurna de la FB-DOE pone en evidencia una interacción entre el sistema melatonérgico y el AVTérgico, actuando el primero a través del último. Postulamos que durante la noche la melatonina actúa sobre receptores presentes en el NEB generando el aumento nocturno. Durante el día su efecto ocurriría por la activación de receptores melatoninérgicos en el POA cuyas neuronas AVTérgicas aumentarían su liberación en la vecindad del NEB

incrementando su frecuencia de descarga. Esto requiere que exista una variación circadiana en la expresión de los receptores melatoninérgicos, lo cual ha sido reportado en otras especies de teleósteos (Iigo et al., 2007; (Shin et al., 2011).

8. El aumento nocturno de la FB-DOE en el hábitat natural

Objetivos:

- a) Registrar las variaciones diarias de temperatura y intensidad luminosa subacuáticas a las que están expuestos los individuos registrados
- b) Evaluar el aumento nocturno de la FB-DOE en individuos aislados en el hábitat natural con acceso a claves lumínicas
- c) Evaluar el aumento nocturno de la FB-DOE en individuos en contexto social en el hábitat natural en oscuridad constante

Métodos

- Registros en aislamiento (seminaturales)

Se colocaron individuos aislados (n=5), recientemente colectados en Laguna del Sauce, en los recipientes plásticos descritos en el capítulo 5 (Figura 5.2D). Se tomaron medidas de la DOE durante 30 s, una vez por hora, durante 24 hs utilizando una tarjeta de sonido para digitalización (Realtek) previa amplificación (WorldPrecision Instruments DAM50).

- Registros en contexto social (natural)

Los individuos (n=6) fueron colectados y ubicados en bolsas de malla plásticas provistas de un par de electrodos como se describe en la sección 5.2.2 (figura 5.2C). Se tomaron medidas de la FB-DOE por 30 s, una vez por hora, durante 72hs utilizando una tarjeta de sonido para digitalización (Realtek) previa amplificación (World Precision Instruments DAM50).

- Tratamiento farmacológico

Los individuos (n=5) fueron ubicados en las mallas plásticas descritas previamente y registrados durante 48 hs que incluyeron dos noches. Durante la hora previa a la segunda noche se realizaron inyecciones intraperitoneales con luzindole (2 µg/g de peso corporal).

- Procesamiento de datos y estadística

Se calcularon los índices de aumento de la FB-DOE para la comparación entre el máximo valor de FB-DOE en la noche (FB_{max}) respecto al valor una hora antes (FB_{-60}) ($FBIn_{max/-60}$) de acuerdo a la ecuación detallada previamente (cap. 5). El aumento nocturno de la FB-DOE se analizó utilizando un software especializado en procesamiento de datos rítmicos (Diez-Noguera, 1999). Se utilizó el ajuste de cosinor para el cálculo de las acrofases y el test de Rayleigh para las medidas poblacionales.

Resultados

Las variables ambientales y la actividad sincronizada del conjunto de individuos de la población son posibles sincronizadores del sistema circadiano y sus ritmos. Los datos registrados muestran el aumento nocturno de la FB-DOE en dos condiciones interesantes de comparar: a) individuos en contexto social sin clave lumínica, y b) individuos sin contexto social con clave lumínica.

La Figura 8.1A muestra las variaciones ambientales en luminosidad y temperatura registradas en el exterior y dentro del agua, bajo la vegetación natural. Como puede observarse la intensidad de la luz bajo el agua es nula, mientras que la temperatura cicla cada 24 hs con un pico a las 19 hs. La duración de los períodos de luz y de oscuridad puede observarse en el registro exterior y es característico del equinoccio con 12 hs de noche y 12 hs de día. En la figura 8.1B se muestran las condiciones ambientales para los individuos colocados en tanques plásticos en la orilla aislados del contexto social, pero sometidos a la influencia del ciclo día/noche. La temperatura del agua también presentó una fluctuación diaria con un máximo al atardecer al igual que en la laguna (Figura 8.1B).

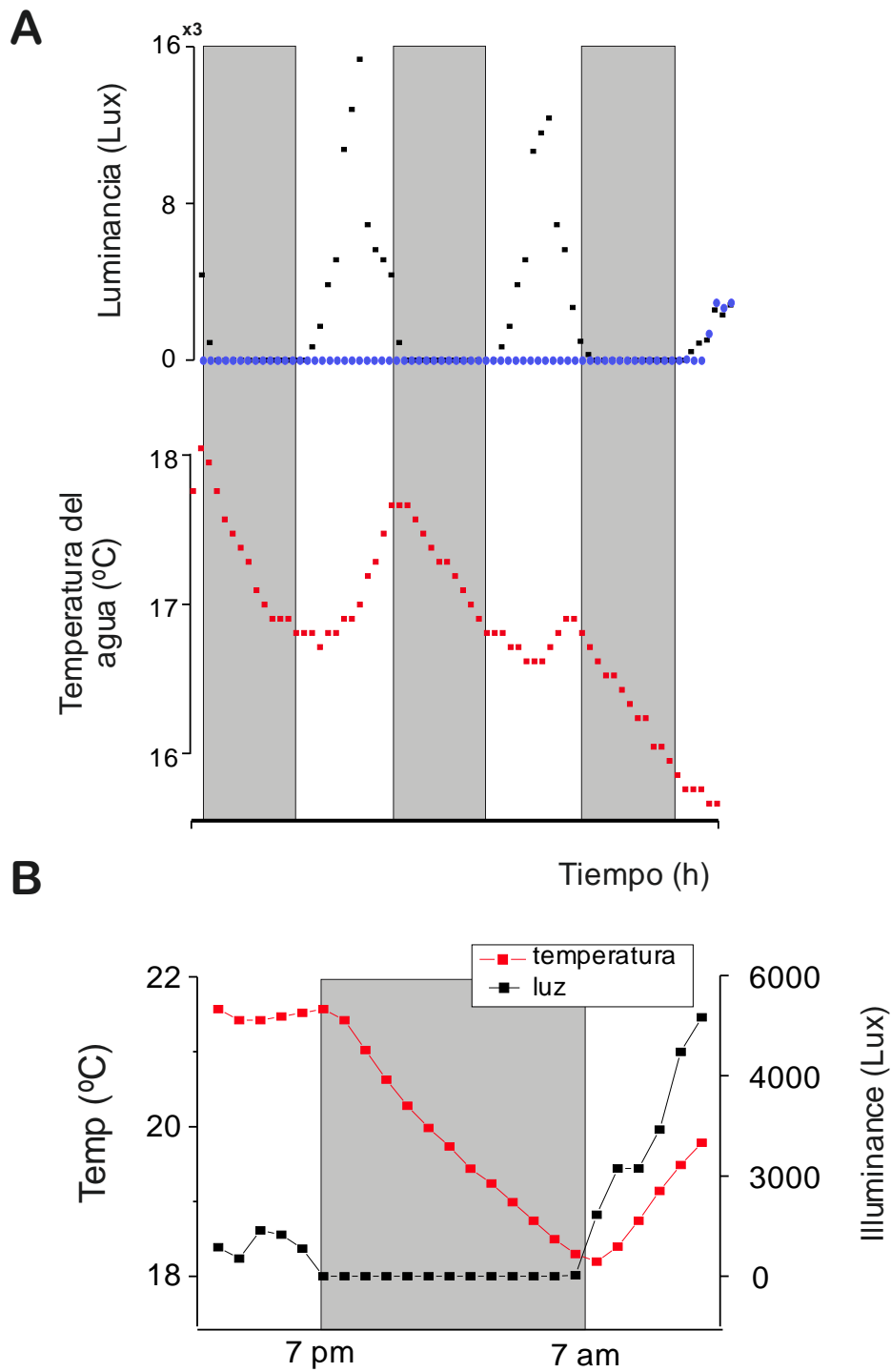


Figura 8.1. Registro de variables ambientales durante 72 hs en el hábitat natural de *Gymnotus omarorum*. **A)** Intensidad de la luz en el exterior (negro), intensidad de la luz bajo el agua (azul), temperatura del agua (rojo). Los rectángulos en gris corresponden a la noche (19:00 a 7:00). **B)** Registro de temperatura (rojo) y luminosidad (negro) en los contenedores plásticos.

El resultado del registro de la FB-DOE en el hábitat natural, donde las condiciones son de oscuridad constante, se muestra en la figura 8.2. Los registros para cada individuo (n=6) durante 72 hs muestran un claro aumento nocturno con máximos valores de frecuencia al inicio de la noche y valores mínimos hacia el amanecer (Figura 8.2A). El valor medio de aumento para la población es de 23% ($FBIn_{max/-60} = 0,23 \pm 0,09$). Se realizó el test de cosinor, con período de 24 hs para cada uno de los individuos registrados. Los resultados se muestran en la tabla 8.1. Con excepción del pez n°1 todos presentaron valores estadísticos significativos para el ajuste.

Fish #	p value	Acrophase (hours)
1	0.07	18.35
2	0.001	21.9
3	0.002	20.43
4	0.04	21.88
5	0.03	20.77
6	0.05	19.81

Tabla 8.1. Acrofase y validación estadística para el análisis de cosinor con período 24 hs para cada individuo registrado en el hábitat natural.

La FB-DOE en la noche presentó valores significativamente superiores a los registrados una hora antes (FB_{max} vs FB_{-60} , n=6, test pareado de Wilcoxon, $p=0.02$, Figura 8.2B). Se realizó un registro continuo de la FB-DOE (n=1) en una ventana temporal de 2 hs centrada en el atardecer (Figura 8.2C). El análisis cada 5 min de dicho registro muestra un aumento de la FB-DOE equivalente al registrado en el laboratorio.

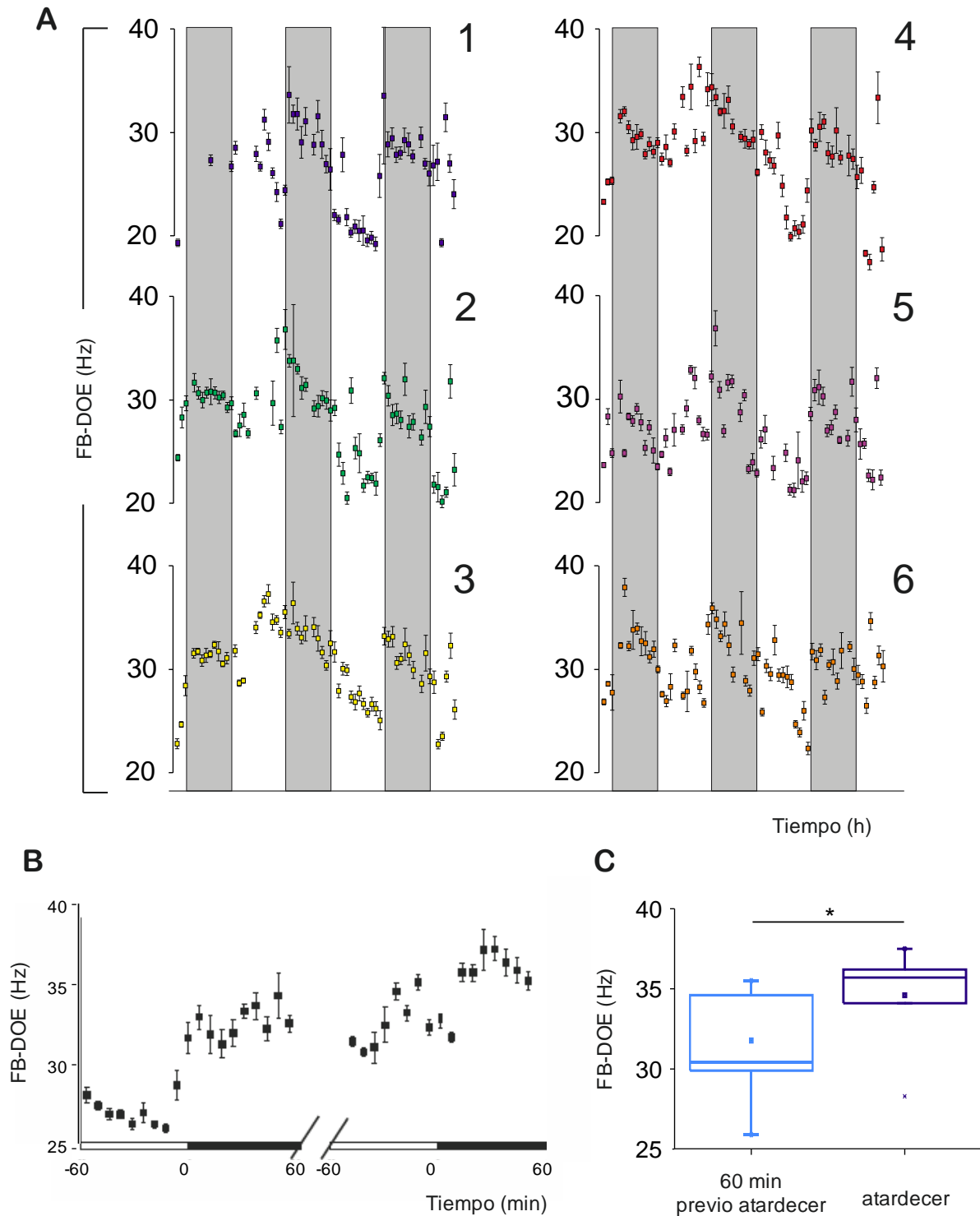


Figura 8.2. Aumento nocturno de la FB-DOE en individuos de *Gymnotus omarorum* mantenidos en su hábitat natural en contexto social. **A)** FB-DOE promedio (\pm SD) calculada para cada hora durante 72 hsen 6 individuos. Los rectángulos en gris corresponden a la noche (19:00 a 7:00). **B)** El registro durante 2 hs en torno a la hora del atardecer muestra el aumento de la FB-DOE (media \pm SD) equivalente al registrado en el laboratorio en un ejemplo representativo. **C)** Boxplot para la comparación de la FB-DOE una hora antes del atardecer (FB₋₆₀) y en el máximo registrado (FB_{max}). Comparaciones pareadas a distintos tiempos, n=6, test pareado de Wilcoxon, */p<0,05.

El registro de la DOE durante 24 hs en 5 individuos aislados muestra que la FB-DOE aumenta en la noche a pesar de la falta de contexto social (Figura 8.3A). La FB-DOE alcanza en la noche valores un 22% superiores a los registrados una hora antes del atardecer ($FB_{In_{max}/-60} = 0,22 \pm 0,13$), (FB_{max} vs FB_{-60} , $n=5$, test pareado de Wilcoxon, $p=0.03$, Figura 8.3B).

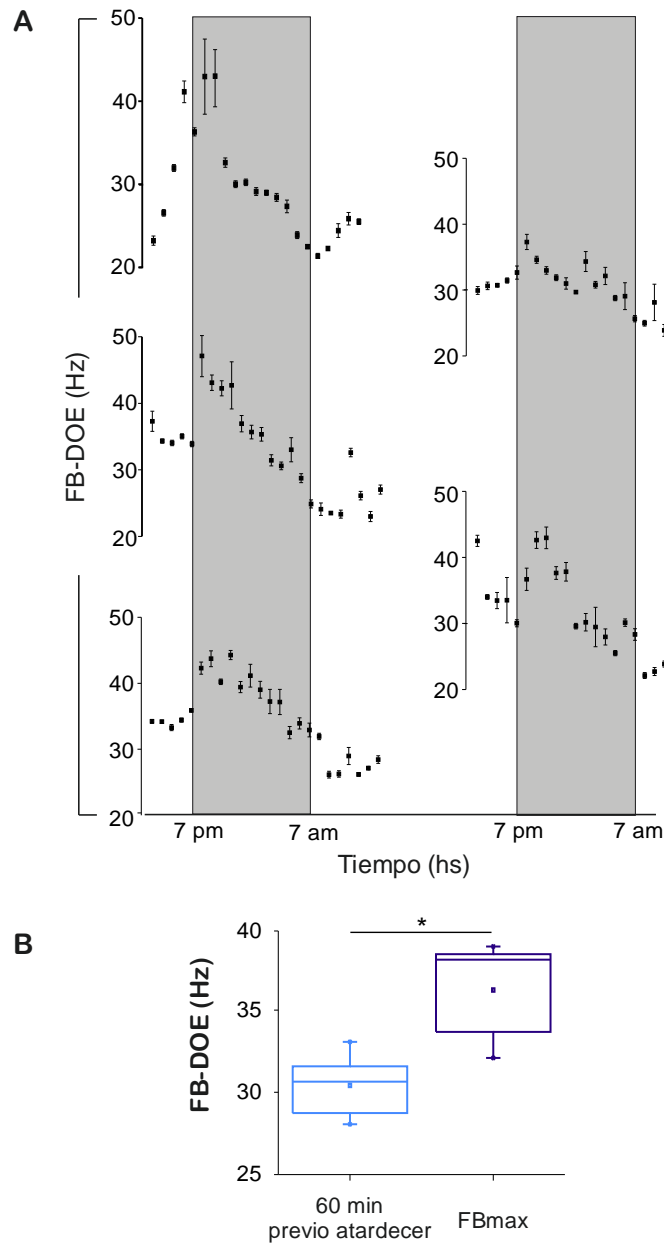


Figura 8.3. Aumento nocturno de la FB-DOE en individuos de *Gymnotus omarorum* aislados en su hábitat natural. **a)** FB-DOE promedio calculada para cada hora durante 24 hs en 5 individuos. Los rectángulos en gris corresponden a la noche (19:00 a 7:00). **b)** Boxplot para la comparación de la FB-DOE una hora antes del atardecer (FB_{-60}) y al valor máximo registrado en la noche (FB_{max}). *: $p < 0.05$.

Las variaciones en la FB-DOE de los individuos registrados en cada condición (individuos en contexto social sin clave lumínica e individuos sin contexto social con clave lumínica) fueron analizadas mediante el test de Rayleigh basado en las acrofases individuales en cada población (Figura 8.4). La acrofase promedio de la población registrada dentro de la laguna (n=5) ocurre a las 20:41 y muestra un alto nivel de sincronización (rango de dispersión de 20:12 a 22:34 hs) entre los individuos ($r=0.988$; $p=0.002$, Figura 8.4A). Los individuos registrados en aislamiento presentan una acrofase similar a las 21:12 ($r=0.902$; $p=0.01$) pero una mayor dispersión de las acrofases individuales las cuales se distribuyen en el rango de 19 a 24 hs (Figura 8.4B).

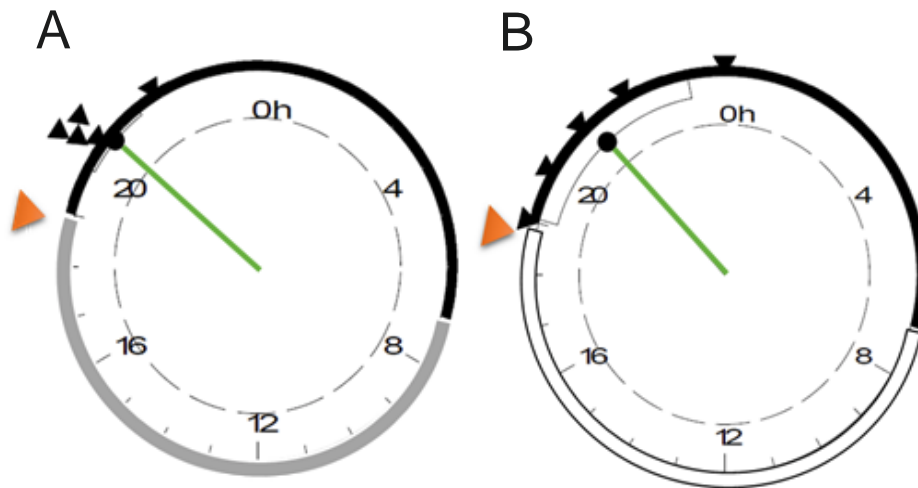


Figura 8.4. Comparación de las acrofases de la FB-DOE por el Test de Rayleigh en individuos de *Gymnotus omarorum* registrados en **A)** hábitat natural en contexto social y **B)** hábitat natural en aislamiento. Los triángulos negros señalan la acrofase de cada individuo, el triángulo naranja señala el tiempo en el que la temperatura tiene un valor máximo. La línea verde representa la acrofase poblacional promedio y su longitud el radio de Rayleigh (r), la circunferencia punteada representa el nivel de $p \leq 0.05$. El fotoperíodo se representa en el exterior de cada círculo: negro=noche, blanco=día, gris=día con luminosidad nula.

Los experimentos reportados en el capítulo 7 ilustran el rol de la melatonina en el aumento nocturno de la FB-DOE. Con el objetivo de analizar el rol del sistema melatoninérgico en el aumento nocturno expresado en condiciones naturales, se realizaron inyecciones intraperitoneales de luzindole en individuos ubicados en las mallas de plástico descritas previamente. La Figura 8.5A muestra la variación

en la FB-DOE durante 2 días en un individuo representativo. El tratamiento con luzindole se realizó 30 min antes del segundo atardecer y no bloqueó el aumento nocturno como se evidencia por la comparación entre los índices de aumento de la noche previa al tratamiento (FBIn_{NP}) y de la noche en la que los animales fueron tratados (FBIn_{luz}) (FBIn_{NP} vs FBIn_{luz}; n=5; test pareado de Wilcoxon, p=0.82, Figura 8.5B). Esta falta de efecto contrasta con los resultados obtenidos en animales mantenidos en la estación conductual donde el tratamiento con luzindole bloqueó el aumento nocturno disminuyendo el índice de aumento (FBIn_{luz}) respecto al de la noche anterior (FBIn_{NP}) (n=6, test pareado de Wilcoxon, p=0.03, Figura 8.5C).

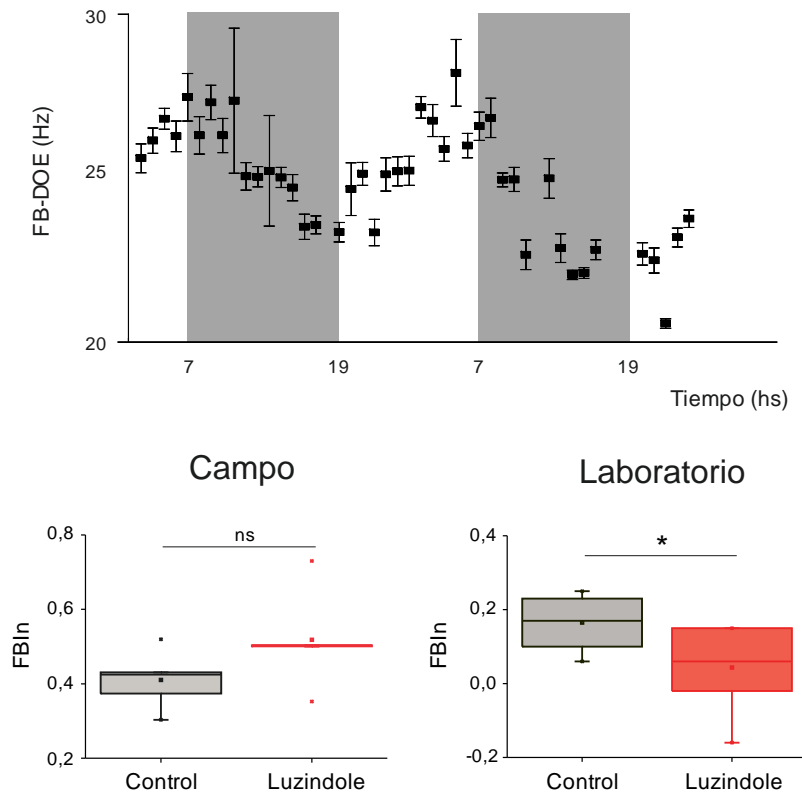


Figura 8.5. Efecto del tratamiento con luzindole en individuos de *Gymnotus omarorum* mantenidos en su hábitat natural en contexto social. **A)** Ejemplo ilustrativo de la variación en la FB-DOE (media \pm SD) a lo largo de 48hs. Los rectángulos grises señalan la noche. La flecha indica el momento de la inyección. **B)** Box plot para la comparación de los FBIn obtenidos a partir de la FB-DOE máxima registrada en la primer hora de la noche respecto a la del amanecer en la primer noche (control) y en la siguiente (donde recibieron el tratamiento con luzindole (comparación pareada en noches sucesivas, n=5, test pareado de Wilcoxon). ns: no significativo. A efectos de comparación se muestra el análisis similar realizado en laboratorio. Comparación pareada en noches sucesivas (n=6, test pareado de Wilcoxon, */p \leq 0,05).

Discusión

Este capítulo fue guiado por la siguiente hipótesis:

En el hábitat natural, las variaciones circadianas de la FB-DOE persisten sin claves lumínicas y son moduladas por el contexto social.

Los resultados presentados refrendan la hipótesis planteada. *G. omarorum* presenta un aumento nocturno de la FB-DOE también en su hábitat natural. Además mostramos que el aumento de la FB-DOE ocurre aún en ausencia de información sobre el ciclo día/noche, la cual es bloqueada por la vegetación natural en el sitio en que se alojan los individuos registrados. Así mismo, se evidenció que la presencia de coespecíficos determina un incremento en la sincronización del ritmo de aumento nocturno de la FB-DOE en la población y que dicho aumento es persistente frente al bloqueo de los receptores melatoninérgicos.

Dados los hábitos nocturnos de *G. omarorum*, aun cuando los individuos realicen actividades exploratorias en agua abierta, su exposición a la luz ambiente es limitada y en este capítulo se demuestra que aún los individuos restringidos en las redes de registro presentan un ciclo diario en la FB-DOE, que no necesita de la información directa del ciclo día/noche.

El hábitat natural de *G. omarorum* está caracterizado por extensiones de camalotes de la especie *Eichhornia crassipes*, denominados parches, donde los individuos se alojan durante las horas del día con alta fidelidad al sitio (Lucía Zubizarreta, comunicación personal). La tendencia a permanecer en el refugio durante el día (Marchal and Silva, 2014) y las características de la vegetación que bloquea el pasaje de la luz solar (Fontanarrosa et al., 2010) sugieren que la exposición a la luz está restringida sobre todo en los individuos que habitan lejos del borde del parche. Aquellos individuos cuyos refugios se encuentran más cercanos al agua abierta están más expuestos a las variaciones diarias de luz ambiental. Finalmente, es posible que en verano y en horas cercanas al medio día, cuando la incidencia de la luz solar es más perpendicular a la superficie del agua, la luz logre penetrar en la vegetación en mayor proporción. Más allá de la naturaleza circadiana del aumento nocturno existen dos variables cíclicas evidentes que pueden actuar como sincronizadores de las variaciones en la FB-

DOE: la temperatura y el aumento en la conducta eléctrica del resto de la población.

La conducta eléctrica es modulada por factores ambientales así como por la presencia de coespecíficos en diversos contextos sociales. La detección de estímulos novedosos, la activación de las respuestas de escape o la intención de iniciar un movimiento se acompañan de incremento de corta duración en la FB-DOE. En este trabajo confirmamos que, aunque la iluminación permanece constante, la temperatura varía con un ciclo diario y alcanza un máximo cercano al atardecer. En *G. omarorum* los cambios en la temperatura del agua provocan cambios directamente proporcionales en la FB-DOE debido a la dependencia térmica que caracteriza a los procesos fisiológicos en ectotermos (Ardanaz et al., 2001). Sin embargo el aumento nocturno es evidente aún luego de corregir los valores de frecuencia tomando en cuenta este factor lineal y es importante destacar que el aumento nocturno de la FB-DOE ocurre cuando la temperatura comienza su fase de descenso, es decir que tiene una correlación invertida en relación a lo esperado por los efectos directos de la temperatura sobre la FB-DOE. Esta evidencia nos permite postular a la temperatura como el candidato a sincronizar el ritmo circadiano en la naturaleza. Hay al menos dos vías por las que la temperatura ejerce su efecto modulador sobre la FB-DOE: 1) la vía no específica con un efecto positivo lineal (Ardanaz et al., 2001); y 2) un efecto de zeitgeber mediante el cual la ligera variación diaria en la temperatura del agua puede servir como clave ambiental. La temperatura ha sido ampliamente reconocida como un potente sincronizador de los ritmos, particularmente en animales ectotérmicos (Pittendrigh, 1960). La sensibilidad de los Gymnotiformes a la temperatura del agua ya ha sido demostrada en la especie simpátrida *B. gauderio*, donde los cambios estacionales de temperatura desencadenan el comienzo de la estación reproductiva (Quintana et al., 2004; Silva et al., 2003). En dichos trabajos la manipulación de la temperatura del agua indujo maduración gonadal, dimorfismo sexual y conducta reproductiva sincronizando el ciclo reproductivo. Se ha reportado que los ciclos de temperatura no solo sincronizan el reloj de *Drosophila* en condiciones de iluminación constante (Busza et al., 2007), sino que también actúan como el sincronizador circadiano principal cuando hay desfases entre los ciclos de temperatura y luz ambiental (Harper et al., 2016). Esta sensibilidad a los ciclos de temperatura parece poco habitual

en la naturaleza. Los resultados presentados que sugieren un rol sincronizador son el primer reporte en una especie anamniota de un ritmo circadiano probablemente sincronizado por la temperatura ambiente.

El contexto social es un potente modulador de la frecuencia de la DOE provocando modulaciones de su frecuencia basal (Perrone, 2012) así como generando modulaciones transitorias denominadas "señales eléctricas sociales" (Hagedorn and Heiligenberg, 1985). Es interesante señalar que los escasos avances en la determinación de la naturaleza endógena del ritmo diario de la FB-DOE han tenido al contexto social como variable permanente difícil de aislar. Los trabajos de Zupanc y colaboradores (Zupanc, 2002) logran demostrar la existencia de un ritmo circadiano en la emisión de las señales eléctricas sociales, naturalmente en animales en contexto social. De forma similar Stoddard y colaboradores (Stoddard et al., 2007) reportan un ritmo circadiano de aumento nocturno de la FB-DOE solo en contexto social, manifestando una "pérdida del ritmo" en animales aislados. Esto sugiere fuertemente que la activación de cada individuo de la población, que ocurre en la noche, con su aumento en actividad locomotora y en conducta eléctrica suma a una activación global generalizada. De esta manera se determina un ritmo poblacional distribuido entre los integrantes de la población que actúa como reforzador de los ritmos individuales e incluso puede actuar como señal sincronizadora. En este sentido se han reportado ritmos poblacionales en animales silvestres que se independizan de las variables ambientales en situaciones particulares (Bovet and Oertli, 1974).

El contexto social parece tener un importante efecto en la sincronización de la población. Los individuos registrados en aislamiento presentaron acrofases más dispersas, aunque tanto la población de individuos aislados como la de los individuos registrados en contexto social presentaron la misma acrofase promedio. Esta constancia sugiere la existencia de un ritmo circadiano robusto en el control de la FB-DOE. Contrariamente a nuestra especulación, los individuos en los tanques (con información sobre la luz ambiental) no se encuentran más sincronizados que los que habitan en oscuridad constante. Es importante considerar el efecto del contexto social en la sincronización de un ritmo circadiano. Los peces registrados en la laguna están restringidos por una bolsa de malla, eléctricamente "transparente", que permite la interacción con otros individuos de la población, mientras que los registrados en aislamiento no

perciben señales de comunicación. La sincronización social de los ritmos circadianos es un área de gran interés y debate para la cual los peces eléctricos ofrecen un modelo interesante.

El bloqueo del sistema melatoninérgico que en el laboratorio inhibió el aumento nocturno (Capítulo 7), no produjo ningún efecto en los animales registrados en el hábitat natural. Este resultado sorprendente sugiere que los individuos sometidos a la multiplicidad de variables cíclicas del entorno tienen un ritmo más robusto capaz de persistir aún en ausencia de la señal melatoninérgica. En este punto también es importante considerar el efecto sincronizador del contexto social el cual podría suplir el efecto del ritmo circadiano del pico de melatonina, que está abolido por el tratamiento con luzindole. Experimentos futuros con inyecciones de MC en el campo, podrían aportar información clave para dilucidar esta hipótesis. La comparación de los índices de aumento nocturno en laboratorio y en el campo apunta en el mismo sentido ya que los individuos registrados en la naturaleza, tanto en contexto social y oscuridad constante como aislamiento y sometidos al ciclo luz-oscuridad, presentan aumentos nocturnos que duplican los registrados en el laboratorio.

9. Discusión General

Esta tesis se enfoca en el análisis del aumento nocturno de la FB-DOE de *G. omarorum* y demuestra:

1. Que el aumento nocturno de la FB-DOE es parte de un ritmo circadiano endógeno, que persiste en condiciones de libre curso y que es independiente de la actividad locomotora.
2. Que este aumento nocturno se expresa en el hábitat natural aún en condiciones de oscuridad constante.
3. Que en el hábitat natural el aumento tiene un inicio de corta latencia respecto al momento del atardecer que coincide con lo observado en animales aislados y a temperatura constante en el laboratorio.
4. Que este componente temprano del aumento nocturno observado en el laboratorio es de corta duración, con un máximo a los 10 minutos posteriores al apagado de la luz y decae hacia el final de la primera hora de la noche.
5. Que el aumento nocturno de la primera hora depende de la melatonina y no del AVT.
6. Que la melatonina y el AVT emulan este aumento nocturno temprano y que la inhibición de la vía AVTérgica impide la acción de la melatonina durante el día.
7. Que el contexto social actúa como un sincronizador del aumento nocturno entre los individuos de una misma población.
8. Que el bloqueo de los receptores de melatonina en el hábitat natural no es suficiente para impedir el aumento nocturno de la FB-DOE.

Los resultados muestran que en *G. omarorum* el aumento nocturno de la conducta eléctrica es un ritmo circadiano, en fase con el ritmo diario de actividad y coincidiendo con el incremento en la alerta general que se asocia este período. El aumento nocturno persiste en aislamiento social y en condiciones de temperatura constante sincronizado con el ciclo luz/oscuridad (Capítulo 6). Es importante destacar que el modelo estadístico aplicado a los registros LD/DD en individuos aislados en el laboratorio identifica ritmos circadianos con acrofases

dispersas. Una mirada detallada a los registros crudos (Capítulo 6) evidencia ritmos complejos y una gran variabilidad inter e intraindividual que pone en duda la aplicabilidad de este método estándar. Aun así el aumento endógeno de la FB-DOE en la primer noche subjetiva en DD (figura 6.3) es probablemente el indicador más fiable de un ritmo circadiano endógeno de la conducta eléctrica. La variable ambiental temporizadora por excelencia, el ciclo día/noche se ha considerado poco importante en el espacio perceptual de los peces eléctricos sudamericanos, debido en buena medida a un sistema visual escasamente desarrollado, a sus hábitos nocturnos, a su hábitat con poca visibilidad y a su insensibilidad a la luz infrarroja (Ciali et al., 1997; Fontanarrosa et al., 2010; Liu et al., 2016). En este sentido es interesante notar que en el hábitat natural, el ritmo diario de conducta eléctrica tiene una expresión robusta, en individuos registrados en oscuridad constante, expuestos al ciclo diario de temperatura y a la actividad de sus coespecíficos (Capítulo 8). Llama la atención que los individuos aislados registrados en LD tanto en el laboratorio (Capítulo 6) como en el hábitat natural (Capítulo 8) presentan una mayor dispersión en sus acrofases que los individuos registrados en DD en contexto social natural (Capítulo 8). Estos resultados agregan evidencia a la menor relevancia de la clave lumínica respecto a la social.

El aumento nocturno que se expresa en la naturaleza emerge frente a la influencia de al menos dos estímulos cíclicos, las variaciones en la temperatura del agua y la actividad social de la población. Es interesante considerar que contrariamente a lo observado en condiciones de laboratorio, el aumento nocturno en el hábitat natural no se bloquea por la inhibición del sistema melatoninérgico, y la confluencia de múltiples variables cíclicas podría estar en la base de esta resistencia.

La relación entre los ritmos circadianos y el contexto social motivó el intento de comparar el aumento nocturno de la conducta eléctrica en dos especies de peces eléctricos nocturnos con diferente socialidad. El aumento nocturno de la conducta eléctrica en *B. gauderio* (Anexo 1) no difiere del expresado por *G. omarorum* (Capítulos 6, 7 y 8) en ninguna de las variables testeadas: es independiente de la actividad locomotora, depende del sistema melatoninérgico y no del AVTérgico en individuos aislados en el laboratorio y se expresa en la naturaleza, en condiciones de oscuridad constante. Las características del

aumento nocturno de la FB-DOE de *G. omarorum*, su neuromodulación y su vínculo con las variables cíclicas del entorno parecen ser idénticos a los de *B. gauderio*. Las similitudes encontradas entre estas dos especies refuerza la conservación de los mecanismos básicos temporizadores del reloj circadiano independientemente de la organización social. Por otra parte, alientan a explorar un rol diferencial de la modulación AVTérgica en escenarios naturales donde el contexto social diferente entre estas dos especies se exprese en toda su magnitud.

Los resultados presentados en los capítulos 7 y 8 permiten ahondar en el conocimiento parcial que tenemos sobre los circuitos neurales que modulan el comando de la DOE y aportar una visión globalizadora de la interacción de los sistemas melatoninérgico y AVTérgico en la modulación de un ritmo circadiano. En la figura 2.6 presentamos un resumen del conocimiento actual en teleósteos sobre los circuitos de los sistemas melatoninérgico y AVTérgico, en la modulación de un ritmo circadiano representativo (la conducta eléctrica). Esta tesis aporta evidencia empírica que permite complementar este esquema y confirmar algunas especulaciones no demostradas hasta ahora (Figura 9.1).

Podemos ahora incluir en este esquema los roles de la melatonina y el AVT como neuromoduladores que incrementan la FB-DOE. Así mismo se confirma el efecto de AVT sobre el NEB incrementando su frecuencia de descarga (Capítulo 7). Como se mencionó en los antecedentes, este esquema podría presentar diferencias día/noche en la abundancia de los receptores que indirectamente se presentan en el capítulo 7. En esta tesis mostramos que el aumento nocturno de la FB-DOE no es mediado por AVT; sin embargo, durante el día, el bloqueante AVTérgico MC impidió sistemáticamente el aumento producido por melatonina, sugiriendo la existencia de la una activación secuencial melatonina-AVT que tiene a la vía pineal-POA-NEB como posible sustrato anatómico (Kulczykowska, 1995). Si la cantidad de receptores fuera mayor en POA que en NEB durante el día, la melatonina actuaría sobre el POA produciendo la liberación de AVT, entonces el aumento en la FB-DOE ocurriría por vía AVTérgica y es bloqueado por MC. Durante la noche, con un aumento en la cantidad de receptores y una liberación fisiológica, la melatonina actuaría produciendo el aumento nocturno directamente a nivel del NEB, como lo sugiere la abolición del aumento nocturno en individuos aislados tratados con luzindole (Capítulo 7).

La melatonina puede interactuar en forma sinérgica con otros neuromoduladores para así estimular la expresión completa del cambio conductual nocturno (Feng and Bass, 2014). En particular la melatonina modula el sistema AVTérgico generando interacciones entre cambios diarios y estacionales en la conducta social (Cassone and Westneat, 2011; Howard and Lutterschmidt, 2015; Kronfeld-Schor et al., 2013; Lutterschmidt and Wilczynski, 2012). Los cambios en el ciclo día/noche, que impactan en la producción melatoninérgica influyen sobre el sistema AVTérgico (Ben-Zaken et al., 2013; Rodríguez-Illamola et al., 2011). En mamíferos está influencia ocurre en conjunto con la expresión de un ritmo circadiano endógeno de producción de vasopresina (Jansen et al., 2000).

Relación de los sistemas melatonérgico y AVTérgico en el control de los cambios diarios de la FB-DOE

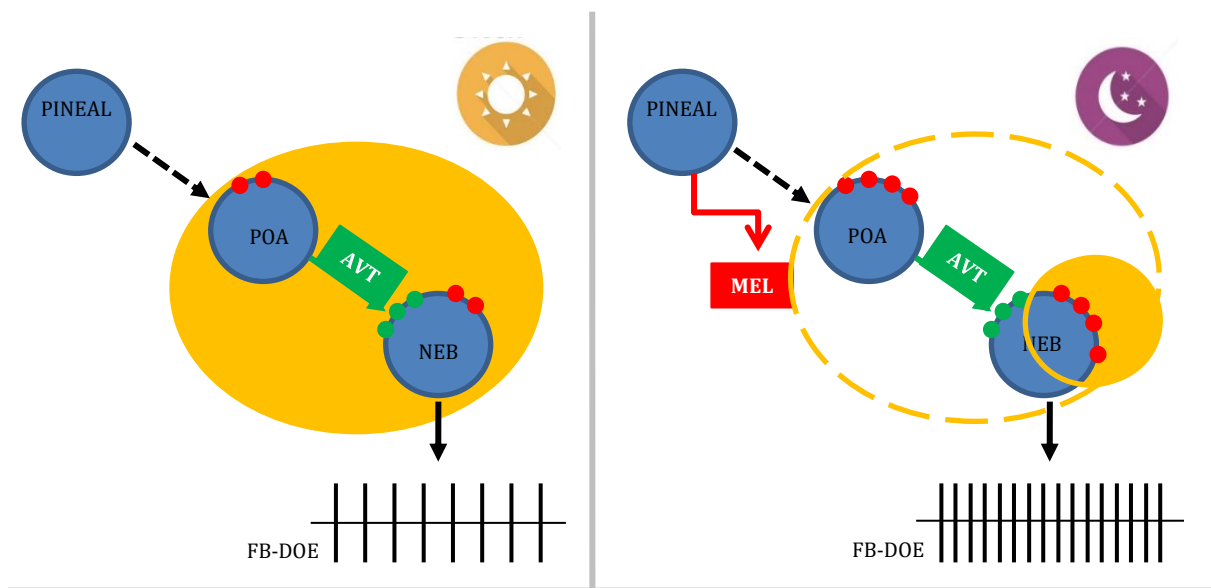


Figura 9.1. El patrón general del sistema melatonérgico en teleósteos indica que: 1) la melatonina se sintetiza en la glándula pineal durante la noche, 2) el AVT se sintetiza en el POA, 3) existen proyecciones de la glándula pineal al POA, 4) hay receptores melatonérgicos (puntos rojos) en el POA, 5) hay cambios diarios en la densidad de receptores melatonérgicos en el cerebro (comparar día-noche) (Falcón et al, 2010; SukShin, 2011; Silva y Pandolfi 2018).

Después del desarrollo de esta tesis, pudimos demostrar que:

1) durante el día (naranja sólido):

- La administración de melatonina aumenta la FB-DOE (capítulo 7)
- La administración de AVT aumenta la FB-DOE actuando directamente sobre el NEB (capítulo 7)
- La acción de la melatonina se produce a través de la inervación AVTérgica (capítulo 7)

2) durante la noche:

- el aumento nocturno de la FB-DOE en individuos aislados en el laboratorio es dependiente de melatonina y no de AVT (naranja sólido)
- el aumento nocturno de la FB-DOE en individuos en la naturaleza no depende exclusivamente de melatonina y es modulado por el contexto social lo que sugiere la participación de una modulación AVTérgica (naranja punteado)

Gymnotus omarorum emerge como un nuevo e interesante modelo para estudiar los ritmos circadianos y su vínculo con los ambientes naturales, permitiendo el análisis de su integración y modulación en el mundo real. De esta manera, se suma a los aportes del único otro modelo de teleósteos *Porichthys notatus*, (Feng and Bass, 2014; Feng and Bass, 2016; Feng et al., 2015) en el que se ha explorado el control neuroendócrino del ritmo circadiano de un sistema de comunicación modulado por el entorno social. Esta tesis aporta la visión más integradora de la confluencia entre los sistemas melatonérgico y AVTérgico en el control de un ritmo circadiano comportamental en teleósteos. Aporta evidencia de mecanismos neurohormonales que varían a lo largo del día. Sobre estos resultados, se impone buscar respuestas sobre la riqueza y complejidad de las interacciones de estos dos sistemas de neuromodulación, altamente conservados, e intentar comprender la profundidad de los mecanismos que entrelazan los ritmos biológicos y la conducta de los vertebrados.

10. Contribuciones y perspectivas

La realización de esta tesis derivó en las siguientes contribuciones:

1. Equipamiento

La financiación obtenida para la realización de esta tesis permitió apoyar el fortalecimiento institucional en las dos instituciones implicadas en la misma:

- En el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable se actualizó y complementó el laboratorio de electrofisiología de la Unidad Bases Neurales de la Conducta.
- En Facultad de Ciencias aporté a la instalación de una estación conductual de uso compartido entre Sección Etología y Laboratorio de Neurociencias. En la misma se realizarán registros de conducta eléctrica y actividad locomotora en condiciones ambientales controladas.

2. Formación de recursos humanos

Experimentos realizados en el transcurso de esta tesis dieron lugar a la tesis de grado de M^a Victoria Moreno:

"Diagnóstico y análisis del ritmo circadiano de la conducta eléctrica en el pez eléctrico autóctono, *Gymnotus omarorum*" (2016). Orientadora: Ana Silva; coorientadora: Adriana Migliaro. Tesis de grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Udelar.

3. Aportes al conocimiento

Publicaciones en revistas arbitradas (ver anexos):

-(2014). Perrone, R., **Migliaro, A.**, Comas, V., Quintana, L., Borde, M. and Silva, A. Local vasotocin modulation of the pacemaker nucleus resembles distinct electric behaviors in two species of weakly electric fish. *J Physiol Paris* 108, 203-12.

-(2016). **Migliaro, A.** and Silva, A. Melatonin Regulates Daily Variations in Electric Behavior Arousal in Two Species of Weakly Electric Fish with Different Social Structures. *Brain Behav Evol* 87, 232-41.

- (2018). **Migliaro, A.**, Moreno, V., Marchal, P., Silva, A. Daily changes in the electric behavior of weakly electric fish in nature persist in constant darkness and are socially synchronized. *Biology Open* doi: 10.1242/bio.036319

Artículo por invitación:

Tassino, B.; **Migliaro, A.**; Estevan, I.; Silva, A. El reloj biológico frente a los desafíos de la modernidad. Revista de Innovación en Enseñanza de las Ciencias (Pontificia Universidad Católica de Valparaíso) <http://www.reinnec.cl>

Los resultados de esta tesis fueron presentados en 5 congresos internacionales y 6 congresos regionales tanto en modalidad de poster como en presentaciones orales.

4. Pasantías

En el transcurso de mi trabajo realicé dos pasantías de investigación:

Enero de 2015. Laboratorio de Neurofisiología Celular y Sináptica, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Udelar. Pasantía para el entrenamiento en la realización de experimentos in vitro. Mi entrenamiento estuvo a cargo de la MSc Virginia Comas dirigido por el Dr. Michel Borde.

Agosto de 2015. Laboratorio de Cronobiología, Universidad de Quilmes, Argentina. Estadía de 10 días para entrenamiento en procesamiento de datos para cronobiología. Mi entrenamiento estuvo a cargo de Carlos Caldart con la dirección del Dr. Diego Golombek

5. Colaboraciones

En el transcurso de esta tesis se desarrollaron nuevos vínculos de colaboración, los cuales se enmarcan en el grupo CSIC (Udelar) 883158, de reciente creación, que incluye a los investigadores Dra. Ana Silva, Dra. Bettina Tassino, Dr. Carlos Passos y Dra. Laura Quintana. Nuestro grupo se centra en el análisis de la emergencia de los ritmos biológicos en ambientes naturales desafiantes, cuenta con dos proyectos financiado en ejecución y una intensa actividad de formación de recursos humanos. En ese marco destaco las siguientes colaboraciones:

a) Dr. Carlos Passos (Sección Etología, Facultad de Ciencias, Udelar). Co dirección de la tesis de grado de Andrés Olivera, de próxima finalización, en la cual se realiza una primera aproximación al estudio de los ritmos en la especie teleostea autóctona *Austrolebia reicherti*.

b) Dra. Laura Quintana (Unidad Bases Neurales de la Conducta, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Ministerio de Educación y Cultura). La Dra. Quintana se ha centrado en el estudio de las bases neurohormonales de la conducta en peces eléctricos y en particular ha centrado su interés en los ritmos estacionales de la misma. De nuestra colaboración ha surgido la

redacción de un proyecto que apunta a dilucidar el vínculo entre los relojes circadiano y el estacional en la expresión de la conducta agonista y la alternancia anual entre la fase reproductiva y no reproductiva en *Gymnotus omarorum*.

6. Perspectivas

Los resultados presentados en esta tesis permiten plantear varias actividades a futuro. Algunas de ellas cuentan con financiamiento y permitirán complementar y publicar algunos de los resultados no publicados:

-Análisis del ritmo circadiano en la estación conductual en condiciones de LD y DD en temperatura constante (presentados en capítulo 6). Se completarán con registros realizados en presencia de ciclos controlados de temperatura ambiente en la nueva estación conductual de Facultad de Ciencias. Esta estación cuenta con facilidades que aseguran la sobrevivencia de los animales por períodos prolongados de tiempo. Los registros por tiempos prolongados nos permitirán avanzar en el desarrollo de análisis cuantitativos adecuados a la naturaleza de los datos de conducta eléctrica.

-Experimentos de inyección intraperitoneal de melatonina durante el día (presentados en capítulo 7). Se completarán con los registros electrofisiológicos del efecto de la melatonina sobre el NEB.

-Efecto de la inyección intraperitoneal de luzindole sobre el ritmo circadiano de la conducta eléctrica en el campo. Se completará con experimentos similares con MC en ambas especies.

-Redacción de una revisión sobre la interacción entre los sistemas circadiano y social en teleósteos.

Otras actividades requerirán financiamiento particular:

-Análisis transcriptómico de las diferencias día/noche en receptores de melatonina y AVT.

-Análisis de las bases neurales y hormonales de los ritmos circadianos y estacionales.

7. Financiación recibida para esta tesis

Parte de esta tesis se financió con fondos obtenidos mediante la presentación a convocatorias a proyectos de investigación.

- Proyecto Fondo Clemente Estable modalidad-ANII, FCE_3_2016_1_126178. "Influencia de señales ambientales en la ritmicidad circadiana en peces eléctricos autóctonos". Período 2016-2018. Responsable de proyecto.
- Proyecto I+D. Comisión Sectorial de Investigación Científica, Udelar. "El funcionamiento del reloj biológico en condiciones ambientales extremas". Período 2016-2018. Integrante del equipo de investigación.

Bibliografía

- Aguilera, P. A., Castello, M. E. and Caputi, A. A.** (2001). Electroreception in *Gymnotus carapo*: differences between self-generated and conspecific-generated signal carriers. *J Exp Biol* **204**, 185-98.
- Albrecht, U. and Eichele, G.** (2003). The mammalian circadian clock. *Current Opinion in Genetics & Development* **13**, 271-277.
- Andrews, R. V. and Edgar Folk, G.** (1964). Circadian metabolic patterns in cultured hamster adrenal glands. *Comparative Biochemistry and Physiology* **11**, 393-409.
- Appelbaum, L., Vallone, D., Anzulovich, A., Ziv, L., Tom, M., Foulkes, N. S. and Gothilf, Y.** (2006). Zebrafish arylalkylamine-N-acetyltransferase genes – targets for regulation of the circadian clock. *Journal of Molecular Endocrinology* **36**, 337-347.
- Ardanaz, J. L., Silva, A. and Macadar, O.** (2001). Temperature sensitivity of the electric organ discharge waveform in *Gymnotus carapo*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* **187**, 853-64.
- Badiu, C., Coculescu, M. and Moller, M.** (1999). Arginine vasotocin mRNA revealed by in situ hybridization in bovine pineal gland cells. *Cell and tissue research* **295**, 225-229.
- Batista, G., Zubizarreta, L., Perrone, R. and Silva, A.** (2012). Non-sex-biased Dominance in a Sexually Monomorphic Electric Fish: Fight Structure and Submissive Electric Signalling. *Ethology* **118**, 398-410.
- Ben-Zaken, I., Haim, A. and Zubidat, A. E.** (2013). Long-day photoperiod interacts with vasopressin and food restriction to modulate reproductive status, and vasopressin receptor expression of male Golden spiny mice. *J Exp Biol*.
- Bennett, M. V., Pappas, G. D., Aljure, E. and Nakajima, Y.** (1967). Physiology and ultrastructure of electrotonic junctions. II. Spinal and medullary electromotor nuclei in mormyrid fish. *Journal of neurophysiology* **30**, 180-208.
- Black-Cleworth, P.** (1970). The role of electrical discharges in the non-reproductive social behaviour of *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Pisces). *Animal Behaviour Monographs* **3**, 11N1-77.
- Bovet, J. and Oertli, E. F. J.** (1974). Free-running circadian activity rhythms in free-living beaver (*Castor canadensis*). *Journal of Comparative Physiology A* **92**, 10.
- Bullock, T., Hopkins, C., Popper, A., Fay, R., Caputi, A., Carlson, B. and Macadar, O.** (2005). Electric Organs and Their Control. In *Electroreception*, vol. 21, pp. 410-451: Springer New York.
- Busza, A., Murad, A. and Emery, P.** (2007). Interactions between Circadian Neurons Control Temperature Synchronization of *Drosophila* Behavior. *The Journal of Neuroscience* **27**, 10722-10733.
- Cahill, G. M., Hurd, M. W. and Batchelor, M. M.** (1998). Circadian rhythmicity in the locomotor activity of larval zebrafish. *NeuroReport* **9**, 3445-3449.
- Capurro, A.** (1994). Respuesta de novedad en *Gymnotus carapo* : La frecuencia de un oscilador biológico como manifestación conductual. In *PEDECIBA*. Montevideo.

- Caputi, A. and Trujillo-Cenóz, O.** (1994). The Spiral Cord of *Gymnotus carapo*: The Electromotoneurons and Their Projection Patterns. *Brain Behav Evol* **44**, 166-174.
- Caputi, A. A.** (1999). The electric organ discharge of pulse gymnotiforms: the transformation of a simple impulse into a complex spatio-temporal electromotor pattern. *Journal of Experimental Biology* **202**, 1229-1241.
- Caputi, A. A., Aguilera, P. A. and Castello, M. E.** (2003). Probability and amplitude of novelty responses as a function of the change in contrast of the reafferent image in *G. carapo*. *J Exp Biol* **206**, 999-1010.
- Cassone, V. M. and Westneat, D. F.** (2011). The bird of time: cognition and the avian biological clock. *Front Mol Neurosci* **5**, 32.
- Castillo-Ruiz, A., Paul, M. J. and Schwartz, W. J.** (2012). Chapter 16 - In search of a temporal niche: Social interactions. In *Progress in Brain Research*, vol. 199 eds. A. Kalsbeek M. Merrow T. Roenneberg and R. G. Foster), pp. 267-280: Elsevier.
- Ciali, S., Gordon, J. and Moller, P.** (1997). Spectral sensitivity of the weakly discharging electric fish *Gnathonemus petersi* using its electric organ discharges as the response measure. *Journal of Fish Biology* **50**, 1074-1087.
- Comas, V. and Borde, M.** (2010). Neural substrate of an increase in sensory sampling triggered by a motor command in a gymnotid fish. *Journal of neurophysiology* **104**, 2147-2157.
- Chowdhury, V. S., Yamamoto, K., Ubuka, T., Bentley, G. E., Hattori, A. and Tsutsui, K.** (2010). Melatonin Stimulates the Release of Gonadotropin-Inhibitory Hormone by the Avian Hypothalamus. *Endocrinology* **151**, 271-280.
- Davidson, A. J. and Menaker, M.** (2003). Birds of a feather clock together – sometimes: social synchronization of circadian rhythms. *Current Opinion in Neurobiology* **13**, 765-769.
- De Vries, G. J. and Panzica, G. C.** (2006). Sexual differentiation of central vasopressin and vasotocin systems in vertebrates: Different mechanisms, similar endpoints. *Neuroscience* **138**, 947-955.
- Deng, T. S. and Tseng, T. C.** (2000). Evidence of circadian rhythm of electric discharge in *Eigenmannia virescens* system. *Chronobiol Int* **17**, 43-8.
- Dewan, A. K., Maruska, K. P. and Tricas, T. C.** (2008). Arginine Vasotocin Neuronal Phenotypes among Congeneric Territorial and Shoaling Reef Butterflyfishes: Species, Sex and Reproductive Season Comparisons. *Journal of Neuroendocrinology* **20**, 1382-1394.
- Diez-Noguera, A.** (1999). El Temps, version 1. *Software available on the Web*: [http://www.farmacía.far.ub.es/pub/crono/El temps. zip](http://www.farmacía.far.ub.es/pub/crono/El%20temps.zip).
- Dunlap, K. D., Smith, G. T. and Yekta, A.** (2000). Temperature dependence of electrocommunication signals and their underlying neural rhythms in the weakly electric fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *Brain Behav Evol* **55**, 152-62.
- Dye, J. and Meyer, J.** (1986). Central control of the electric organ discharge in weakly electric fish. *Electroreception*. Wiley, New York, 71-102.
- Falcón, J., Gothilf, Y., Coon, S. L., Boeuf, G. and Klein, D. C.** (2003). Genetic, Temporal and Developmental Differences Between Melatonin Rhythm Generating Systems in the Teleost Fish Pineal Organ and Retina. *Journal of Neuroendocrinology* **15**, 378-382.

- Falcon, J., Migaud, H., Munoz-Cueto, J. A. and Carrillo, M.** (2010). Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* **165**, 469-82.
- Falconi, A., Borde, M., Hernández-Cruz, A. and Morales, F. R.** (1995). Mauthner cell-initiated abrupt increase of the electric organ discharge in the weakly electric fish *Gymnotus carapo*. *Journal of Comparative Physiology A* **176**, 679-689.
- Feng, N. Y. and Bass, A. H.** (2014). Melatonin action in a midbrain vocal-acoustic network. *J Exp Biol* **217**, 1046.
- Feng, Ni Y. and Bass, Andrew H.** (2016). "Singing" Fish Rely on Circadian Rhythm and Melatonin for the Timing of Nocturnal Courtship Vocalization. *Current Biology* **26**, 2681-2689.
- Feng, N. Y., Fergus, D. J. and Bass, A. H.** (2015). Neural transcriptome reveals molecular mechanisms for temporal control of vocalization across multiple timescales. *BMC genomics* **16**, 408.
- Fontanarrosa, M., Chaparro, G., de Tezanos Pinto, P., Rodriguez, P. and O'Farrell, I.** (2010). Zooplankton response to shading effects of free-floating plants in shallow warm temperate lakes: A field mesocosm experiment.
- Franchina, C. R., Salazar, V. L., Volmar, C. H. and Stoddard, P. K.** (2001). Plasticity of the electric organ discharge waveform of male *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. II. Social effects. *J Comp Physiol A* **187**, 45-52.
- Franchina, C. R. and Stoddard, P. K.** (1998). Plasticity of the electric organ discharge waveform of the electric fish *Brachyhypopomus pinnicaudatus* I. Quantification of day-night changes. *Journal of Comparative Physiology A* **183**, 759-768.
- Giassi, A. C. C., Duarte, T. T., Ellis, W. and Maler, L.** (2012). Organization of the gymnotiform fish pallium in relation to learning and memory: II. Extrinsic connections. *Journal of Comparative Neurology* **520**, 3338-3368.
- Giora, J. and Malabarba, L.** (2009). *Brachyhypopomus gauderio*, new species, a new example of underestimated species diversity of electric fishes in the southern South America (Gymnotiformes: Hypopomidae). *Zootaxa* **2093**, 8.
- Godwin, J. and Thompson, R.** (2012). Nonapeptides and Social Behavior in Fishes. *Hormones and Behavior* **61**, 230-238.
- Goldina, A., Gavassa, S. and Stoddard, P. K.** (2011). Testosterone and 11-ketotestosterone have different regulatory effects on electric communication signals of male *Brachyhypopomus gauderio*. *Hormones and Behavior* **60**, 139-147.
- Golombek, D. A. and Rosenstein, R. E.** (2010). Physiology of Circadian Entrainment. *Physiological Reviews* **90**, 1063-1102.
- Goodson, J. L.** (1998). Territorial Aggression and Dawn Song are Modulated by Septal Vasotocin and Vasoactive Intestinal Polypeptide in Male Field Sparrows (*Spizella pusilla*). *Hormones and Behavior* **34**, 67-77.
- Goodson, J. L.** (2005). The vertebrate social behavior network: Evolutionary themes and variations. *Hormones and Behavior* **48**, 11-22.
- Goodson, J. L.** (2008). Nonapeptides and the Evolutionary Patterning of Sociality. *Progress in brain research* **170**, 3-15.
- Goodson, J. L. and Bass, A. H.** (2000). Forebrain peptides modulate sexually polymorphic vocal circuitry. *Nature* **403**, 769.

- Goodson, J. L. and Bass, A. H.** (2001). Social behavior functions and related anatomical characteristics of vasotocin/vasopressin systems in vertebrates. *Brain Research Reviews* **35**, 246-265.
- Goodson, J. L. and Kabelik, D.** (2009). Dynamic limbic networks and social diversity in vertebrates: From neural context to neuromodulatory patterning. *Frontiers in Neuroendocrinology* **30**, 429-441.
- Gothilf, Y., Coon, S. L., Toyama, R., Chitnis, A., Namboodiri, M. A. A. and Klein, D. C.** (1999). Zebrafish Serotonin N-Acetyltransferase-2: Marker for Development of Pineal Photoreceptors and Circadian Clock Function1. *Endocrinology* **140**, 4895-4903.
- Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., Odenthal, J., van Eeden, F. J., Jiang, Y. J., Heisenberg, C. P. et al.** (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* **123**, 1.
- Hagedorn, M. and Heiligenberg, W.** (1985). Court and spark: electric signals in the courtship and mating of gymnotoid fish. *Animal Behaviour* **33**, 254-265.
- Harper, Ross E. F., Dayan, P., Albert, Joerg T. and Stanewsky, R.** (2016). Sensory Conflict Disrupts Activity of the Drosophila Circadian Network. *Cell Reports* **17**, 1711-1718.
- Hattar, S., Liao, H. W., Takao, M., Berson, D. M. and Yau, K. W.** (2002). Melanopsin-Containing Retinal Ganglion Cells: Architecture, Projections, and Intrinsic Photosensitivity. *Science* **295**, 1065.
- Heiligenberg, W., Finger, T., Matsubara, J. and Carr, C.** (1981). Input to the medullary pacemaker nucleus in the weakly electric fish, *Eigenmannia* (sternopygidae, gymnotiformes). *Brain Res* **211**, 418-423.
- Holzberg, D. and Albrecht, U.** (2003). The Circadian Clock: A Manager of Biochemical Processes Within the Organism. *Journal of Neuroendocrinology* **15**, 339-343.
- Howard, C. and Lutterschmidt, D.** (2015). The effects of melatonin on brain arginine vasotocin: relationship with sex and seasonal differences in melatonin receptor type 1 in green treefrogs (*Hyla cinerea*). *Journal of Neuroendocrinology* **27**, 670-679.
- Hurd, M. W., Debruyne, J., Straume, M. and Cahill, G. M.** (1998). Circadian Rhythms of Locomotor Activity in Zebrafish. *Physiology & Behavior* **65**, 465-472.
- Ibuka, N., Inouye, S.-i. T. and Kawamura, H.** (1977). Analysis of sleep-wakefulness rhythms in male rats after suprachiasmatic nucleus lesions and ocular enucleation. *Brain Res* **122**, 33-47.
- Idda, M. L., Bertolucci, C., Vallone, D., Gothilf, Y., Sánchez-Vázquez, F. J. and Foulkes, N. S.** (2012). Chapter 3 - Circadian clocks: Lessons from fish. In *Progress in Brain Research*, vol. 199 eds. A. Kalsbeek M. Meroz T. Roenneberg and R. G. Foster), pp. 41-57: Elsevier.
- Iigo, M., Furukawa, K., Nishi, G., Tabata, M. and Aida, K.** (2007). Ocular Melatonin Rhythms in Teleost Fish. *Brain Behav Evol* **69**, 114-121.
- Inouye, S. T. and Kawamura, H.** (1979). Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **76**, 5962.

Insel, T. R. and Young, L. J. (2000). Neuropeptides and the evolution of social behavior. *Current Opinion in Neurobiology* **10**, 784-789.

Jansen, K., Van der Zee, E. A. and Gerkema, M. P. (2000). Being circadian or not: vasopressin release in cultured SCN mirrors behavior in adult voles. *NeuroReport* **11**, 3555-3558.

Jun, J. J., Longtin, A. and Maler, L. (2014). Enhanced sensory sampling precedes self-initiated locomotion in an electric fish. *J Exp Biol* **217**, 3615-28.

Kawasaki, M. and Heiligenberg, W. (1989). Distinct mechanisms of modulation in a neuronal oscillator generate different social signals in the electric fish *Hypopomus*. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* **165**, 731-741.

Kawasaki, M., Maler, L., Rose, G. J. and Heiligenberg, W. (1988). Anatomical and functional organization of the prepacemaker nucleus in gymnotiform electric fish: The accommodation of two behaviors in one nucleus. *Journal of Comparative Neurology* **276**, 113-131.

Keller, C. H., Kawasaki M Fau - Heiligenberg, W. and Heiligenberg, W. (1991). The control of pacemaker modulations for social communication in the weakly electric fish *Sternopygus*.

Keller, C. H., Maler, L. and Heiligenberg, W. (1990). Structural and functional organization of a diencephalic sensory-motor interface in the gymnotiform fish, *Eigenmannia*. *Journal of Comparative Neurology* **293**, 347-376.

Ko, C. H. and Takahashi, J. S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics* **15**, R271-R277.

Kronfeld-Schor, N., Dominoni, D., de la Iglesia, H., Levy, O., Herzog, E. D., Dayan, T. and Helfrich-Forster, C. (2013). Chronobiology by moonlight. *Proc Biol Sci* **280**, 20123088.

Kulczykowska, E. (1995). Arginine vasotocin-melatonin interactions in fish: a hypothesis. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **5**, 96-102.

Kulczykowska, E. (1999). Diel changes in plasma arginine vasotocin, isotocin, and melatonin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

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

Lissmann, H. W. and Schwassmann, H. O. (1965). Activity rhythm of an electric fish, *Gymnorhamphichthys hypostomus*, Ellis. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* **51**, 153-171.

Liu, D.-W., Lu, Y., Yan, H. Y. and Zakon, H. H. (2016). South American weakly electric fish (Gymnotiformes) are long-wavelength-sensitive cone monochromats. *Brain Behav Evol* **88**, 204-212.

Lutterschmidt, D. I. and Wilczynski, W. (2012). Sexually dimorphic effects of melatonin on brain arginine vasotocin immunoreactivity in green treefrogs (*Hyla cinerea*). *Brain Behav Evol* **80**, 222-32.

Maitra, S. K., Chatteraj, A., Mukherjee, S. and Moniruzzaman, M. (2012). Melatonin: a potent candidate in the regulation of fish oocyte growth and maturation. *Gen Comp Endocrinol* **181**, 215-22.

Marchal, P. and Silva, A. (2014). Behavioural characterization of territory establishment in a year round aggressive weakly electric fish. In

International Congress of Neuroethology. Sapporo, Japan: International Society for Neuroethology.

Maruska, K. P. (2009). Sex and temporal variations of the vasotocin neuronal system in the damselfish brain. *General and Comparative Endocrinology* **160**, 194-204.

Masai, I., Heisenberg, C.-P., Barth, K. A., Macdonald, R., Adamek, S. and Wilson, S. W. (1997). floating head and masterblind Regulate Neuronal Patterning in the Roof of the Forebrain. *Neuron* **18**, 43-57.

Menaker, M., Moreira, L. and Tosini, G. (1997). Evolution of circadian organization in vertebrates. *Brazilian journal of medical and biological research* **30**, 305-313.

Metzner, W. (1999). Neural circuitry for communication and jamming avoidance in gymnotiform electric fish. *Journal of Experimental Biology* **202**, 1365-1375.

Migaud, H., Davie, A. and Taylor, J. F. (2010). Current knowledge on the photoneuroendocrine regulation of reproduction in temperate fish species. *Journal of Fish Biology* **76**, 27-68.

Miranda, M., Silva, A. C. and Stoddard, P. K. (2008). Use of space as an indicator of social behavior and breeding systems in the gymnotiform electric fish *Brachyhyopomus pinnicaudatus*. *Environmental biology of fishes* **83**, 379-389.

Moore, F. L. and Lowry, C. A. (1998). Comparative neuroanatomy of vasotocin and vasopressin in amphibians and other vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **119**, 251-260.

Neumann, I. D. and van den Burg, E. H. (2013). Oxytocin and vasopressin release and their receptor-mediated intracellular pathways that determine their behavioral effects. *Oxytocin, Vasopressin and Related Peptides in the Regulation of Behavior*, 27.

Newman, S. W. (2006). The Medial Extended Amygdala in Male Reproductive Behavior A Node in the Mammalian Social Behavior Network. *Annals of the New York Academy of Sciences* **877**, 242-257.

Oldfield, R. G. and Hofmann, H. A. (2011). Neuropeptide regulation of social behavior in a monogamous cichlid fish. *Physiology & Behavior* **102**, 296-303.

Pavel, S., Goldstein, R. and CALB, M. (1975). Vasotocin content in the pineal gland of foetal, newborn and adult male rats. *Journal of Endocrinology* **66**, 283-284.

Pereira, A. C., Centurion, V. and Caputi, A. A. (2005). Contextual effects of small environments on the electric images of objects and their brain evoked responses in weakly electric fish. *J Exp Biol* **208**, 961-72.

Perrone, R. (2012). La vasotocina modula el comportamiento social de dos especies de peces eléctricos con diferente socialidad. In *PEDECIBA*, vol. PhD. Montevideo.

Perrone, R., Batista, G., Lorenzo, D., Macadar, O. and Silva, A. (2010). Vasotocin actions on electric behavior: interspecific, seasonal, and social context-dependent differences. *Front Behav Neurosci* **4**.

Perrone, R., Migliaro, A., Comas, V., Quintana, L., Borde, M. and Silva, A. (2014). Local vasotocin modulation of the pacemaker nucleus

resembles distinct electric behaviors in two species of weakly electric fish. *J Physiol Paris* **108**, 203-12.

Perrone, R. and Silva, A. C. (2018). Status-Dependent Vasotocin Modulation of Dominance and Subordination in the Weakly Electric Fish *Gymnotus omarorum*. *Front Behav Neurosci* **12**, 1.

Pinillos, M. L., De Pedro, N., Alonso-Gómez, A. L., Alonso-Bedate, M. and Delgado, M. J. (2001). Food intake inhibition by melatonin in goldfish (*Carassius auratus*). *Physiology & Behavior* **72**, 629-634.

Pittendrigh, C. S. (1960). Circadian Rhythms and the Circadian Organization of Living Systems. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **25**, 159-184.

Plautz, J. D., Straume, M., Stanewsky, R., Jamison, C. F., Brandes, C., Dowse, H. B., Hall, J. C. and Kay, S. A. (1997). Quantitative Analysis of *Drosophila* period Gene Transcription in Living Animals. *Journal of Biological Rhythms* **12**, 204-217.

Pouso, P., Quintana, L., Bolatto, C. and Silva, A. C. (2010). Brain androgen receptor expression correlates with seasonal changes in the behavior of a weakly electric fish, *Brachyhyppopomus gauderio*. *Hormones and Behavior* **58**, 729-736.

Pouso, P., Radmilovich, M. and Silva, A. (2017). An immunohistochemical study on the distribution of vasotocin neurons in the brain of two weakly electric fish, *Gymnotus omarorum* and *Brachyhyppopomus gauderio*. *Tissue and Cell* **49**, 257-269.

Quintana, L., Pouso, P., Fabbiani, G. and Macadar, O. (2011a). A central pacemaker that underlies the production of seasonal and sexually dimorphic social signals: anatomical and electrophysiological aspects.

Quintana, L., Sierra, F., Silva, A. and Macadar, O. (2011b). A central pacemaker that underlies the production of seasonal and sexually dimorphic social signals: functional aspects revealed by glutamate stimulation.

Quintana, L., Silva, A., Berois, N. and Macadar, O. (2004). Temperature induces gonadal maturation and affects electrophysiological sexual maturity indicators in *Brachyhyppopomus pinnicaudatus* from a temperate climate. *Journal of Experimental Biology* **207**, 1843-1853.

Quintana, L., Zubizarreta, L., Jalabert, C., Batista, G., Perrone, R. and Silva, A. (2016). Building the case for a novel teleost model of non-breeding aggression and its neuroendocrine control. *Journal of Physiology-Paris* **110**, 224-232.

Raggembass, M. (2008). Overview of cellular electrophysiological actions of vasopressin. *European journal of pharmacology* **583**, 243-254.

Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C. and Menaker, M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* **247**, 975.

Refinetti, R., Cornélissen, G. and Halberg, F. (2007). Procedures for numerical analysis of circadian rhythms. *Biological Rhythm Research* **38**, 275-325.

Richer-de-Forges, M. M., Crampton, W. G. R. and Albert, J. S. (2009). A New Species of *Gymnotus* (Gymnotiformes, Gymnotidae) from Uruguay: Description of a Model Species in Neurophysiological Research. *Copeia* **2009**, 538-544.

Rodríguez-Illamola, A., López Patiño, M. A., Soengas, J. L., Ceinos, R. M. and Míguez, J. M. (2011). Diurnal rhythms in hypothalamic/pituitary AVT synthesis and secretion in rainbow trout: Evidence for a circadian regulation. *General and Comparative Endocrinology* **170**, 541-549.

Salek, S. J., Sullivan, C. V. and Godwin, J. (2002). Arginine vasotocin effects on courtship behavior in male white perch (*Morone americana*). *Behavioural Brain Research* **133**, 177-183.

Sanguinetti-Scheck, J. I., Pedraja, E. F., Cilleruelo, E., Migliaro, A., Aguilera, P., Caputi, A. A. and Budelli, R. (2011). Fish geometry and electric organ discharge determine functional organization of the electrosensory epithelium. *PLOS ONE* **6**, e27470.

Santangelo, N. and Bass, A. H. (2006). New insights into neuropeptide modulation of aggression: field studies of arginine vasotocin in a territorial tropical damselfish. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **273**, 3085.

Semsar, K. and Godwin, J. (2004). Multiple mechanisms of phenotype development in the bluehead wrasse. *Hormones and Behavior* **45**, 345-353.

Semsar, K., Kandel, F. L. M. and Godwin, J. (2001). Manipulations of the AVT System Shift Social Status and Related Courtship and Aggressive Behavior in the Bluehead Wrasse. *Hormones and Behavior* **40**, 21-31.

Shin, H. S., Kim, N. N., Lee, J., Kil, G.-S. and Choi, C. Y. (2011). Diurnal and circadian regulations by three melatonin receptors in the brain and retina of olive flounder *Paralichthys olivaceus*: profiles following exogenous melatonin. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* **44**, 223-238.

Silva, A., Perrone, R. and Macadar, O. (2007). Environmental, seasonal, and social modulations of basal activity in a weakly electric fish. *Physiol Behav* **90**, 525-36.

Silva, A., Quintana, L., Ardanaz, J. L. and Macadar, O. (2002). Environmental and hormonal influences upon EOD waveform in gymnotiform pulse fish. *J Physiol Paris* **96**, 473-84.

Silva, A., Quintana, L., Galeano, M., Errandonea, P. and Macadar, O. (1999). WATER TEMPERATURE SENSITIVITY OF EOD WAVEFORM IN BRACHYHYPOPOMUS PINNICAUDATUS. *Journal of comparative physiology. A, Sensory, neural, and behavioral physiology* **185**, 187-197.

Silva, A., Quintana, L., Galeano, M. a. and Errandonea, P. (2003). Biogeography and Breeding in Gymnotiformes from Uruguay. *Environmental biology of fishes* **66**, 329-338.

Silva, A. C. and Pandolfi, M. (2018). Vasotocinergic control of agonistic behavior told by Neotropical fishes. *General and Comparative Endocrinology*.

Silva, A. C., Perrone, R., Zubizarreta, L., Batista, G. and Stoddard, P. K. (2013). Neuromodulation of the agonistic behavior in two species of weakly electric fish that display different types of aggression. *Journal of Experimental Biology* **216**, 2412-2420.

Stoddard, P. K., Markham, M. R. and Salazar, V. L. (2003). Serotonin modulates the electric waveform of the gymnotiform electric fish *Brachyhyppopomus pinnicaudatus*. *J Exp Biol* **206**, 1353-62.

Stoddard, P. K., Markham, M. R., Salazar, V. L. and Allee, S. (2007). Circadian rhythms in electric waveform structure and rate in the electric fish *Brachyhyppopomus pinnicaudatus*. *Physiol Behav* **90**, 11-20.

- Stoddard, P. K., Zakon, H. H., Markham, M. R. and McAnelly, L.** (2006). Regulation and modulation of electric waveforms in gymnotiform electric fish. *Journal of Comparative Physiology A* **192**, 613-624.
- Tharp, G. D. and Edgar Folk, G.** (1965). Rhythmic changes in rate of the mammalian heart and heart cells during prolonged isolation. *Comparative Biochemistry and Physiology* **14**, 255-273.
- Thompson, R. R. and Walton, J. C.** (2004). Peptide effects on social behavior: effects of vasotocin and isotocin on social approach behavior in male goldfish (*Carassius auratus*).
- Thompson, R. R. and Walton, J. C.** (2009). Vasotocin immunoreactivity in goldfish brains: characterizing primitive circuits associated with social regulation. *Brain Behav Evol* **73**, 153-64.
- Trujillo-Cenóz, O., Echagüe, J. A. and Macadar, O.** (1984). Innervation pattern and electric organ discharge waveform in *Gymnotus carapo* (Teleostei; Gymnotiformes). *Journal of Neurobiology* **15**, 273-281.
- Truman, J. W. and Riddiford, L. M.** (1970). Neuroendocrine Control of Ecdysis in Silkworms. *Science* **167**, 1624.
- van den Pol, A. N.** (2012). Neuropeptide transmission in brain circuits. *Neuron* **76**, 98-115.
- Waly, N. E. and Hallworth, R.** (2015). Circadian Pattern of Melatonin MT1 and MT2 Receptor Localization in the Rat Suprachiasmatic Nucleus. *Journal of Circadian Rhythms* **13**, 1.
- Wang, Z., Young, L. J., Liu, Y. and Insel, T. R.** (1998). Species differences in vasopressin receptor binding are evident early in development: Comparative anatomic studies in prairie and montane voles. *Journal of Comparative Neurology* **378**, 535-546.
- Whitmore, D., Foulkes, N. S. and Sassone-Corsi, P.** (2000). Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature* **404**, 87.
- Wong, C. J. H.** (1997). Connections of the basal forebrain of the weakly electric fish, *Eigenmannia virescens*. *Journal of Comparative Neurology* **389**, 49-64.
- Yaeger, C., Ros, A. M., Cross, V., DeAngelis, R. S., Stobaugh, D. J. and Rhodes, J. S.** (2014). Blockade of arginine vasotocin signaling reduces aggressive behavior and c-Fos expression in the preoptic area and periventricular nucleus of the posterior tuberculum in male *Amphiprion ocellaris*. *Neuroscience* **267**, 205-218.
- Yáñez, J., Busch, J., Anadón, R. and Meissl, H.** (2009). Pineal projections in the zebrafish (*Danio rerio*): overlap with retinal and cerebellar projections. *Neuroscience* **164**, 1712-1720.
- Zakon, H.** (1993). Weakly Electric Fish as Model Systems for Studying Long-Term Steroid Action on Neural Circuits. *Brain Behav Evol* **42**, 242-251.
- Ziv, L., Tovin, A., Strasser, D. and Gothilf, Y.** (2007). Spectral sensitivity of melatonin suppression in the zebrafish pineal gland. *Experimental Eye Research* **84**, 92-99.
- Zupanc, G. K.** (2001). Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *Brain Behav Evol* **58**, 250-75.
- Zupanc, G. K.** (2002). From oscillators to modulators: behavioral and neural control of modulations of the electric organ discharge in the gymnotiform fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *Journal of Physiology-Paris* **96**, 459-472.

Zupanc, G. K. and Horschke, I. (1996). Tectal input to the central posterior/prepacemaker nucleus of weakly electric fish, *Apteronotus leptorhynchus*: an in vitro tract-tracing study. *Brain Res* **739**, 201-209.

Zupanc, G. K. H. and Heiligenberg, W. (1992). The structure of the diencephalic prepacemaker nucleus revisited: Light microscopic and ultrastructural studies. *Journal of Comparative Neurology* **323**, 558-569.

Anexo 1

El aumento nocturno de la conducta eléctrica en la especie gregaria *Brachyhypopomus gauderio*.

La dualidad de la DOE como señal de comunicación y portadora de estímulos sensoriales hace de la conducta eléctrica un candidato clave para analizar el vínculo entre el sistema circadiano y el cerebro social. Las especies *B. gauderio* y *G. omarorum* son simpátridas y comparten el nicho temporal nocturno pero presentan una marcada diferencia en su socialidad siendo la primera una especie gregaria y la segunda altamente territorial. Esto nos alentó a buscar similitudes y diferencias en los ritmos diarios de la FB-DOE en ambas especies. Nos planteamos entonces la siguiente hipótesis:

Las variaciones diarias de la conducta eléctrica en la especie gregaria *Brachyhypopomus gauderio* presenta similitudes y diferencias con las de la especie territorial *Gymnotus omarorum*.

De esta hipótesis surgen las siguientes:

- a) Predicciones
 - a. El aumento nocturno de la FB en *B. gauderio* es independiente de los movimientos exploratorios que ocurren en la noche.
 - b. El bloqueo de los receptores de melatonina y AVT en *B. gauderio* impide el aumento nocturno de la FB-DOE en animales aislados.
 - c. La conducta eléctrica de *B. gauderio* registrada en el hábitat natural presenta un ritmo diario caracterizado por un aumento nocturno de la FB-DOE.
 - d. La ritmicidad de los cambios diarios de la FB-DOE de *B. gauderio* es modulada por factores ambientales y sociales.
- b) Objetivos específicos
 - a. Determinar si existe un aumento nocturno de la FB-DOE independiente de la actividad locomotora en *B. gauderio*.

- b. Determinar si la liberación endógena de melatonina y/o AVT son responsables del aumento nocturno de la FB-DOE en individuos aislados de *B. gauderio*.
- c. Evaluar el aumento nocturno de la FB-DOE en individuos aislados en el hábitat natural.
- d. Evaluar el aumento nocturno de la FB-DOE en individuos en contexto social en el hábitat natural.
- e. Evaluar las similitudes en el ritmo diario de la conducta eléctrica en ambas especies.

Para abordar estos objetivos utilizamos la misma metodología que en *Gymnotus omarorum* como se describe en la sección correspondiente de esta tesis (Capítulo 5).

Brachyhypopomus gauderio presenta un aumento nocturno en la FB-DOE que es independiente de la actividad locomotora. La figura A1.1 muestra el registro de la FB-DOE durante 24hs en animales que se encuentran en reposo voluntario (n=6). Los individuos, aislados y en reposo locomotor dentro de sus refugios presentan valores de FB-DOE 45 % ($FBI_{n_{max/-60}} = 0,45 \pm 0,29$) más altos en la noche que en el día, (FB_{max} vs FB_{-60} ; n=5; test pareado de Wilcoxon; $p=0,0003$; figura A1.1B).

En el laboratorio, en condiciones de aislamiento y temperatura constante, *B. gauderio* presenta un aumento nocturno inmediato al apagado de la luz que analizamos durante la primer hora de la noche. Se compararon los valores de la hora previa (FB_{-60}) al apagado de la luz en la estación conductual (tiempo=0), a los 10 min (FB_{10}) y a los 60 min (FB_{60}). La figura A1.2 muestra a modo de ejemplo la variación de la FB-DOE en un individuo, para este intervalo de tiempo (A1.2A). Todos los individuos analizados mostraron un aumento progresivo con valores máximos a los 60 min (FB_{60}) de apagado de la luz (n=6; prueba de Friedman; $p=0,0013$; figura A1.2B). Consecuentemente el aumento nocturno de la FB-DOE es mayor a los 60 min ($FBI_{n_{60}}$) que a los 10 ($FBI_{n_{10}}$) (n=9; test pareado de Wilcoxon; $p=0,01$; figura A1.2C).

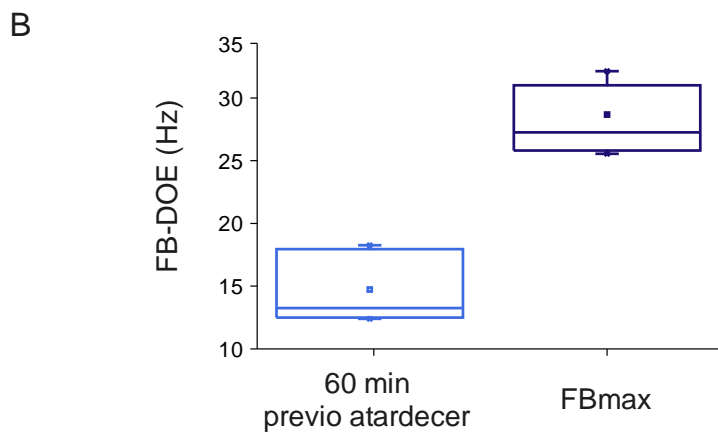
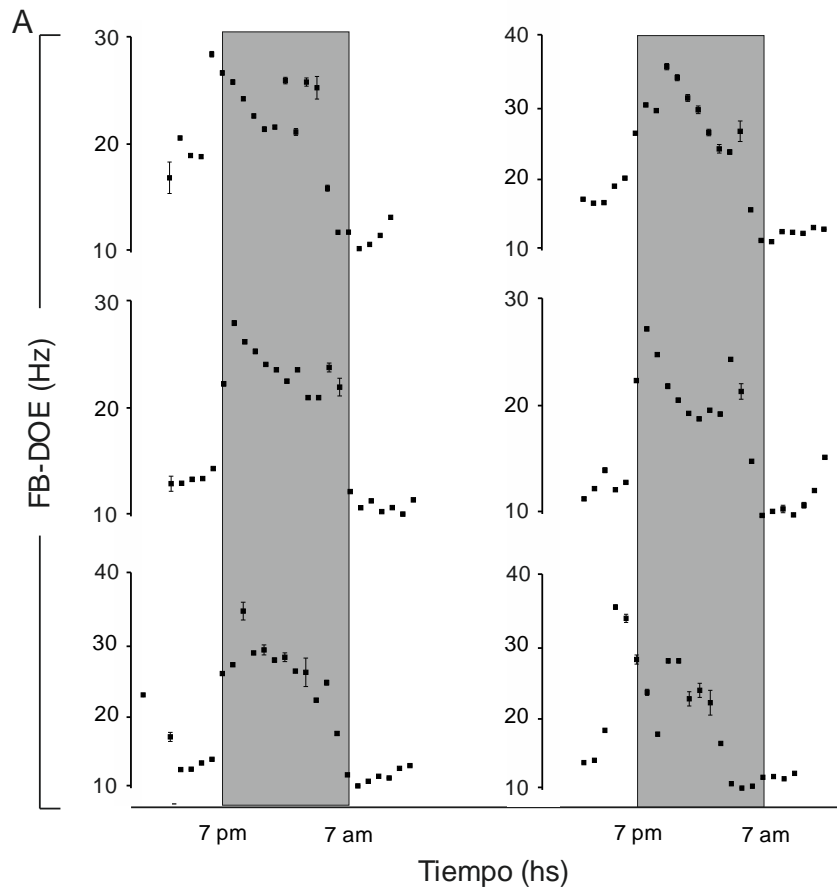


Figura A1.1. Aumento nocturno de la FB-DOE en animales en reposo voluntario. **A)** FB-DOE promedio calculada para cada hora durante 24 hs en 6 individuos. Los rectángulos en gris corresponden a la noche (19:00 a 7:00). **B)** Boxplot para la comparación de la FB-DOE una hora antes del atardecer (FB_{-60}) y en el máximo registrado (FB_{max}). Comparaciones pareadas a distintos tiempos, $n=6$, test pareado de Wilcoxon, $*/p<0,05$.

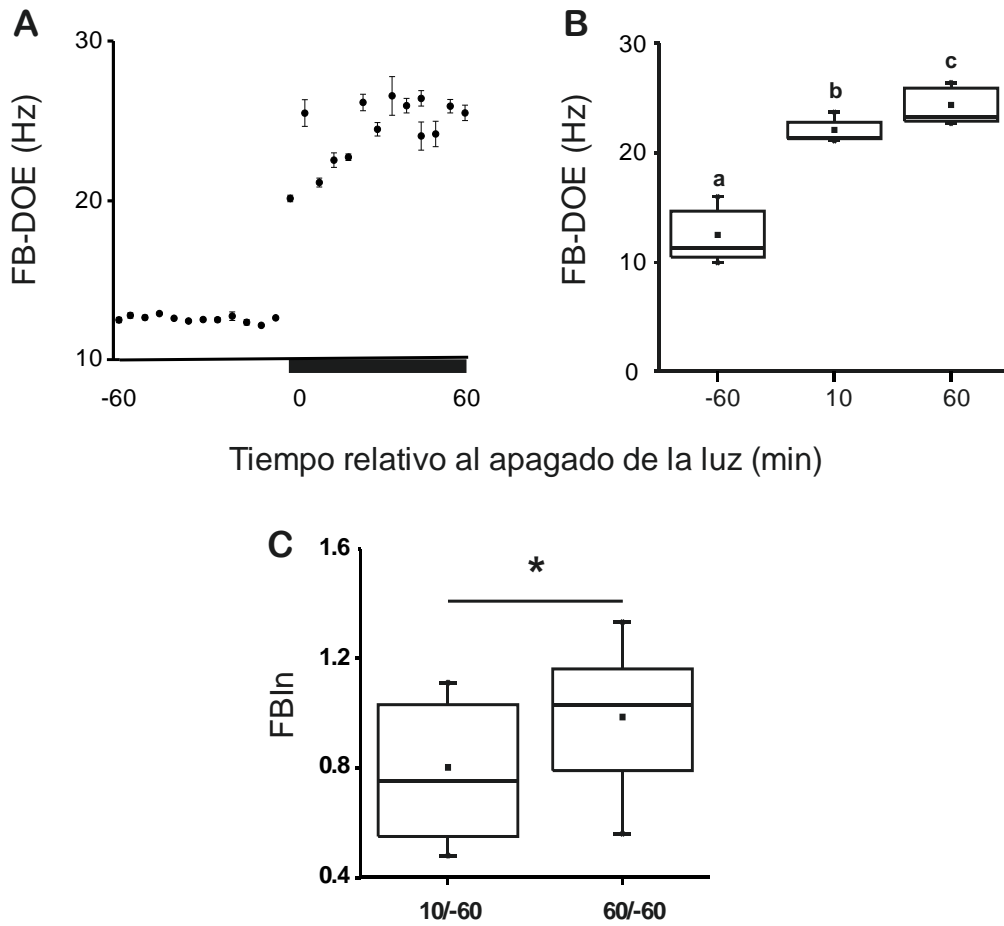


Figura A1.2. Aumento nocturno temprano de la FB-DOE en laboratorio. **A)** Ejemplo representativo de la variación de la FB-DOE (media±SD) calculada cada 10 min durante una hora antes (-60) y una hora después (60) del apagado de la luz (0). **B)** Boxplot para la comparación de la FB-DOE una hora antes del atardecer (FB_{-60}), 10 y 60 min después del atardecer (FB_{10} , FB_{60}). Comparaciones pareadas a distintos tiempos: n=6, prueba de Friedman, letras iguales: no significativo, letras diferentes: $p \leq 0.01$. **C)** Box plot para la comparación de los FBIn a los 10 y 60 minutos luego del apagado de la luz. Comparaciones pareadas a distintos tiempos, n=6, test pareado de Wilcoxon, */ $p < 0,01$.

Con el objetivo de constatar la existencia de este aumento nocturno en la naturaleza se ubicaron individuos ($n=6$) en bolsas de malla provistas de electrodos en el sitio de captura y cubiertos por la vegetación natural. El cálculo de la FB-DOE a partir de los registros de 72 hs se muestra en la Figura A1.3. A pesar de estar en condiciones de oscuridad constante todos los individuos registrados muestran un claro aumento nocturno con máximos valores de frecuencia durante la noche y valores mínimos hacia el amanecer (Figura A1.3A). La FB-DOE durante la noche presentó valores máximos significativamente superiores a los registrados una hora antes (FB_{\max} vs FB_{-60} , $n=6$, test pareado de Wilcoxon, $p=0.02$, Figura A1.3B). Se realizó un registro continuo de la FB-DOE ($n=1$) en una ventana temporal de 2 hs centrada en el atardecer (Figura A1.3C). El análisis cada 5 min de dicho registro muestra un aumento de la FB-DOE equivalente al registrado en el laboratorio.

Para analizar el rol de la melatonina y el AVT en el aumento nocturno de la FB-DOE de *B. gauderio*, realizamos inyecciones de sus antagonistas 30 min antes del apagado de la luz en individuos aislados en la estación conductual. La Figura A1.4A muestra con un ejemplo representativo que el tratamiento con MC previo al comienzo de la noche no modificó el aumento nocturno de la FB-DOE observado en individuos intactos y tratados con solución salina. Bajo el efecto de MC, los valores de FB-DOE registrados 60 y 10 min antes de apagada la luz son similares entre si y se observan aumentos progresivos a los 10 y 60 min después de apagada la luz (FB_{-60} vs FB_{-10} vs FB_{10} vs FB_{60} ; $n=6$; Prueba de Friedman; $p=0.0001$; Figura A1.4B). Más aún, los índices de aumento de la FB-DOE a los 60 min del apagado de la luz en individuos tratados con MC no fueron significativamente diferentes de los registrados en animales tratados con solución salina ($FBI_{nSal60/-60}$ vs $FBI_{nMC60/-60}$; $n=6$; test *U* de Mann-Whitney; $p=0.08$; Figura A1.4C).

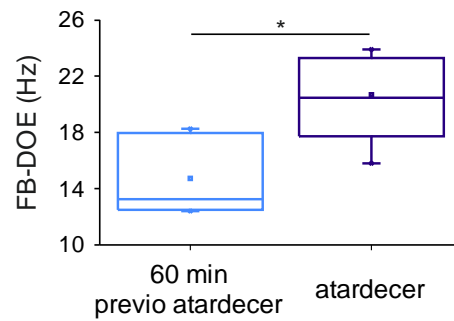
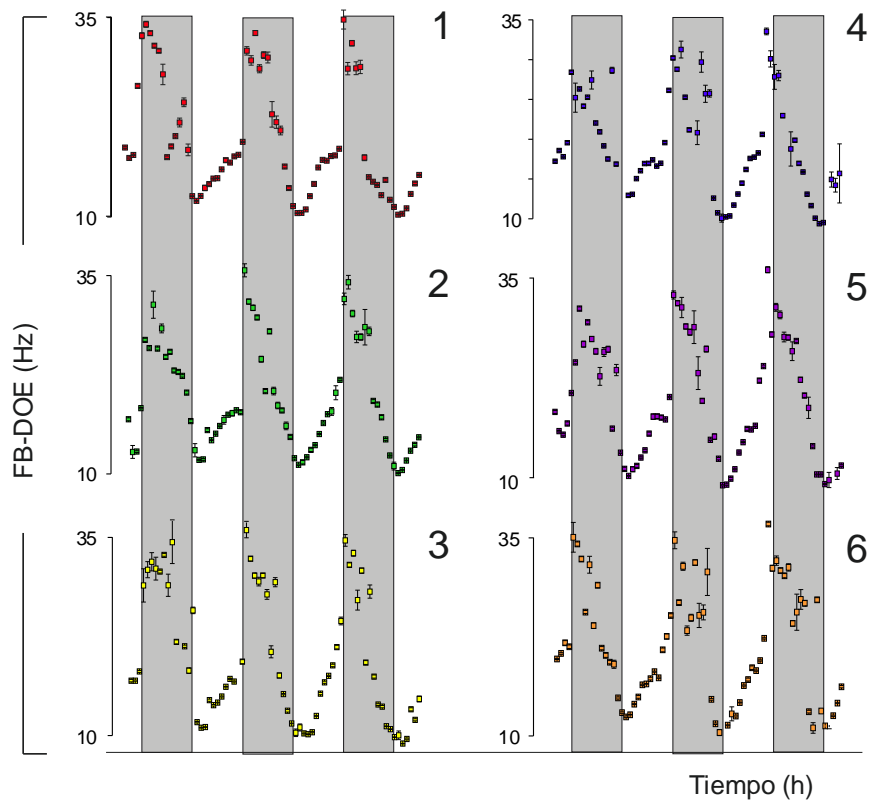


Figura A1.3. Aumento nocturno de la FB-DOE en individuos de *Gymnotus omarorum* mantenidos en su hábitat natural en contexto social. **A)** FB-DOE promedio (\pm SD) calculada para cada hora durante 72 hs en 6 individuos. Los rectángulos en gris corresponden a la noche (19:00 a 7:00). **B)** Boxplot para la comparación de la FB-DOE una hora antes del atardecer (FB_{-60}) y en el máximo registrado (FB_{max}). Comparaciones pareadas a distintos tiempos, $n=6$, test pareado de Wilcoxon, $*/p \leq 0,05$.

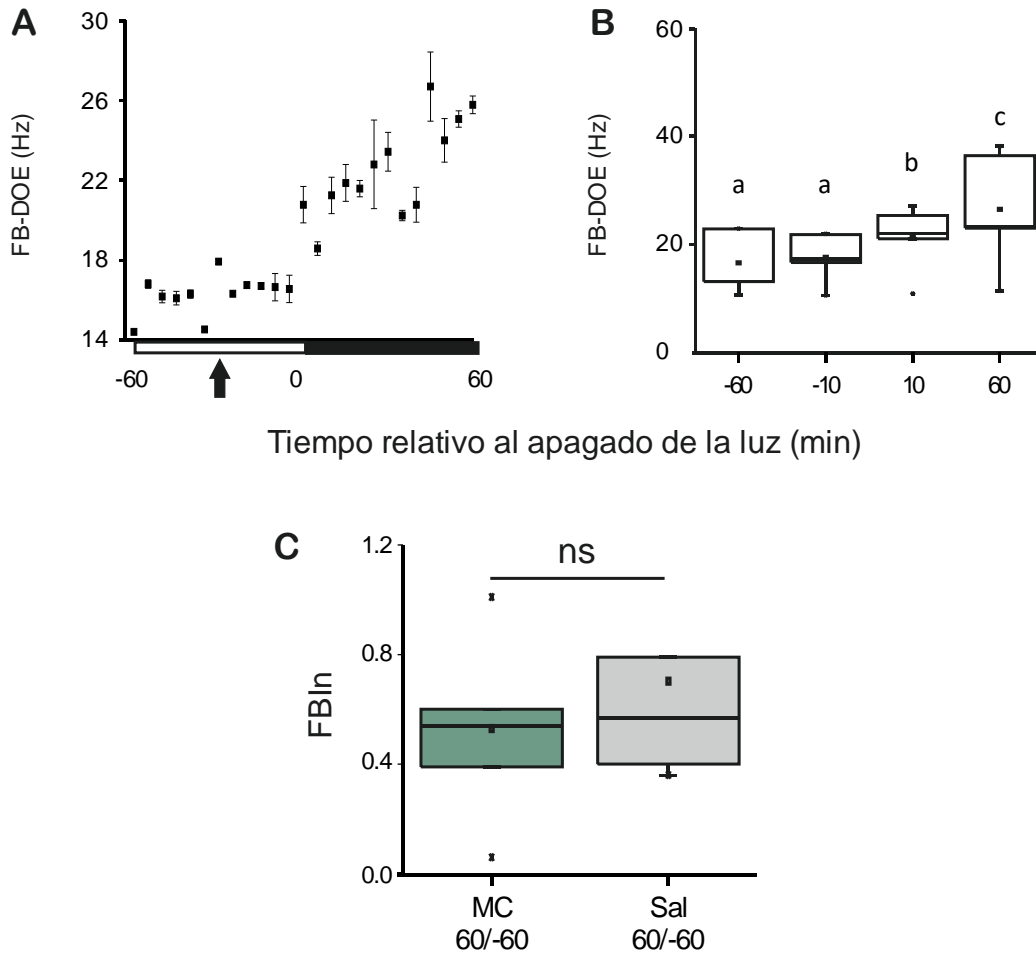


Figura A1.4. Efecto del tratamiento con MC sobre el aumento nocturno de la FB-DOE en individuos aislados de *Brachyhyppopomus gauderio*. **A)** FB-DOE en la hora previa y la hora posterior al apagado de la luz en un individuo representativo. La flecha indica el momento de la inyección de MC. **B)** Box plot para la comparación de la FB-DOE una hora antes (FB_{-60}), 10 minutos antes (FB_{-10}), 10 minutos después (FB_{10}) y 60 minutos después (FB_{60}) del apagado de la luz en la estación conductual bajo los efectos del tratamiento con MC ($n=6$, Prueba de Friedman). **C)** Box plot para la comparación de los FBIn obtenidos 60 min después del apagado de la luz entre individuos tratados con solución salina y con MC ($n=6$, test U de Mann-Whitney). Letras iguales/ns: no significativo, letras diferentes: $p<0.05$.

La figura A1.5A muestra con un ejemplo representativo que el tratamiento con luzindole abolió el aumento nocturno de la FB-DOE observado en la noche anterior. Cuando se comparó el aumento nocturno de la FB-DOE en cada individuo entre la noche 1 (intactos) y la noche 2 (tratados con luzindole) se observó un decremento significativo en la noche correspondiente al tratamiento ($FB_{\text{intactos}} \text{ vs } FB_{\text{luz}}$, $n=6$, test pareado de Wilcoxon, $p=0,034$). En la segunda noche, bajo el efecto de luzindole, los valores de FB-DOE registrados 60 y 10 min antes y 10 y 60 min después de apagada la luz, son similares entre sí ($FB_{-60} \text{ vs } FB_{-10} \text{ vs } FB_{10} \text{ vs } FB_{60}$; $n=6$; prueba de Friedman, $p=0,21$; Figura A1.5B). Se analizaron e incluyeron los valores de FB-DOE registrados 10 min antes del apagado de la luz con el objetivo de contar con una medida posterior a la manipulación de los individuos pero anterior al aumento nocturno. A los 60 min de apagada la luz los individuos tratados con luzindole presentaron un aumento de la FB-DOE (medido por el $FB_{\text{InLuz60/-60}}$) significativamente inferior al que alcanzan los tratados con solución salina ($FB_{\text{InSal60/-60}} \text{ vs } FB_{\text{InLuz60/-60}}$; $n=6$; test U de Mann-Whitney; $p=0,043$; Figura A1.5C).

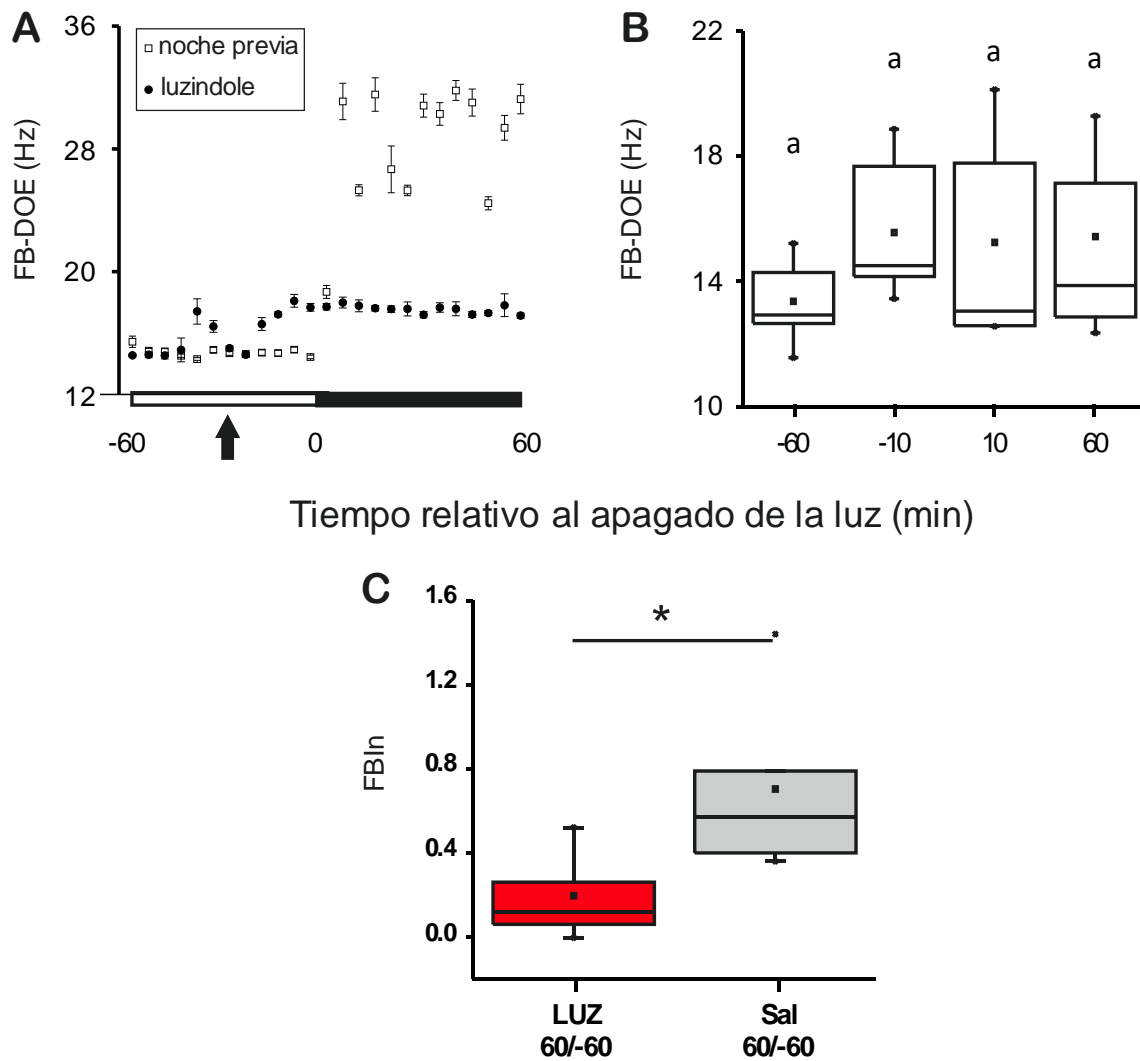


Figura A1.5. Efecto del tratamiento con luzindole sobre el aumento nocturno de la FB-DOE en individuos aislados de *Brachyhypopomus gauderio*. **A)** FB-DOE en la hora previa y la hora posterior al apagado de la luz en un individuo representativo en dos noches sucesivas. La flecha indica el momento de la inyección de luzindole en la segunda noche de registro. **B)** Box plot para la comparación de la FB-DOE una hora antes (FB_{-60}), 10 minutos antes (FB_{-10}), 10 minutos después (FB_{10}) y 60 minutos después (FB_{60}) del apagado de la luz en la estación conductual en la segunda noche bajo los efectos del tratamiento con luzindole ($n=6$, Prueba de Friedman). **C)** Box plot para la comparación de los FBIn obtenidos 60 min después del apagado de la luz entre individuos tratados con solución salina y con luzindole ($n=6$, test U de Mann-Whitney).

Discusión

Este capítulo fue guiado por la siguiente hipótesis:

Las variaciones diarias de la conducta eléctrica en la especie gregaria *Brachyhypopomus gauderio* presenta similitudes y diferencias con las de la especie territorial *Gymnotus omarorum*. Los resultados presentados en este capítulo refrendan parcialmente la hipótesis planteada. *B. gauderio* presenta un aumento nocturno de la FB-DOE tanto en la naturaleza como en el laboratorio y este aumento es independiente de la actividad locomotora.

En el análisis del aumento nocturno temprano, registrado en el laboratorio, encontramos diferencias en magnitud y duración respecto al reportado en *G. omarorum*. El aumento nocturno en *B. gauderio* es de mayor amplitud y duración, ya que se mantiene al final de la primera hora de la noche. Trabajos previos en esta misma especie reportaron un aumento nocturno de larga duración en peces en contexto social y un aumento idéntico en amplitud pero de menor duración en individuos aislados (Silva et al., 2007) que por otra parte es dependiente de AVT (Perrone et al., 2010). Esto sugiere la existencia de múltiples componentes involucrados en la generación de este aumento nocturno y posiblemente la convergencia de más de una vía de neuromodulación. Más aún, en una especie gregaria es explicable que el aislamiento genere una atenuación en una conducta altamente involucrada en la comunicación mientras permanece un remanente asociado a la nocturnidad intrínseca al individuo e independiente de su contexto social. En este sentido, esperábamos que la modulación del componente temprano del aumento nocturno en animales aislados fuera similar en ambas especies. Despojadas del contexto social ambas están expresando el componente nocturno fundamental, dependiente del sistema circadiano e independiente del cerebro social. En *B. gauderio*, como en *G. omarorum* este aumento no depende del sistema AVTérgico pero si del melatoninérgico.

La expresión del aumento nocturno de la FB-DOE de *B. gauderio* en la naturaleza presenta características similares a las descritas y analizadas en *G. omarorum*. Una independencia de la clave fotoperiódica y mayor amplitud que la registrada en el laboratorio posiblemente sostenida por la confluencia de variables ambientales y sociales sincronizadas con la misma fase del ciclo diario.

Los animales en contexto social y oscuridad constante presentan un aumento similar al de los animales aislados que reciben información fotoperiódica. En ambos casos el ciclo de temperatura del agua tiene un máximo que coincide con el atardecer y sugiere fuertemente a esta variable como zeitgeber para el ritmo circadiano de la FB-DOE.



Local vasotocin modulation of the pacemaker nucleus resembles distinct electric behaviors in two species of weakly electric fish



Rossana Perrone^a, Adriana Migliaro^{a,b}, Virginia Comas^c, Laura Quintana^a, Michel Borde^c, Ana Silva^{a,b,*}

^a Unidad Bases Neurales de la Conducta, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Avda. Italia 3318, 11600 Montevideo, Uruguay

^b Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay

^c Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Gral. Flores 2125, 11800 Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 11 August 2014

Keywords:

AVT
EOD rate
Gymnotus omarorum
Brachyhyppopomus gauderio
Neuromodulation
Hypothalamic neuropeptides

ABSTRACT

The neural bases of social behavior diversity in vertebrates have evolved in close association with hypothalamic neuropeptides. In particular, arginine-vasotocin (AVT) is a key integrator underlying differences in behavior across vertebrate taxa. Behavioral displays in weakly electric fish are channeled through specific patterns in their electric organ discharges (EODs), whose rate is ultimately controlled by a medullary pacemaker nucleus (PN). We first explored interspecific differences in the role of AVT as modulator of electric behavior in terms of EOD rate between the solitary *Gymnotus omarorum* and the gregarious *Brachyhyppopomus gauderio*. In both species, AVT IP injection (10 µg/gbw) caused a progressive increase of EOD rate of about 30%, which was persistent in *B. gauderio*, and attenuated after 30 min in *G. omarorum*. Secondly, we demonstrated by *in vitro* electrophysiological experiments that these behavioral differences can be accounted by dissimilar effects of AVT upon the PN in itself. AVT administration (1 µM) to the perfusion bath of brainstem slices containing the PN produced a small and transient increase of PN activity rate in *G. omarorum* vs the larger and persistent increase previously reported in *B. gauderio*. We also identified AVT neurons, for the first time in electric fish, using immunohistochemistry techniques and confirmed the presence of hindbrain AVT projections close to the PN that might constitute the anatomical substrate for AVT influences on PN activity. Taken together, our data reinforce the view of the PN as an extremely plastic medullary central pattern generator that not only responds to higher influences to adapt its function to diverse contexts, but also is able to intrinsically shape its response to neuropeptide actions, thus adding a hindbrain target level to the complexity of the global integration of central neuromodulation of electric behavior.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Complexity and diversity of social organization patterns in vertebrates have evolved in close association with hypothalamic neuropeptides of the vasopressin-oxytocin family including the ancestral arginine-vasotocin (AVT) (Goodson, 2008; Goodson and Bass, 2001; Goodson et al., 2012; Insel and Young, 2000). Fundamental mechanisms through which these peptides influence social

behaviors have emerged from multi-species studies involving mammals and birds. For example, differences in the social organization of closely related species of voles have been demonstrated to be paralleled by differential central vasopressin signaling (Young et al., 1997). In estrildid finches, Goodson and Kingsbury (2011) have shown that the valence of social stimuli and group size preferences between species are encoded by the AVT system. As fish are the most ancient and diverse class of vertebrates, teleosts arise as advantageous model systems to test the role of AVT in shaping social behavior across evolution. Fish species have been intensively studied in the last years to understand the role of neuropeptide control of social behavior, but no consensual general patterns have yet emerged (Godwin and Thompson, 2012; Thompson and Walton, 2013). However, previous reports did succeed in demonstrating how evolutionary adaptations in AVT hindbrain descending pathways have evolved in fish in response to unique social pressures to control, for example, vocal behavior in the pla-

Abbreviations: AVT, arginine-vasotocin; EOD, electric organ discharge; MC, Manning Compound; PN, pacemaker nucleus.

* Corresponding author at: Unidad Bases Neurales de la Conducta, IIBCE, Avda Italia 3318, 11600 Montevideo, Uruguay. Tel.: +598 24875532; fax: +598 24875548.

E-mail addresses: rperrone@iibce.edu.uy (R. Perrone), amigliaro@fcien.edu.uy (A. Migliaro), vcomas@fmed.edu.uy (V. Comas), lquintana@iibce.edu.uy (L. Quintana), mborde@fmed.edu.uy (M. Borde), asilva@iibce.edu.uy (A. Silva).

infin midshipman (Goodson and Bass, 2000a,b), or social approach in goldfish (Thompson et al., 2008).

The electric organ discharge (EOD) and its modulations displayed by South American electric fish (Order Gymnotiformes) constitute easily measurable, conspicuous, and distinctive social behaviors that depend on a well-known neural circuit. The peculiarities of electric behavior, the tractability of its underlying neural circuit, and the possibility of conducting comparative studies among related species with different social structures, make electric fish excellent model systems to explore the neuroendocrine bases of social behavior. The EOD carries information about an individual's species identity, sex, and physiological state, which is coded both by discharge rate and EOD waveform (Caputi et al., 2005). Each EOD is triggered by the command discharge of a medullary structure, the pacemaker nucleus (PN), which is composed of two different neuronal types: intrinsic autorhythmic pacemaker cells and projecting bulbospinal relay neurons (Caputi et al., 2005). The rhythmic command for the EOD is initiated at the pacemaker cells, which fire in synchrony, and then transmitted to relay cells in a 1:1 manner (Bennett et al., 1967; Curti et al., 2006). The PN itself commands the regular basal rhythm of the EOD, whereas modulations arise from higher centers (pre-pacemaker structures) to continuously adapt PN rate to environmental, physiological, and social contexts (Comas and Borde, 2010; Kawasaki and Heiligenberg, 1989, 1990; Keller et al., 1991; Stoddard, 2002). EOD rate varies by season, time of day, temperature, sex, social status, locomotor activity, and presence of novel stimuli (Silva et al., 2007). In addition, fish also produce transient communication signals (rapid modulations of the EOD such as chirps, accelerations, and interruptions) that are displayed in different behavioral scenarios (Lorenzo et al., 2006; Perrone et al., 2009).

Our group has been recently interested in the study of AVT modulation of social behavior in two species of weakly electric fish that exhibit different social organization and display different types of aggression (Silva et al., 2013). *Gymnotus omarorum* is a sexually monomorphic solitary, highly aggressive species that displays a unique form of non-sexually biased territorial aggression (Batista et al., 2012). *Brachyhyppomus gauderio* is a sexually dimorphic gregarious species with a polygynous breeding system that displays a reproduction-related intermale aggression (Zubizarreta et al., 2012). Our first approach was to explore interspecific differences in the effect of AVT on the basic unit of electric behavior, i.e. the EOD basal rate of isolated individuals during their resting diurnal phase of the non-breeding season. We found that the administration of AVT induced a large and long-lasting increase in the EOD basal rate of *B. gauderio*, but had no persistent effect in *G. omarorum* (Perrone et al., 2010). The firing rate of the PN of *B. gauderio*, when tested in an *in vitro* preparation, also increased persistently (lasting > 60 min) after the addition of AVT (for 20 min) to the bathing solution, suggesting that the electric behavior observed *in vivo* (Perrone et al., 2010) is due to the direct effect of AVT on the PN. More recently, in a more realistic approach during agonistic encounters, AVT has been confirmed to be distinctively involved in the modulation of electric behavior in both species, responsible for the electrical dominance of *B. gauderio* and involved in the electrical submission of *G. omarorum* (Silva et al., 2013). The PN thus arises as an accessible target nucleus to explore precise mechanisms of interspecific differences in AVT modulation of behavior.

In this study, we aim to deepen the exploration of the diverse actions of AVT on the modulation of electric behavior between the solitary *G. omarorum* and the gregarious *B. gauderio*. We first analyzed early effects of AVT (<30 min) on the EOD basal rate of isolated individuals of both species and identified that AVT induces a small transient increase in sexually monomorphic adults of *G. omarorum* and a large progressive increase in males of *B. gauderio*.

Secondly, we focused on the PN to explore to what extent these behavioral differences can be accounted for by dissimilar effects of AVT upon the command nucleus in itself. In this respect, we demonstrate that AVT modulation of the spontaneous activity of the PN in brainstem slices of *G. omarorum* is different than the effect previously reported in *B. gauderio* (Perrone et al., 2010). We also identify (by immunodetection) the presence of AVT fibers in close proximity to the PN in males of both species. We finally speculate on how these findings contribute to the understanding of the role of the PN as an integrator of multiple influences that shape the diversity and plasticity of social electric behavior.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Individuals of *B. gauderio* (Giora and Malabarba, 2009), and of *G. omarorum* (Richer-de-Forges et al., 2009) were detected and collected using a “fish detector”, an electronic audio amplifier connected to a pair of electrodes, as described elsewhere (Silva et al., 2003). *B. gauderio* were obtained from Laguna Lavalle (31°48'S, 55°13'W, Department of Tacuarembó, Uruguay), and *G. omarorum* were collected from Laguna del Sauce (34°51'S, 55°07'W, Department of Maldonado, Uruguay). As previously described (Perrone et al., 2010), and in accordance with their different social structure, *G. omarorum* were housed in individual compartments within 500 l-outdoor tanks, whereas *B. gauderio* were housed in social groups with the sex ratio of natural breeding colonies containing 3 females per male (Miranda et al., 2008). Fish were fed *Tubifex tubifex ad libitum*. As *B. gauderio* is a sexually dimorphic species (Giora and Malabarba, 2009), we selected males to carry out this study. In the case of the sexually monomorphic *G. omarorum* (Richer-de-Forges et al., 2009), in which sex can only be identified by gonadal inspection, we used males for immunohistochemical experiments and a mixed population (sex ratio 1:1) of adults for behavioral and *in vitro* experiments. To achieve reliable and repeatable behaviors, our collection, transportation, housing, and recording conditions were adjusted to minimize stress on the animals. All research procedures complied with ASAP.ABS Guidelines for the Use of Animals in Research and were approved by the Institutional Ethical Committee (Comisión de Ética en el Uso de Animales, Instituto Clemente Estable, MEC, 07-28-2008 and 007/02/2010) and Comisión de Ética en el Uso de Animales, Facultad de Medicina, UdelaR, 071140-000092-13).

2.2. Behavioral experiments

Fish were placed in an experimental setup (40 l-glass tanks) that allowed simultaneous video and electric recordings as described elsewhere (Silva et al., 2007). Fish were recorded during daytime (10–12 AM) in the non-breeding season after being in the recording tank at constant temperature (20–22 °C) for 12 h before the beginning of the experiment. The EODs of freely moving fish were detected by two pairs of fixed electrodes, connected to two high-input impedance amplifiers (FLA-01, Cygnus Technologies Inc.). The electric signals were captured by an audio card (Encore Electronics, ENM 232-8VIA), and images were captured by a video card (Pinnacle Systems, PCTV-HD pro stick) and stored in the computer. Following Perrone et al. (2010), we tested the effects of AVT (IP, 10 µg/gbw) on EOD rate against saline controls (IP administration of equivalent volumes of saline solution, $n = 6$) in resting conditions (freely moving isolated males during daytime in the non-breeding season) in *B. gauderio* ($n = 6$) and *G. omarorum* ($n = 7$).

We took 10 s EOD recordings every 10 min, and calculated the mean EOD interval in each sample using Clampfit (Axon,

10.0.0.61). This interval was converted to frequency and represented the EOD rate of each sample. The median EOD rate of 30 min of the recordings previous to either saline or AVT injections was considered the EOD rate_{pre-treatment}. For comparisons, the amplitude of the effect of IP treatments was quantified as the percentage of EOD rate increase calculated as follows:

$$\text{EOD rate increase (\%)} = \frac{[\text{EOD rate}_{10/30 \text{ min after treatment}} - \text{EOD rate}_{\text{pre-treatment}}]}{\text{EOD rate}_{\text{pre-treatment}}} * 100$$

2.3. In vitro recordings

For *in vitro* analysis of the effects of AVT on the PN discharge rate of *G. omarorum*, 6 individuals (13.8–16 cm) were anesthetized as described elsewhere (Comas and Borde, 2010) and placed in a plastic box with its abdomen lying on a wet sponge. All surgical areas and fixation points were heavily infiltrated with 2% Lidocaine hydrochloride. During surgical procedures, the head was maintained in a horizontal position by a pair of plastic tipped metal bars attached to the box and the gills were perfused with MS222 dissolved in iced tap water (0.3 mg/l). The dorsal surface of the brain was exposed while bathed with cold Na-free Ringer-sucrose solution (containing in mM: 213 sucrose, 3 KCl, 0.75 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 24 NaHCO₃, 10 D-Glucose, 1.6 CaCl₂, pH 7.2–7.4 after saturation with carbogen). The brain with part of the spinal cord was rapidly removed from the skull and submerged in cold Ringer-sucrose solution. Transverse sections of the brainstem (400 μm thick) containing the PN were obtained under cold Ringer-sucrose using a Vibratome 1000 plus, and were incubated (>1 h, at room temperature, 21–23 °C) in a 1:1 solution of Ringer-sucrose and Ringer solution (containing in mM: 124 NaCl, 3 KCl, 0.75 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 24 NaHCO₃, 10 D-Glucose, 1.6 CaCl₂, pH 7.2–7.4 after saturation with carbogen). Slices were transferred to a 2 ml recording chamber fixed to an upright microscope stage NIKON (ECLIPSE FN1) equipped with infrared differential interference contrast (DIC) video microscopy and a 40x water immersion objective. Slices were perfused with carbogen-bubbled Ringer solution (1.5–3 ml/min) and maintained at room temperature (20–23 °C). Under these experimental conditions, the PN maintains its spontaneous synchronized activity with a stable firing rate for at least 6 h. AVT was added to the Ringer solution (at 1 μM) and perfused during periods of 20 min (*n* = 6). In order to equilibrate perfusion and bath AVT concentrations, and taking into account the perfusion flow and the recording chamber volume, we estimated an interval of 3 min after switching to Ringer-AVT solution. AVT was also applied in the presence of a specific V1a AVT receptor antagonist (Manning Compound, MC) diluted in Ringer solution at 10 μM (*n* = 4).

The electric activity of the PN was monitored using an Axoclamp 2B amplifier (Axon Instruments, CA, USA) by means of extracellular recordings of field potentials (5 out of 6 experiments) or by recording intracellularly from a relay cell. For extracellular recordings, patch pipettes (4–8 MΩ) filled with Ringer solution were placed near relay cell somas. Intracellular recording was performed with a patch pipette in the whole cell configuration from the soma of a relay cell. The patch pipette (6 MΩ) was filled with a potassium gluconate based intracellular solution (in mM: 140 K-gluconate, 0.2 EGTA, 4 ATP-Mg, 10 HEPES, pH 7.3). In both cases, patch pipettes were placed with a hydraulic micromanipulator (Narishige, Tokyo, Japan). Data were low-pass filtered at 3.0 kHz, sampled at 10.0 kHz through a Digidata 1322A (Axon Instruments, California, USA) and stored in a PC computer for further analysis with the aid of the pClamp programs (Axon Instruments, California, USA). Field potentials and relay cell action potentials were sampled during 30 s every minute and mean PN firing rate was calculated

for each sample. Spontaneous PN activity and AVT effects were evaluated by plotting the mean firing rate per sample (mean FR/sample) against time (as in Fig. 2A). Similarly to behavioral data processing, and in order to compare data from different experiments, the magnitude of AVT effect on PN discharge rate was normalized to baseline firing rate as follows:

$$\text{PN firing rate increase (\%)} = \frac{[(\text{peak AVT freq} - \text{baseline freq}) / \text{baseline freq}] * 100$$

where peak AVTfreq corresponds to the maximum mean FR/sample observed under AVT perfusion, and baseline freq is an average of the firing rate during a period of 5 min (5 samples) taken immediately before AVT application. The time course of the response to AVT was assessed by measuring the rise time from 10% to 90% (rise time_{10–90}) and the decay time from 90% to 10% (decay time_{90–10}) of responses.

2.4. Immunohistochemistry

Fish (7 males of each species) were deeply anesthetized as described elsewhere (Pouso et al., 2010) and perfused with saline followed by 4% Paraformaldehyde dissolved in phosphate buffer [PB, 25–35 ml, pH 7.4]. Brains were dissected, post-fixed in the same fixative at 4 °C overnight, and rinsed in 0.1 M PB, pH 7.4. Brains were enclosed in gelatin/albumin and the brain areas of interest (including the preoptic area, PN and hypophysis), were transversally sectioned (50 μm) on a vibrating microtome (Leica VT1000S).

Slices were rinsed in PB (4 × 15 min), and non-specific binding sites were blocked with 0.5% bovine serum albumin (BSA, Sigma) for 1 h. Slices were incubated for 60 h in rabbit polyclonal anti-AVT antibody (1:1000), kindly provided by R. Buijs (Universidad Autónoma de Mexico) and M. Grober (Georgia State University), dissolved in 0.1 M PB and 0.3% Triton X-100 (PBT) and 0.5% BSA. Following incubation, slices were rinsed in PB (4 × 15 min) and were then incubated with the secondary antibody (Alexafluor 488 anti-rabbit, Molecular Probes, 1:1000), for 2 h at room temperature, rinsed in PB (4 × 15 min), mounted in glycerin and coverslipped.

AVT neurons within the preoptic area were easily identified in both species (Fig. 3A and B) and were used as positive controls; i.e., we searched for AVT fibers in PN sections only in brains that exhibited immunostained AVT neurons in the preoptic area. The specificity of the primary antibody was tested by pre-incubating the antibody with AVT peptide (American Peptide Company, USA, 1:500). No reactivity was detected in the slices incubated with the pre-incubated anti-serum. The antibody was also pre-incubated with the peptide isotocin (Bachem, Torrance, CA, USA; 1:500), and the slices showed no difference with plain AVT antibody staining. Additional controls were performed omitting the primary and secondary antibodies. No reactivity was detected in these controls (data not shown).

Slices were viewed in a confocal microscopy (Olympus VF300), using an argon (488) laser. Confocal images were imported into Fluoview 5 and processed with the software ImageJ 1.45s. All the images were taken between 24 and 48 h after mounting (fluorescent staining lasts 15 days at the used concentration of the secondary antibody). The percentage of PN slices that showed AVT-ir fibers was determined for each fish in both species. All AVT-ir fibers detected in the brainstem section containing the PN were traced digitally over the confocal image. In order to characterize possible interspecific differences in fiber distribution, we measured the angle of the closest point of each fiber to the center of the portion of the PN contained in the section, defined as the intersection of the dorso-ventral and left-right midlines traced as shown in

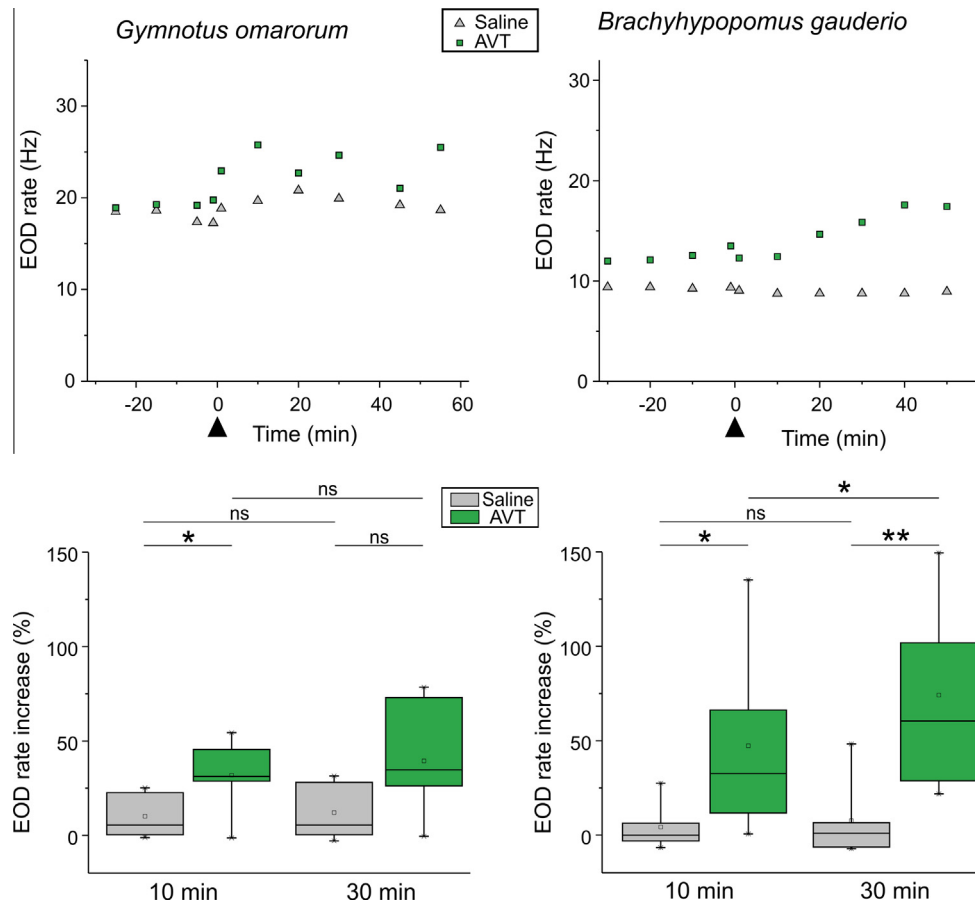


Fig. 1. Effects of AVT on EOD diurnal rate of *Brachyhypopomus gauderio* and *Gymnotus omarorum*. (Top) EOD rate as function of time during daytime in isolated fish during the non-breeding season. Immediately after AVT injection (open squares, IP, 10 $\mu\text{g}/\text{gbw}$ at time = 0, arrowhead), a small transient increase of EOD rate was observed in *G. omarorum*, whereas a progressive long-lasting increase of EOD rate was observed in *B. gauderio* as shown for representative individuals. No consistent changes in EOD rate were observed in saline injected controls (solid triangles) of both species as shown for representative individuals. (Bottom) Box plots of percentual EOD rate increases. The amplitude of the increase in EOD rate induced by AVT was significantly higher than the one observed in saline controls in *G. omarorum* (10 min after its administration) and in *B. gauderio* (10 min and 30 min after its administration). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns: non-significant; Mann-Whitney U test (AVT vs saline); Wilcoxon Matched-Pairs test (saline_{10min} vs saline_{30min}, AVT_{10min} vs AVT_{30min}).

Fig. 4E (i.e., fibers located exactly dorsal to the PN were at a 0° angle, while those located exactly ventral were at 180°).

2.5. Statistics

Because behavioral, electrophysiological, and immunohistochemical data did not follow a normal distribution, they were analyzed using non-parametric statistical tests: Wilcoxon Matched-Pairs test (paired variables in the same fish or brainstem slice), and Mann-Whitney U test (independent variables using sets of data from different fish within and between species). For this reason, data are expressed as median \pm median absolute deviation (MAD) throughout, and represented in Fig. 1 using box plots to full display of data. For the analysis of the distribution of AVT fibers in brainstem slices, we used circular statistics, and the non-parametric Mardia-Watson-Wheeler test for interspecific comparisons.

3. Results

3.1. Effects of AVT on EOD rate of *G. omarorum* and *B. gauderio*

As shown in Fig. 1 for representative individuals (above) and in statistical terms (below), the EOD basal rate and its response to the administration of AVT was different in both species. We first observed the expected interspecific differences in the characteristic diurnal value of EOD basal rate: 18.1 ± 1.09 Hz in *G. omarorum*

(ranging from 12.9 to 32.5 Hz, $n = 13$), and 11.4 ± 1.8 Hz in *B. gauderio* (ranging from 5.3 to 17.6 Hz, $n = 12$). AVT administration induced an increase in EOD basal rate, whose magnitude and timing were different between species (Fig. 1).

In *G. omarorum*, AVT produced an early rise of EOD rate (whose amplitude was 5.76 ± 0.73 Hz, $n = 7$) 10 min after its administration, corresponding to a $31.2 \pm 3.1\%$ increase. When percentage increases in EOD rate induced by AVT were contrasted against saline controls, we only observed a significant effect in *G. omarorum* 10 min after AVT administration ($p = 0.035$, % increase_{10min-saline} = 15.73 ± 9.9 vs % increase_{10min-AVT} = 31.21 ± 3.13 , Mann-Whitney U test, $n_{\text{AVT}} = 7$, $n_{\text{saline}} = 6$), and only marginally significant 30 min after AVT injection ($p = 0.073$, % increase_{30min-saline} = 7.64 ± 8.9 vs % increase_{30min-AVT} = 34.9 ± 8.5 , Mann-Whitney U test, $n_{\text{AVT}} = 7$, $n_{\text{saline}} = 6$); although percentage increases in EOD rate were not significantly different across time ($p = 0.237$, % increase_{10min-AVT} vs % increase_{30min-AVT} Wilcoxon Matched-Pairs test, $n = 7$).

In *B. gauderio*, AVT produced a progressive increase of EOD rate during 30 min after its administration. This rise was 4.11 ± 2.21 Hz ($n = 6$, $35.16 \pm 27.28\%$ increase) at 10 min and 7.86 ± 3.22 Hz ($n = 6$, $71.36 \pm 36.56\%$ increase) at 30 min. This effect was already significant 10 min after its administration in *B. gauderio* when tested against saline controls ($p = 0.026$, % increase_{10min-saline} = 1.03 ± 4.7 vs % increase_{10min-AVT} = 35.16 ± 27.28 , Mann-Whitney U test, $n_{\text{AVT}} = 6$, $n_{\text{saline}} = 6$) but maximum at 30 min

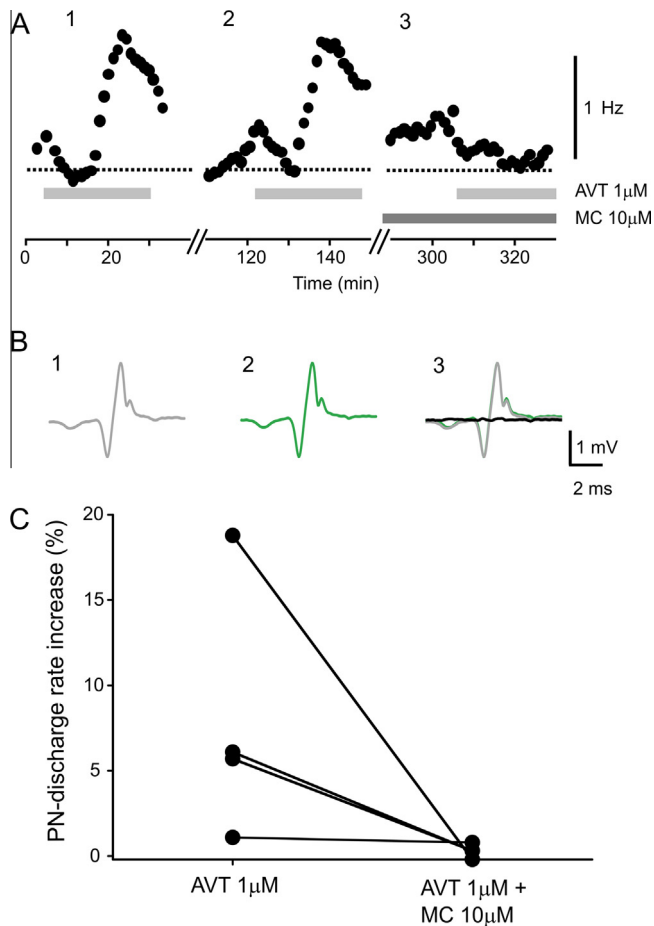


Fig. 2. Effects of AVT on PN spontaneous activity in *Gymnotus omarorum*. (A) Plots of frequency (mean rate per sample) vs time during 20 min-perfusion of AVT (1 μ M, light gray horizontal bars). (A1 and A2) Two successive responses to AVT separated by 60 min washout. (A3) A third application of AVT after 60 min washout carried out under perfusion of MC (10 μ M, dark gray bar) did not evoke the previously observed increase in PN firing rate. Dotted line indicates baseline firing rate (baseline freq. in Section 2.3) of 21.6 Hz, 21.4 Hz and 20.6 Hz for A1, A2, and A3, respectively. (B) The waveform of PN field potential recorded near relay cells somata remained unchanged during AVT-induced accelerations of the PN discharge. (B1) Averaged control PN field potential (150 recordings, gray trace) obtained before AVT perfusion. (B2) Averaged PN field potential (150 recordings, green trace) recorded during the maximum effect of AVT. (B3) Control and AVT PN field potentials (almost identical) were superimposed together with the point by point subtraction of both traces (black trace). (C) Summary plot of the amplitude of AVT-induced increase in PN firing rate before and after MC perfusion ($n = 4$).

post-treatment ($p = 0.008$, % increase_{30min-saline} = 2.04 ± 6.4 vs % increase_{30min-AVT} = 71.36 ± 36.6 , Mann Whitney U test, $n_{AVT} = 6$, $n_{saline} = 6$); consequently, percentage increases in EOD rate were significantly different across time ($p = 0.028$, % increase_{10min-AVT} vs % increase_{30min-AVT} Wilcoxon Matched-Pairs test, $n = 6$).

3.2. Effects of AVT on PN firing rate of *G. omarorum*

Spontaneous activity of the PN of *G. omarorum* in brainstem slices showed discharge rates ($24.03 \pm 2.31 \times 10^{-5}$ Hz, ranging from 21 to 28 Hz, $n = 6$) within the range observed for the EOD rate of freely moving diurnal fish (12.9–32.5 Hz) although with less variability. Adding AVT (1 μ M) to the perfusion solution induced an increase in PN firing rate with an amplitude of 1.58 ± 0.44 Hz ($n = 6$), a response that corresponds to an increase of $7.2 \pm 2.14 \times 10^{-5}\%$ relative to the basal firing rate (Fig. 2A1–2). As shown in a representative example in Fig. 2B, the waveform of the PN field potential was not affected by AVT administration. At

the peak of each AVT response, maximal mean firing rate/sample differed significantly from basal mean firing rate/sample values ($p = 0.028$, Wilcoxon Matched-Pairs test, $n = 6$). AVT responses peaked at 12.00 ± 2.48 min after switching to Ringer-AVT solution with a rise time_{10–90} of 4.78 ± 1.05 min. Even in the presence of AVT, the PN firing rate tended to decrease and slowly returned to basal firing rates with a decay time of 20.02 ± 6.27 min. Although measuring the latency of AVT responses (after switching to Ringer-AVT solution) was difficult because of its slow time course and small amplitude, it took a median interval of 4.2 min to detect a noticeable increase in PN firing rate. In 2 experiments, after AVT application, the slice was perfused for 60 min with Ringer solution and AVT was then reapplied for 20 min in order to confirm the reproducibility of AVT effect on PN firing rate in the same preparation (Fig. 2A1–2). As shown in the example of Fig. 2A3, AVT responses were consistently blocked by the addition of MC (10 μ M, $n = 4$) to the perfusion solution, indicating the involvement of the V1a AVT receptor subtype (Fig. 2C). MC per se did not induce remarkable changes of basal PN firing rate (4 out of 4 experiments).

3.3. Identification of AVT fibers in the proximity of the PN of *G. omarorum* and *B. gauderio*

As previously described in other teleost species (Dewan et al., 2008; Maruska, 2009; Ramallo et al., 2011), *G. omarorum* (Fig. 3A) and *B. gauderio* (Fig. 3B) exhibited AVT-ir neurons labeled in the preoptic area in all the experimental individuals, forming a large band extending from the optic chiasm to the anterior commissure. AVT-ir fibers were also evident, as expected, in a bundle along the hypophysial stalk (Fig. 3C). As described for neurites associated with peptidergic transmission in other systems (Dewan et al., 2011; Saito et al., 2004), all AVT-ir fibers presented multiple varicosities in both *G. omarorum* (Fig. 3D) and *B. gauderio* (Fig. 3E). The preabsorption of AVT antiserum with AVT peptide blocked the reaction of the antibody in the tissue (data not shown). AVT immunoreactivity was not affected by preincubation with isotocin (data not shown).

We identified the presence of AVT-ir fibers in brainstem sections containing the PN of *G. omarorum* (Fig. 4A) and of *B. gauderio* (Fig. 4B). Following previous descriptions (Bennett et al., 1967; Curti et al., 2006; Quintana et al., 2011a; Trujillo-Cenóz et al., 1993), the PN is easily identifiable as a conspicuous spindle-shaped nucleus lying close to the ventral surface of the medulla with ventral large relay neurons (white arrowheads in Fig. 4A and B) and smaller dorsal pacemaker neurons. In all the experimental individuals of both species, approximately one third of PN sections exhibited AVT-ir fibers with multiple varicosities (white arrows in Fig. 4A–D). Also in both species, AVT fibers were identified in close proximity to relay cells, along the whole length of the PN, in rostral, medial or caudal sections, as shown in an example for *G. omarorum* (Fig. 4C) and for *B. gauderio* (Fig. 4D).

In addition to these similarities, we found interspecific differences in the position and distribution of AVT-ir fibers with respect to the PN within the brainstem slice (Fig. 4F and G). The AVT-ir fibers of *G. omarorum* were observed in a narrow area near the midline dorsal to the PN (0° in Fig. 4E), whereas AVT-ir fibers in *B. gauderio* were spread over a larger area around the PN dorso-ventral midline. The different profile between species is illustrated in the rose histograms presented in Fig. 4F–G (Mardia–Watson–Wheeler test, $n_1 = 121$, $n_2 = 104$, $p < 10^{-12}$).

4. Discussion

This study rounds up a long-term project aimed to identify interspecific differences in the role of AVT as modulator of electric

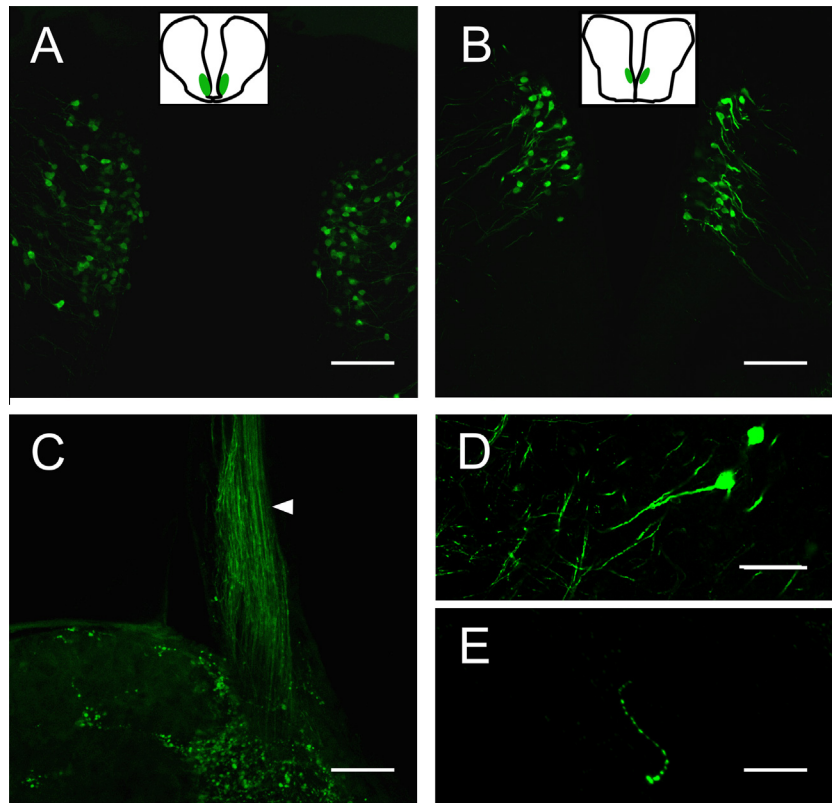


Fig. 3. AVT immunoreactivity in *Gymnotus omarorum* and *Brachyhyppopomus gauderio*. (A) The preoptic area of *Gymnotus omarorum*, and (B) *Brachyhyppopomus gauderio* presented AVT-ir cell bodies and fibers. Insets (A and B): schematic drawings of brain transversal sections. (C) The hypophysial stalk shows an AVT-ir bundle as expected (*B. gauderio*). AVT-ir fibers present multiple varicosities in both *G. omarorum* (D) and *B. gauderio* (E). Calibration bars (A and B): 100 μm ; (C and D): 50 μm ; (E): 25 μm .

behavior between the solitary *G. omarorum* and the gregarious *B. gauderio*. In a previous study, we demonstrated that AVT induced a large and long-lasting increase of diurnal EOD rate in *B. gauderio*, with a magnitude and time course paralleled by the effect of AVT on PN firing rate in brainstem slices (Perrone et al., 2010). Although no persistent effects of AVT were observed on the diurnal EOD rate of *G. omarorum* (Perrone et al., 2010), in this study we identified a transient increase in diurnal EOD rate also paralleled by the effect of AVT on PN firing rate in brainstem slices. We therefore conclude that there are interspecific differences in the way AVT controls electric behavior, and that the PN is the likely target of these actions in both species. Moreover, as *in vitro* AVT effects mimic behavioral ones in both *G. omarorum* and *B. gauderio*, interspecific differences in this AVT-mediated electric behavior are likely to be explained, at least in part, by differences in the mechanisms of the neural control of PN activity and/or in the PN itself as effector of AVT modulatory inputs. In addition, we also confirmed the presence of hindbrain AVT projections close to the PN that might constitute the anatomical substrate for AVT influences on PN activity, and therefore on EOD rate.

Nonapeptide regulation of social behavior is a conserved feature in vertebrate evolution, particularly in teleosts, in which multiple studies have now demonstrated this assertion (recently reviewed in Godwin and Thompson, 2012; Thompson and Walton, 2013). Following Perrone et al. (2010), the behavioral experiments presented in this study were designed to breakdown the complexity of social scenarios in order to focus on the basic unit of electric behavior: the resting diurnal EOD rate of isolated non-breeding individuals. Moreover, based on the extensively documented sexual monomorphism of *G. omarorum* in diverse behavioral and pharmacological contexts (Ardanaz et al., 2001; Batista et al., 2012; Black-Cleworth, 1970; Curti et al., 2006; Silva et al., 2013;

Zubizarreta et al., 2012), we used both non-breeding males and females of this species that we assumed would behave equally. We thus searched for interspecific differences of AVT modulation on this elemental electromotor behavior as a core behavioral unit that might be relevant in shaping the sociality of these species.

Despite wide interindividual variations in EOD diurnal rate, we were able to demonstrate for the first time in *G. omarorum* a small but significant AVT-induced increase in EOD rate. This early (and short-term) increase in EOD rate remained unnoticed in a previous study that only focused on long-lasting (>60 min) AVT effects and that concluded that AVT did not affect EOD rate in *G. omarorum* (Perrone et al., 2010). Integrating data from previous and present studies, we can conclude that AVT modulation of this electric behavior is dramatically different across species in both magnitude and time course. An EOD rate increase of about 30% is observed in both species 10 min after AVT injection, it reaches about 70% and remains elevated for at least 120 min in *B. gauderio*, whereas in *G. omarorum* it is attenuated at 30 min and completely disappears after 60 min.

Sociality, in terms of group-size preferences, has been elegantly demonstrated to depend on distinctive spatio-temporal patterns of activation of the AVT system in estrildid finches (Goodson et al., 2012; Goodson and Kingsbury, 2011). We have previously reported differences in the AVT modulation of electric behavior between our two study species of electric fish, which show extremely different social organizations. For example, in agonistic contexts, dominant males of *B. gauderio* exhibit an AVT-dependent increase in their EOD rate after contest resolution (electrical dominance) that is not observed in *G. omarorum* (Silva et al., 2013). On the other hand, *B. gauderio* exhibits a persistent nocturnal increase in EOD rate that is only transiently observed in *G. omarorum* (Silva et al., 2013). During breeding, the nocturnal increase of EOD rate of *B. gauderio*

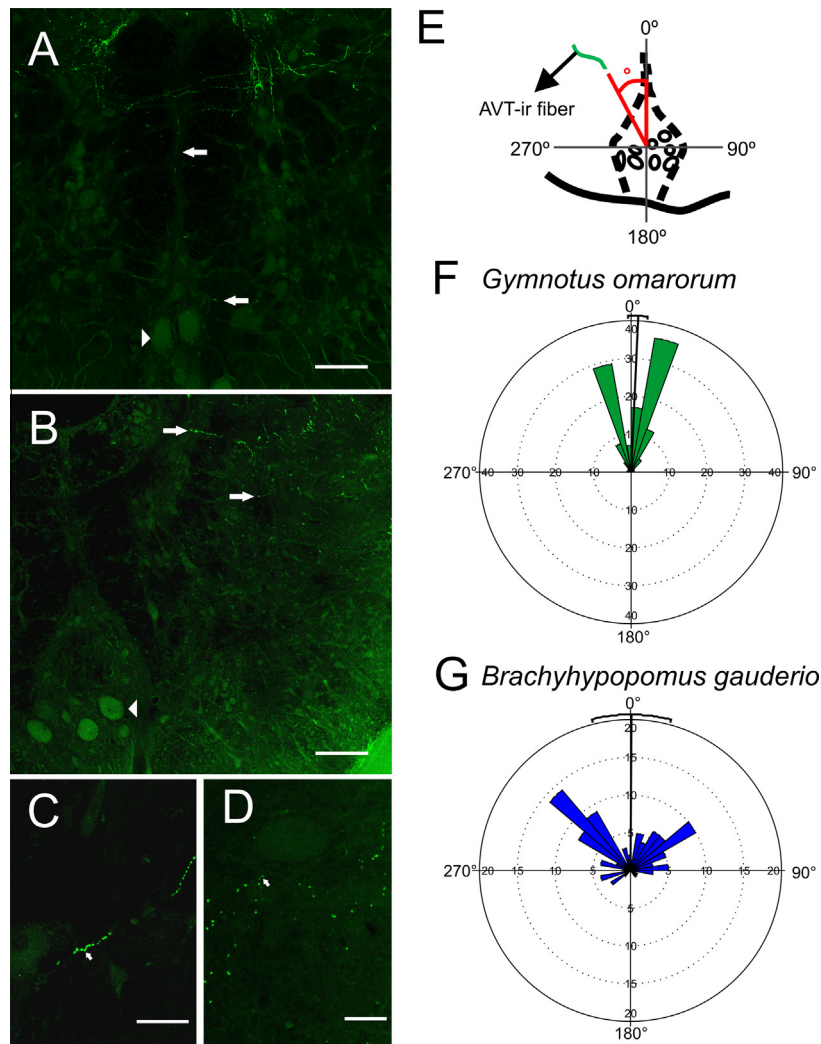


Fig. 4. AVT-ir fibers are present in the vicinity of the PN in *Gymnotus omarorum* and *Brachyhypopomus gauderio*. (A) Medullary transverse section containing the PN of a *G. omarorum* male (relay cell pointed by arrowhead). AVT-ir fibers (pointed by arrows) are dorsal to the PN and can be observed along the midline near the PN. (B) Medullary transverse section containing the PN of a *B. gauderio* male (relay cell pointed by arrowhead). AVT-ir fibers (pointed by arrows) are scattered in dorsal and lateral areas to the PN. AVT-ir fibers can be found in very close proximity to a relay cell in *G. omarorum* (C) as well as in *B. gauderio* (D). (E–G) Distribution pattern of AVT-ir fibers in medullary transverse sections containing the PN. (E) Drawing of the method used to determine the distribution pattern of AVT-ir fibers. Dorso-ventral and left-right midlines were traced as shown and the angles of the closest point of each AVT-ir fiber to the intersection of the midlines were measured as in the example illustrated for an AVT-ir fiber (green) at 328° angle (red). (F and G) Rose diagram representation of the angles of AVT-ir fibers in *G. omarorum* and *B. gauderio*, respectively. Calibration bars (A and B): 100 μm ; (C and D): 25 μm .

lasts beyond 2 h after sunset in social interaction (Silva et al., 2007), and this social component of the nocturnal increase of EOD rate is AVT-dependent (Perrone et al., 2010). The involvement of AVT in the transient nocturnal increase of EOD rate of *G. omarorum* has not been explored yet, but in the light of the results presented in this study, its role is likely to be different than the one reported in *B. gauderio*. The interspecific difference in AVT modulation of electric behavior presented in this study can also be interpreted as adaptively consistent with the differences in social structure between species. In *G. omarorum*, a solitary territorial species in which conspecifics rarely interact, it might be unnecessary to keep an energetically costly long-term modulation of electric behavior; while the gregarious *B. gauderio* probably needs more long-lasting modulations of electric signaling for its permanent social interactions.

4.1. Diverse control mechanisms of PN activity as the neural substrate of interspecific differences in AVT modulation of electric behavior

It has proven challenging to target specific brain regions of direct AVT influence in teleosts. To date, only few studies in

different fish species have identified the sites of AVT actions in several regions of descending motor output pathways including the hypothalamus, midbrain, and hindbrain (Goodson and Bass, 2000b; Perrone et al., 2010; Thompson et al., 2008). The PN, the command nucleus of the EOD and the ultimate effector of neuroendocrine influences and multiple descending projections, offers a direct window into the mechanisms underlying the rich repertoire of electric behaviors exhibited by weakly electric fish. In particular, in this study we have focused on the rhythm of the EOD, which can be considered itself as an electric behavior as it signals arousal, sex, and dominance-subordinate status (Hagedorn and Heiligenberg, 1985; Silva et al., 2007, 2002, 2013). From this perspective, we demonstrated that interspecific differences in AVT modulation of EOD rate between *G. omarorum* and *B. gauderio* result from species-specific actions of AVT on the PN. The administration of AVT in brainstem slices containing the PN mimics the behavioral effect of AVT: it produces a small and transient increase of the rate of the PN activity in *G. omarorum* (Fig. 2) vs a larger and persistent increase in *B. gauderio* (Perrone et al., 2010). In both species, MC injected prior to AVT prevented its actions in behavioral as well

as *in vitro* experiments (Perrone et al., 2010; Fig. 2), suggesting that AVT's modulation of EOD rate is mediated by V1a AVT receptors.

The time course of the accelerations of PN firing rate induced by AVT, i.e., their long latency, gradual onset and long-lasting effects, is consistent with a neuropeptidergic action (Van den Pol, 2012). Although G-protein triggered intracellular transduction mechanisms associated with V1a receptors activation have not yet been fully determined, experimental evidence indicate that activation of these receptors excites target neurons most likely by generating a slow and sustained cationic inward current ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) and/or by suppressing a resting K^+ conductance (Neumann and van den Burg, 2013; Raggenbass, 2008).

Two lines of evidence support the notion that during AVT modulations the normal sequence of cell activation (pacemaker-relay) was preserved, thus indicating that within the PN, pacemaker neurons are the likely target cells of AVT actions: (a) EOD accelerations induced by AVT *in vivo* occurred without changes in EOD waveform (data not shown), and (b) the absence of changes in the waveform of PN field potentials during AVT-induced increase in the PN discharge rate (Fig. 2B). Consistent with this interpretation, no changes in either the resting potential or the spike waveform were observed in intracellular relay cell recordings during AVT responses (data not shown).

Although AVT effects on PN activity can be reasonably explained by a direct excitatory effect of the peptide upon pacemaker cells within the PN, we cannot rule out AVT actions on local interneurons or presynaptic terminals contained in the brain stem slice. Demonstration of a depolarizing effect of AVT on pacemaker cells in the presence of TTX, together with the insensitivity of AVT-induced pacemaker-cell responses to receptor blockers for neurotransmitters known to be involved in the control of the PN activity (Glutamate-GABA), would provide additional evidence supporting a direct effect of AVT on pacemaker neurons.

A wealth of evidence indicates that most EOD modulations in gymnotiform electric fish involve descending projections to the PN arising from several pre-pacemaker structures located in the diencephalon, the mesencephalon, the octavolateral area and the caudal medulla (Comas and Borde, 2010; Dye and Meyer, 1986; Heiligenberg et al., 1981; Kawasaki and Heiligenberg, 1988; Kawasaki et al., 1988; Keller et al., 1991, 1990; Metzner, 1999; Zupanc and Heiligenberg, 1992). It is generally accepted that pre-pacemaker structures are fundamental integrative areas (Caputi et al., 2005) and are conceived as the neural interface between the electromotor system and higher centers involved in both sensory processing (Keller et al., 1991; Metzner, 1999; Wong, 1997; Zupanc and Horschke, 1996) and in the organization of particular motor outputs (Comas and Borde, 2010). Pre-pacemaker structures may also integrate inputs from additional higher central structures probably related with the organization of other adaptive modulations of electric behavior (Zupanc, 2002) and with electrocommunication (Giassi et al., 2012; Wong, 1997). Moreover, chirping activity in wave-type electric fish evoked by stimulation of the pre-optic area (where AVT neurons are located) seems to be modulated by diencephalic pre-pacemaker structures, as also suggested by retrograde labeling studies (Wong, 1997, 2000). *in vitro* demonstration of AVT effects on PN activity (Perrone et al., 2010; present study), expand the prevalent view of the neural control of electric behavior. These results indicate that not only pre-pacemaker networks but also the connections between pre-pacemaker structures and the PN, and even the PN itself may be under neuropeptidergic control. AVTergic projections, as other neuromodulatory pathways, would therefore impact directly on different levels of the CNS to shape the behavioral output in a species-, phenotype-, and context-dependent manner (Katz, 1995; Marder, 2012). In light of this new perspective, *in vivo* AVT-mediated modulation of chirping described in both wave- and pulse-type electric fish (Bastian

et al., 2001; Silva et al., 2013) probably involve the modulation of both pre-pacemaker structures and the PN.

Two main interspecific differences arise in PN responses to AVT: (a) the magnitude of the effect was stronger in *B. gauderio* than in *G. omarorum*, and (b) the time-course of AVT effect was strikingly different among species, long-lasting in *B. gauderio*, and short-term in *G. omarorum*. The attenuation of AVT effect observed in *G. omarorum* cannot be explained by desensitization of V1a receptors as successive AVT applications induced almost the same effect (Fig. 2A). Differences of the magnitude of AVT effect could be explained by differences in the number of AVT receptors in pacemaker cells and/or in the gain of intracellular transduction mechanisms. Pacemaker cells of both species may also differ in the expression of membrane conductances, putative targets of AVT actions, as well as in their relative impact on the rhythmic activity of pacemaker cells. Differences in the time course of responses, in turn, may also be a consequence of dissimilar intracellular transduction pathways and/or membrane effectors in pacemaker cells of both species. Identification of AVT receptors in pacemaker cells using specific antibodies is needed to confirm that, within the PN, pacemaker cells are direct targets of AVT effects.

Overall, we conclude that interspecific differences in the effector of neuropeptide actions, the PN and the surrounding local circuits that remain intact in a 400 μm -thick brainstem slice, are enough to explain the observed differences in the AVT-mediated electric behavior in between *G. omarorum* and *B. gauderio*.

4.2. Hindbrain AVT projections as putative anatomical substrate for AVT modulation of electric behavior

It is theoretically accepted that distinctive organizational patterns of AVT neurons are likely differentially developed in different species and also differentially activated in diverse social contexts, thus giving rise to the complex variety of behavioral actions of AVT across species and phenotypes (Thompson and Walton, 2013). Therefore, interspecific differences in AVT modulation of behavior are probably due to differential organization of AVT projections and/or differential distribution of AVT receptors (Goodson, 2008; Insel and Young, 2000). In this study, we focused on the identification of AVT projections towards the PN with the aim of detecting differences that could account for the distinctive way AVT modulates electric behavior between *G. omarorum* and *B. gauderio*. In the future, we plan to develop the molecular tools required to search for AVT receptors in these wild species in which available antibodies do not work.

This is the first study that identifies AVT neurons in weakly electric fish. As in other teleost species previously analyzed (Dewan et al., 2008; Maruska, 2009; Ramallo et al., 2011), preoptic AVT neurons were identified in both *G. omarorum* and *B. gauderio*. Preliminary results from ongoing research in our lab indicate that the 3 populations of AVT neurons (parvo, magno, and gigantocells) are as well identifiable in both species (Pouso and Silva, 2013). Hindbrain AVT fibers have also been described in other teleosts (Dewan et al., 2008; Maruska, 2009; Saito et al., 2004; Thompson and Walton, 2009). For example, in the midshipman, caudal projections of AVT fibers are found to contact the medullary command nucleus of social vocalizations in a phenotype-dependent manner (Goodson and Bass, 2000a,b). Therefore, the presence of AVT-ir fibers at the medullary level in close proximity to neurons of the PN in both studied species was expected. Behavioral and electrophysiological data of AVT modulation of electric behavior presented in this and previous reports (Perrone et al., 2010; Silva et al., 2013) also allowed us to predict the presence of AVT projections near the PN.

The existence of AVT fibers in the surroundings of the PN gives support to the speculation that AVT modulations of electric

behavior could be exerted by the release of AVT from neural projections contacting PN neurons in both species. As in other peptidergic neuromodulatory systems, AVT released from distant *en passant* AVT fibers may also be enough to activate high affinity receptors located on the surface of PN cells (Agnati et al., 2010; Fuxe et al., 2010). AVT-ir fibers were found in brainstem slices containing caudal, intermediate, and rostral portions of the PN, suggesting that AVT projections spread homogeneously along the rostro-caudal axis of the PN. In addition, AVT fibers were found in close proximity to the PN (150 μ m and 280 μ m for *G. omarorum* and *B. gauderio*, respectively). It has been demonstrated empirically (and also theoretically modeled), that focal release of neuropeptides in the CNS may affect the activity of target neurons located at similar (or even greater) distances from their source (Stoop, 2012).

AVT fibers found in the proximity of the PN appear distinctively distributed in each one of the studied species, suggesting the existence of interspecific differences in the AVTergic system. It is not obvious, though, how these differences in the distribution pattern of medullary AVT fibers give support to the behavioral and electrophysiological differences among species in AVT modulation of EOD rate presented in this study. For example, to match the differences in magnitude of the effect of AVT on EOD rate observed between *B. gauderio* and *G. omarorum*, quantitative differences in AVT-ir fibers approaching the PN were predicted (but not found) among species. However, these immunohistochemical data could reflect the differences observed between these same species in agonistic context (Silva et al., 2013). According to the theory proposed by Greenwood et al. (2008) and modified by Godwin and Thompson (2012), two subsystems of AVT neurons could act in a counterbalanced manner with gigantomagnocellular populations releasing AVT in circuits that stimulate courtship and/or aggressive behaviors, while parvocellular neurons most likely release AVT in circuits that induce behaviors related to social subordination, particularly social withdrawal. On the other hand, it has been reported that AVTergic projections run through different tracts in the CNS (Dewan et al., 2008; Saito et al., 2004). Despite the lack of a complete picture of how each population of AVTergic neurons projects to which tract in teleosts, the existence of different trajectories of AVT projections suggests that the fibers found in the proximity of the PN of each species could arrive from different populations of AVTergic neurons. Though this prediction is soon to be confirmed by retrograde labeling of AVT projections, it currently allows us to speculate that the differential pattern of medullary AVT-ir fibers among species is achieved by interspecific differences in the relative weight of gigantomagnocellular and parvocellular bundles of AVT fibers that approach the hindbrain following differently located pathways.

4.3. Final remarks

Behavioral, electrophysiological, and immunohistochemical evidences presented in this study point to the PN as the ultimate integrator of multiple higher influences that shape the instant-to-instant output of the electric behavior in terms of discharge rate. The PN can thus be seen as a hindbrain nucleus that not only acts as a central pattern generator, but also as a plastic integrator of diverse stimuli. However, the PN is neither a slave effector nor a simple follower of higher centers' influences, but a rather intrinsically complex nucleus with autonomy to exert its actions. It has been previously reported that the PN of *B. gauderio* intrinsically adapts its response to glutamate across sexes and seasons (Quintana et al., 2011a,b, 2014, this issue). We now add evidence that the PN itself, obviously in concert with the global neural modulation exerted by several neuromodulatory systems, can also be shaped as a differential effector of neuropeptide actions across spe-

cies. It is interesting to conceive the PN at the crossroads between a command nucleus and an effector, whose complexity is paralleled by the richness of its phenotypic and interspecific plasticity.

Author contributions

R.P. and A.S. conceived the study. All the authors participated in the experimental design, interpretation of the findings being published, writing of the manuscript, and approved the final manuscript. Behavioral and immunohistochemical experiments were carried out in the Unidad Bases Neuronales de la Conducta, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, under the supervision of A.S. *In vitro* experiments were carried out in the Laboratorio de Neurofisiología Celular y Sináptica, Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, under the supervision of M.B. Behavioral experiments were performed by R.P. and A.M., *in vitro* experiments by V.C. and A.M., and immunohistochemical experiments by R.P. and L.Q.

Acknowledgements

We thank Paula Pouso for her generous revision and suggestions to our manuscript. We are especially grateful to Ruud Buijs (Universidad Autónoma de Mexico) and to Matthew Grober (Georgia State University) who kindly donated the AVT antibody developed in their labs, and to Alejandro de Lorenzi and Matías Pandolfi for sharing and providing several of the aliquots used in this study. We thank Alejandro de Lorenzi for his generous training and help in the initial steps of immunohistochemistry techniques. We thank Federico Pedraja for his statistical counseling. This research was supported by ANII (FCE2007_569 and FCE_6180), CSIC UdelaR (I+D 2010_032), PDT (S/C/IF/54/090), and PEDECIBA.

References

- Agnati, L.F., Guidolin, D., Guescini, M., Genedani, S., Fuxe, K., 2010. Understanding wiring and volume transmission. *Brain Res. Rev.* 64, 137–159.
- Ardanaz, J., Silva, A., Macadar, O., 2001. Temperature sensitivity of the electric organ discharge waveform in *Gymnotus carapo*. *J. Comp. Physiol. A* 187, 853–864.
- Bastian, J., Schniederjan, S., Nguyenkim, J., 2001. Arginine vasotocin modulates a sexually dimorphic communication behavior in the weakly electric fish *Apteronotus leptorhynchus*. *J. Exp. Biol.* 204, 1909–1923.
- Batista, G., Zubizarreta, L., Perrone, R., Silva, A., 2012. Non-sex-biased dominance in a sexually monomorphic electric fish: fight structure and submissive electric signalling. *Ethology* 118, 398–410.
- Bennett, M.V., Pappas, G.D., Giménez, M., Nakajima, Y., 1967. Physiology and ultrastructure of electrotonic junctions. IV. Medullary electromotor nuclei in gymnotid fish. *J. Neurophysiol.* 30, 236–300.
- Black-Cleworth, P., 1970. The role of electrical discharges in the non-reproductive social behaviour of *Gymnotus carapo*. *Anim. Behav. Monogr.* 3, 1–77.
- Caputi, A., Carlson, B., Macadar, O., 2005. Electric organs and their control. In: Bullock, T.H., Hopkins, C.D., Popper, A.N., Fay, R.R. (Eds.), *Electroreception*. Springer, New York, pp. 410–451.
- Comas, V., Borde, M., 2010. Neural substrate of an increase in sensory sampling triggered by a motor command in a gymnotid fish. *J. Neurophysiol.* 104, 2147–2157.
- Curti, S., Comas, V., Rivero, C., Borde, M., 2006. Analysis of behavior-related excitatory inputs to a central pacemaker nucleus in a weakly electric fish. *Neuroscience* 140, 491–504.
- Dewan, A.K., Maruska, K.P., Tricas, T.C., 2008. Arginine vasotocin neuronal phenotypes among congeneric territorial and shoaling reef butterflyfishes: species, sex and reproductive season comparisons. *J. Neuroendocrinol.* 20, 1382–1394.
- Dewan, A.K., Ramey, M.L., Tricas, T.C., 2011. Arginine vasotocin neuronal phenotypes, telencephalic fiber varicosities, and social behavior in butterflyfishes (Chaetodontidae): potential similarities to birds and mammals. *Horm. Behav.* 59, 56–66.
- Dye, J.C., Meyer, J.H., 1986. Central control of the electric organ discharge in weakly electric fish. In: *Electroreception*. Wiley, New York, pp. 1–102.
- Fuxe, K., Dahlström, A.B., Jonsson, G., Marcellino, D., Guescini, M., Dam, M., Manger, P., Agnati, L., 2010. The discovery of central monoamine neurons gave volume transmission to the wired brain. *Prog. Neurobiol.* 90, 82–100.
- Giassi, A.C.C., Duarte, T.T., Ellis, W., Maler, L., 2012. Organization of the gymnotiform fish pallium in relation to learning and memory: II. Extrinsic connections. *J. Comp. Neurol.* 520, 3338–3368.

- Giora, J., Malabarba, L.R., 2009. *Brachyhypopomus gauderio*, new species, a new example of underestimated species diversity of electric fishes in the southern South America (Gymnotiformes: Hypopomidae). *Zootaxa* 2093, 60–68.
- Godwin, J., Thompson, R., 2012. Nonapeptides and social behavior in fishes. *Horm. Behav.* 61, 230–238.
- Goodson, J.L., 2008. Nonapeptides and the evolutionary patterning of sociality. *Prog. Brain Res.* 170, 3–15.
- Goodson, J.L., Bass, A.H., 2000a. Forebrain peptides modulate sexually polymorphic vocal circuitry. *Nature* 403, 769–772.
- Goodson, J.L., Bass, A.H., 2000b. Vasotocin innervation and modulation of vocal-acoustic circuitry in the teleost *Porichthys notatus*. *J. Comp. Neurol.* 422, 363–379.
- Goodson, J.L., Bass, A.H., 2001. Social behavior functions and related anatomical characteristics of vasotocin/vasopressin systems in vertebrates. *Brain Res. Rev.* 35, 246–265.
- Goodson, J.L., Kingsbury, M.A., 2011. Nonapeptides and the evolution of social group sizes in birds. *Front. Neuroanat.* 5, 1–12.
- Goodson, J.L., Kelly, A.M., Kingsbury, M.A., 2012. Evolving nonapeptide mechanisms of gregariousness and social diversity in birds. *Horm. Behav.* 61, 239–250.
- Greenwood, A.K., Wark, A.R., Fernald, R.D., Hofmann, H.A., 2008. Expression of arginine vasotocin in distinct preoptic regions is associated with dominant and subordinate behaviour in an African cichlid fish. *Proc. R. Soc. B* 275, 2393–2402.
- Hagedorn, M., Heiligenberg, W., 1985. Court and spark: electric signals in the courtship and mating of gymnotoid fish. *Anim. Behav.* 33, 254–265.
- Heiligenberg, W., Finger, T., Matsubara, J., Carr, C., 1981. Input to the medullary pacemaker nucleus in the weakly electric fish, *Eigenmannia* (sternopygidae, gymnotiformes). *Brain Res.* 211, 418–423.
- Insel, T.R., Young, L.J., 2000. Neuropeptides and the evolution of social behavior. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 784–789.
- Katz, P.S., 1995. Intrinsic and extrinsic neuromodulation of motor circuits. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5, 799–808.
- Kawasaki, M., Heiligenberg, W., 1988. Individual prepacemaker neurons can modulate the pacemaker cycle of the gymnotiform electric fish, *Eigenmannia*. *J. Comp. Physiol. A* 162, 13–21.
- Kawasaki, M., Heiligenberg, W., 1989. Distinct mechanisms of modulation in a neuronal oscillator generate different social signals in the electric fish *Hypopomus*. *J. Comp. Physiol. A* 165, 731–741.
- Kawasaki, M., Heiligenberg, W., 1990. Different classes of glutamate receptors and GABA mediate distinct modulations of a neuronal oscillator, the medullary pacemaker of a gymnotiform electric fish. *J. Neurosci.* 10, 3896–3904.
- Kawasaki, M., Maler, L., Rose, G.J., Heiligenberg, W., 1988. Anatomical and functional organization of the prepacemaker nucleus in gymnotiform electric fish: the accommodation of two behaviors in one nucleus. *J. Comp. Neurol.* 276, 113–131.
- Keller, C.H., Maler, L., Heiligenberg, W., 1990. Structural and functional organization of a diencephalic sensory-motor interface in the gymnotiform fish, *Eigenmannia*. *J. Comp. Neurol.* 293, 347–376.
- Keller, C.H., Kawasaki, M., Heiligenberg, W., 1991. The control of pacemaker modulations for social communication in the weakly electric fish *Sternopygus*. *J. Comp. Physiol. A* 169, 441–450.
- Lorenzo, D., Silva, A., Macadar, O., 2006. Electrocommunication in Gymnotiformes: jamming avoidance and social signals during courtship. In: Kapoor, B.G., Ladich, F., Collin, S.P., Moller, P. (Eds.), *Communications in Fishes*. Science Publishers, Enfield, NH, pp. 753–779.
- Marder, E., 2012. Neuromodulation of neuronal circuits: back to the future. *Neuron* 76, 1–11.
- Maruska, K.P., 2009. Sex and temporal variations of the vasotocin neuronal system in the damselfish brain. *Gen. Comp. Endocrinol.* 160, 194–204.
- Metzner, W., 1999. Neural circuitry for communication and jamming avoidance in gymnotiform electric fish. *J. Exp. Biol.* 202, 1365–1375.
- Miranda, M., Silva, A., Stoddard, P., 2008. Use of space as an indicator of social behavior and breeding systems in the gymnotiform electric fish *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. *Environ. Biol. Fishes* 83, 379–389.
- Neumann, I.D., van den Burg, E.H., 2013. Oxytocin and vasopressin release and their receptor-mediated intracellular pathways that determine their behavioral effects. In: Choleris, E., Kavaliers, M., Pfaff, D.W. (Eds.), *Oxytocin, Vasopressin, and Related Peptides in the Regulation of Behavior*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 57–82.
- Perrone, R., Macadar, O., Silva, A., 2009. Social electric signals in freely moving dyads of *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. *J. Comp. Physiol. A Sens. Neural Behav. Physiol.* 195, 501–514.
- Perrone, R., Batista, G., Lorenzo, D., Macadar, O., Silva, A., 2010. Vasotocin actions on electric behavior: interspecific, seasonal, and social context-dependent differences. *Front. Behav. Neurosci.* 4.
- Pouso, P., Silva, A., 2013. Social behavior network activation in the courtship of a weakly pulse-type electric fish. In: Brain, B.A.E. (Ed.), *The 33rd Annual Meeting of the J.B. Johnston Club for Evolutionary Neuroscience and the 25th Annual Karger Workshop in Evolutionary Neuroscience*. Karger, San Diego, p. 255.
- Pouso, P., Quintana, L., Bolatto, C., Silva, A.C., 2010. Brain androgen receptor expression correlates with seasonal changes in the behavior of a weakly electric fish, *Brachyhypopomus gauderio*. *Horm. Behav.* 58, 729–736.
- Quintana, L., Pouso, P., Fabbiani, G., Macadar, O., 2011a. A central pacemaker that underlies the production of seasonal and sexually dimorphic social signals: anatomical and electrophysiological aspects. *J. Comp. Physiol. A* 197, 75–88.
- Quintana, L., Sierra, F., Silva, A., Macadar, O., 2011b. A central pacemaker that underlies the production of seasonal and sexually dimorphic social signals: functional aspects revealed by glutamate stimulation. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.* 197, 211–225.
- Quintana, L., Harvey-Girard, E., Lescano, C., Macadar, O., Lorenzo, D., 2014. Sex-specific role of a glutamate receptor subtype in a pacemaker nucleus controlling electric behavior. *J. Physiol.* - Paris. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.04.004>.
- Raggenbass, M., 2008. Overview of cellular electrophysiological actions of vasopressin. *Eur. J. Pharmacol.* 583, 243–254.
- Ramallo, M.R., Grober, M., Cánepa, M.M., Morandini, L., Pandolfi, M., 2011. Arginine-vasotocin expression and participation in reproduction and social behavior in males of the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 179, 221–231.
- Richer-de-Forges, M.M., Crampton, W.G.R., Albert, J.S., 2009. A new species of *Gymnotus* (Gymnotiformes, Gymnotidae) from Uruguay: description of a model species in neurophysiological research. *Copeia* 2009, 538–544.
- Saito, D., Komatsuda, M., Urano, A., 2004. Functional organization of preoptic vasotocin and isotocin neurons in the brain of rainbow trout: central and neurohypophysial projections of single neurons. *Neuroscience* 124, 973–984.
- Silva, A., Quintana, L., Ardanaz, J.L., Macadar, O., 2002. Environmental and hormonal influences upon EOD waveform in gymnotiform pulse fish. *J. Physiol.* - Paris 96, 473–484.
- Silva, A., Quintana, L., Galeano, M., Errandonea, P., 2003. Biogeography and breeding in Gymnotiformes from Uruguay. *Environ. Biol. Fishes* 66, 329–338.
- Silva, A., Perrone, R., Macadar, O., 2007. Environmental, seasonal, and social modulations of basal activity in a weakly electric fish. *Physiol. Behav.* 90, 525–536.
- Silva, A.C., Perrone, R., Zubizarreta, L., Batista, G., Stoddard, P.K., 2013. Neuromodulation of the agonistic behavior in two species of weakly electric fish that display different types of aggression. *J. Exp. Biol.* 216, 2412–2420.
- Stoddard, P.K., 2002. The evolutionary origins of electric signal complexity. *J. Physiol.* - Paris 96, 485–491.
- Stoop, R., 2012. Neuromodulation by oxytocin and vasopressin. *Neuron* 76, 142–159.
- Thompson, R.R., Walton, J.C., 2009. Vasotocin immunoreactivity in goldfish brains: characterizing primitive circuits associated with social regulation. *Brain Behav. Evol.* 73, 153–164.
- Thompson, R.R., Walton, J.C., 2013. Social regulatory functions of vasotocin and isotocin in fish. In: Choleris, E., Pfaff, D.W., Kavaliers, M. (Eds.), *Oxytocin, Vasopressin, and Related Peptides in the Regulation of Behavior*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 124–154.
- Thompson, R.R., Walton, J.C., Bhalla, R., George, K.C., Beth, E.H., 2008. A primitive social circuit: vasotocin–substance P interactions modulate social behavior through a peripheral feedback mechanism in goldfish. *Eur. J. Neurosci.* 27, 2285–2293.
- Trujillo-Cenóz, O., Lorenzo, D., Bertolotto, C., 1993. Identification of neuronal types in the medullary electromotor nucleus of *Gymnotus carapo*. *J. Comp. Physiol. A* 173, 750.
- Van den Pol, A.N., 2012. Neuropeptide transmission in brain circuits. *Neuron* 76, 98–115.
- Wong, C.J., 1997. Connections of the basal forebrain of the weakly electric fish, *Eigenmannia virens*. *J. Comp. Neurol.* 389, 49–64.
- Wong, C.J.H., 2000. Electrical stimulation of the preoptic area in *Eigenmannia*: evoked interruptions in the electric organ discharge. *J. Comp. Physiol. A* 186, 81–93.
- Young, L.J., Winslow, J.T., Nilsen, R., Insel, T.R., 1997. Species differences in V1a receptor gene expression in monogamous and nonmonogamous voles: behavioral consequences. *Behav. Neurosci.* 111, 599–605.
- Zubizarreta, L., Perrone, R., Stoddard, P.K., Costa, G., Silva, A., 2012. Differential serotonergic modulation of two types of aggression in weakly electric fish. *Front. Behav. Neurosci.* 6, 99–999.
- Zupanc, G.K.H., 2002. From oscillators to modulators: behavioral and neural control of modulations of the electric organ discharge in the gymnotiform fish, *Apterontus leptorhynchus*. *J. Physiol.* - Paris 96, 459–472.
- Zupanc, G.K.H., Heiligenberg, W., 1992. The structure of the diencephalic prepacemaker nucleus revisited: light microscopic and ultrastructural studies. *J. Comp. Neurol.* 323, 558–569.
- Zupanc, G.K.H., Horschke, I., 1996. Tectal input to the central posterior/prepacemaker nucleus of weakly electric fish, *Apterontus leptorhynchus*: an in vitro tract-tracing study. *Brain Res.* 739, 201–209.

Melatonin Regulates Daily Variations in Electric Behavior Arousal in Two Species of Weakly Electric Fish with Different Social Structures

Adriana Migliaro Ana Silva

Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Ciencias, UdelaR, and Unidad Bases Neurales de la Conducta, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, MEC, Montevideo, Uruguay

Key Words

Melatonin · Sociality · Behavior · Circadian rhythms · Nocturnality · Vasotocin · Electric fish · *Gymnotus omarorum* · *Brachyhyppopomus gauderio*

Abstract

Timing is crucial for social interactions. Animal behavior is synchronized with biotic and abiotic environment variables ensuring that the activity phase of conspecifics occurs during the same period of the day. As biological rhythms are embedded in the complex integrative control of the brain, it is fundamental to explore its interaction with environmental and social factors. This approach will unravel the link between external stimuli carrying information on environmental cycles and the neural commands for behavior, including social behavior, associated with precise phases of those cycles. Arousal in the solitary *Gymnotus omarorum* and in the gregarious *Brachyhyppopomus gauderio* is characterized by a nocturnal increase in the basal discharge rate of electric behavior, which is mild and transient in *G. omarorum* and large and persistent in *B. gauderio*. In this study, we show that the major integrator of social behavior, AVT (arginine vasotocin), is not involved in the nocturnal increase of electric behavior basal rate in isolated animals of either species. On the other

hand, endogenous melatonin, the major modulator of the circadian system, is responsible for the nocturnal increase in electric behavior in isolated individuals of both species.

© 2016 S. Karger AG, Basel

Introduction

Animals synchronize their behavior with biotic and abiotic variables in their environment. This challenge is met by means of a circadian system, an endogenous biological clock entrained by environmental cues that sets the timing of both physiological processes and behaviors. In addition, biological rhythms are embedded in the complex integrative control of the brain, therefore interacting with physiological processes and social stimuli. Rather than dissecting the role of the master clock, a line of current research is focused on how the clock interacts with the social brain and in different species with different social systems [Kronfeld-Schor et al., 2013]. Our approach to the study of biological rhythms aims to contribute to understanding the action of the clock in the real world, thus seeking models that are suitable for field studies and pharmacological modulations, as well as meaningful interspecific comparisons.

Nocturnal fish of the South American order Gymnotiformes are characterized by the emission of species-specific weak electric discharges that serve electrosensory and electrocommunication purposes [Lissmann, 1958; Stoddard, 2002]. Two gymnotiform species, *Gymnotus omarorum* [Richer-de-Forges et al., 2009] and *Brachyhypopomus gauderio* [Giora and Malabarba, 2009], are excellent model systems for the study of the modulation of the biological clock by social and environmental interactions. These species cohabit Uruguayan freshwater habitats at the southern boundary of the gymnotiform distribution in South America (30–35° S) [Silva et al., 2013] but have different social structures. *B. gauderio* is gregarious with a spatial organization in the wild consistent with an exploded lek polygamous mating system [Miranda et al., 2008], while *G. omarorum* is solitary, exhibits high-site fidelity and shows neighbor intolerance consistent with territoriality [Zubizarreta, pers. commun.]. Both species exhibit a typical electric behavior consisting of pulse discharges (the ‘electric organ discharge’; EOD) emitted continuously by a specialized electric organ. A medullary pacemaker nucleus (PN) commands the EOD basal rate (EOD-BR) [Bennett et al., 1967] and receives central influences that modulate the EOD-BR to produce transient rate changes known as social electric signals [Stoddard, 2002]. The EOD is itself a behavioral display that encodes information (in waveform and frequency domains) about an individual’s species identity, sex and physiological state [Caputi et al., 2005]. In addition, the EOD is the physical carrier of perceptually relevant sensory information [Aguilera et al., 2001]. Hence, an increase in EOD-BR implies an enhancement of an individual’s perceptual resolution.

Nocturnal arousal in weakly electric fish is conveyed by electric traits. A nocturnal increase in EOD-BR has been described in several species of gymnotiform weakly electric fish [Engler and Zupanc, 2001; Silva et al., 2007; Stoddard et al., 2007]. In *Brachyhypopomus pinnicaudatus*, day-night modulations of EOD waveform (amplitude and duration) and rate have been studied extensively and described as circadian rhythms because the oscillations were maintained in free-running conditions in a social context [Stoddard et al., 2007]. On the other hand, nocturnal changes reported in the EOD-BR of *B. gauderio* varied according to season and social context [Silva et al., 2007; Perrone et al., 2010]. Nocturnal changes in the electric behavior of *G. omarorum* have not yet been explored.

Social behavior in vertebrates is modulated by the hypothalamic neuropeptide AVT (arginine vasotocin) or its mammalian homologue vasopressin. Their actions inte-

grate environmental and internal cues to coordinate complex species-, sex- and phenotype-dependent behavioral changes that have been described across vertebrate taxa [Goodson, 2008; Thompson and Walton, 2009; Boyd, 2013; Freeman and Young, 2013; Goodson and Kingsbury, 2013]. Previous studies in electric fish revealed a differential effect of AVT on the electric behavior of *G. omarorum* and *B. gauderio*. In freely behaving, non-breeding adults, AVT induces a large prolonged increase in EOD-BR during the day in *B. gauderio*, but only a transient small effect in *G. omarorum* [Perrone et al., 2010, 2014]. In addition, AVT regulates the socially dependent modulation of electric behavior in *B. gauderio*. For example, the enhanced nocturnal increase of EOD-BR in breeding animals during social interaction is abolished by an AVT antagonist (Manning compound; MC) [Perrone et al., 2010].

Daily changes in behavior depend on both the retina and other photosensitive structures that detect environmental information, and on circadian oscillators that generate an endogenous circadian rhythm. The photoperiod, the most conspicuous environmental clue, is encoded in the nervous system through the nocturnal pulse of the hormone melatonin. Melatonin and melatonin-producing organs, such as the pineal gland and the retina, play a central role in the circadian rhythms of fish and their entrainment to changing environments [Zhdanova and Reeb, 2006; Lima-Cabello et al., 2014]. Virtually all circadian oscillations in fish are modulated by melatonin, which is conceived as the time-keeping hormone [Falcon et al., 2010]. Documenting changes in melatonin levels and their effects has provided important data on the physiology of the circadian clock [Zhdanova and Tucci, 2003]. The circadian system in fish follows the same general design as in other vertebrates. However, the supra-chiasmatic nucleus plays a principal role in mammals, whereas circadian regulation in teleost fish is characterized by a distributed network of central and peripheral circadian oscillators and numerous circadian clock genes [Zhdanova and Reeb, 2006]. Although the circadian system of weakly electric fish has not yet been fully characterized, the melatonergic modulation of electromotor behavior can be used to reveal the circadian nature of the nocturnal increase in EOD-BR.

Our long-term goal is to contribute to the understanding of the circadian system as embedded in the social modulation of the brain. In this study, we compare the acute day-night change of the basic unit of electric behavior, the EOD-BR, between two species with a different social organization (*G. omarorum* and *B. gauderio*). We

found interspecific differences in the amplitude and dynamics of the nocturnal increase of EOD-BR. We further explored whether the AVTergic and/or the melatoninergic systems were involved in the nocturnal increase of EOD-BR and in its interspecific differences. Though previous reports indicate that AVT distinctively affects the EOD-BR between these species, we found that AVT is not involved in its nocturnal increase. By contrast, the nocturnal increase of EOD-BR of both species was abolished after the administration of the melatonin antagonist luzindole (LUZ), suggesting that endogenous melatonin regulates the nocturnal arousal of electric behavior regardless of its species-specific amplitude and dynamics.

Materials and Methods

Animals

Adult *B. gauderio* [Giora and Malabarba, 2009] and *G. omarorum* [Richer-de-Forges et al., 2009] were located in natural populations using a 'fish detector', an electronic audio amplifier connected to a pair of electrodes [Silva et al., 2003]. *B. gauderio* were collected from Laguna Lavalle (31°48' S, 55°13' W; Tacuarembó, Uruguay), and *G. omarorum* were collected from Laguna del Sauce (34°51' S, 55°07' W; Maldonado, Uruguay). In accordance with their different social structures [Perrone et al., 2010], *G. omarorum* were housed in individual compartments within 500-liter outdoor tanks, whereas *B. gauderio* were housed in social groups with the sex ratio of natural breeding colonies containing 3 females per male [Miranda et al., 2008]. The fish were fed *Tubifex tubifex* ad libitum. The collection, transportation, housing and recording conditions were adjusted to minimize stress to the animals. All research procedures complied with ASAP/ABS Guidelines for the Use of Animals in Research and were approved by the Institutional Ethical Committee (Comisión de Ética en el Uso de Animales, Instituto Clemente Estable, MEC, 07-28-2008 and 007/02/2010).

Behavioral Experiments

Behavioral experiments were designed to test the effect of environmental darkness on EOD-BR in two species with different social structures. To break down the complexity of social and hormonal scenarios, we focused on isolated nonbreeding adults of both species. Given that the nocturnal increase in EOD-BR in *B. gauderio* [Silva et al., 2007] is independent of social context only during the first hour of darkness (but not after), we restricted our analysis to this time window to avoid a later decrease in EOD-BR due to isolation.

Individual fish were placed in an experimental setup (40-liter glass tanks, inside a recording chamber) that allowed electric recordings as described elsewhere [Silva et al., 2007]. Fish were kept in the tanks with a 12:12 h light-dark cycle at a constant temperature (20–22°C) for 2 days before testing. Experiments were conducted during the nonbreeding season in the peri-equinox period, when the natural light-dark cycle is also 12:12 h. EODs were continuously recorded from 60 min before to 60 min after artificial sunset (lights off), which was synchronized with the natural sunset time. The EODs of freely moving fish were recorded through two

pairs of fixed electrodes, connected to two high-input impedance amplifiers (FLA-01; Cygnus Technologies Inc.). Electric signals were captured by an audio card (Encore Electronics, ENM 232-8VIA) at 8,000 Hz, and stored in a computer for subsequent analysis.

We took 10 s of EOD recordings every 5 min (from 60 min before to 60 min after artificial sunset), and calculated the mean EOD interval in each sample using Clampfit (Axon, 10.0.0.61). This interval was converted to frequency and represented the EOD-BR. Since the nocturnal increase in EOD-BR has a species-specific pattern [Silva et al., 2013], we selected the EOD-BR mean value at the moment of maximum increase to compare between species and pharmacological treatments. Analysis was conducted at 10 min after sunset (for *G. omarorum*) and 60 min after sunset (for *B. gauderio*). We calculated an EOD-BR index (EOD-BR_{in}) relative to the EOD-BR of each individual fish 60 min before sunset (–60) to account for differences between the values of EOD-BR at any given time (t):

$$\text{EOD-BR}_{in} = [(\text{EOD-BR}_t - \text{EOD-BR}_{-60})/\text{EOD-BR}_{-60}].$$

Pharmacological Experiments

AVTergic System

Following Perrone et al. [2010], we compared the effects of the AVT antagonist, MC (2 µg/g body weight, intraperitoneally; IP), and saline controls (equivalent volumes of saline solution; NaCl, 0.9%, IP) on EOD-BR in freely moving isolated *B. gauderio* (n = 6) and *G. omarorum* (n = 6). MC ([Pmp1,Tyr(OMe)2,Arg8] vasopressin) was purchased from American Peptide Company. The dose and administration procedure have been reported to reduce AVT effects on electric behavior effectively [Perrone et al., 2010]. Fish were injected 30 min before sunset and daytime control EOD-BR was recorded 60 min before sunset. To rule out treatment influences on EOD-BR not related to environmental darkness, we included the values of EOD-BR measured 10 min before sunset (–10), when the animals had been injected but lights were still on. During the dark phase the effect of MC was measured at the moment of maximum increase for each species: 10 min after sunset (for *G. omarorum*) and 60 min after sunset (for *B. gauderio*). The amplitude of the effect of MC treatment was quantified as the EOD-BR_{in}, as explained above.

Melatoninergic System

We compared the nocturnal changes of EOD-BR in freely moving isolated fish (*B. gauderio*, n = 6, and *G. omarorum*, n = 6) after treatment with the melatonin antagonist LUZ (*N*-acetyl-2-benzyltryptamine, *N*-[2-(2-[phenylmethyl]-1*H*-indol-3-yl)ethyl]acetamide; 2 µg/g body weight, IP; Sigma) with EOD-BR values measured for the same fish during the previous night. EOD-BR values obtained for treated fish were also compared with values obtained in fish injected with saline (n = 6, equivalent volumes of saline solution, NaCl, 0.9%, IP). All fish were injected 30 min before sunset. As mentioned above, EOD-BR was measured 60 and 10 min before artificial sunset, and 10 min (*G. omarorum*) and 60 min (*B. gauderio*) after artificial sunset. The amplitude of the effect of treatment was quantified as EOD-BR_{in}, calculated as previously explained.

Statistical Analyses

As the data were not distributed normally, analysis was performed using the nonparametric Wilcoxon matched-pairs, Fried-

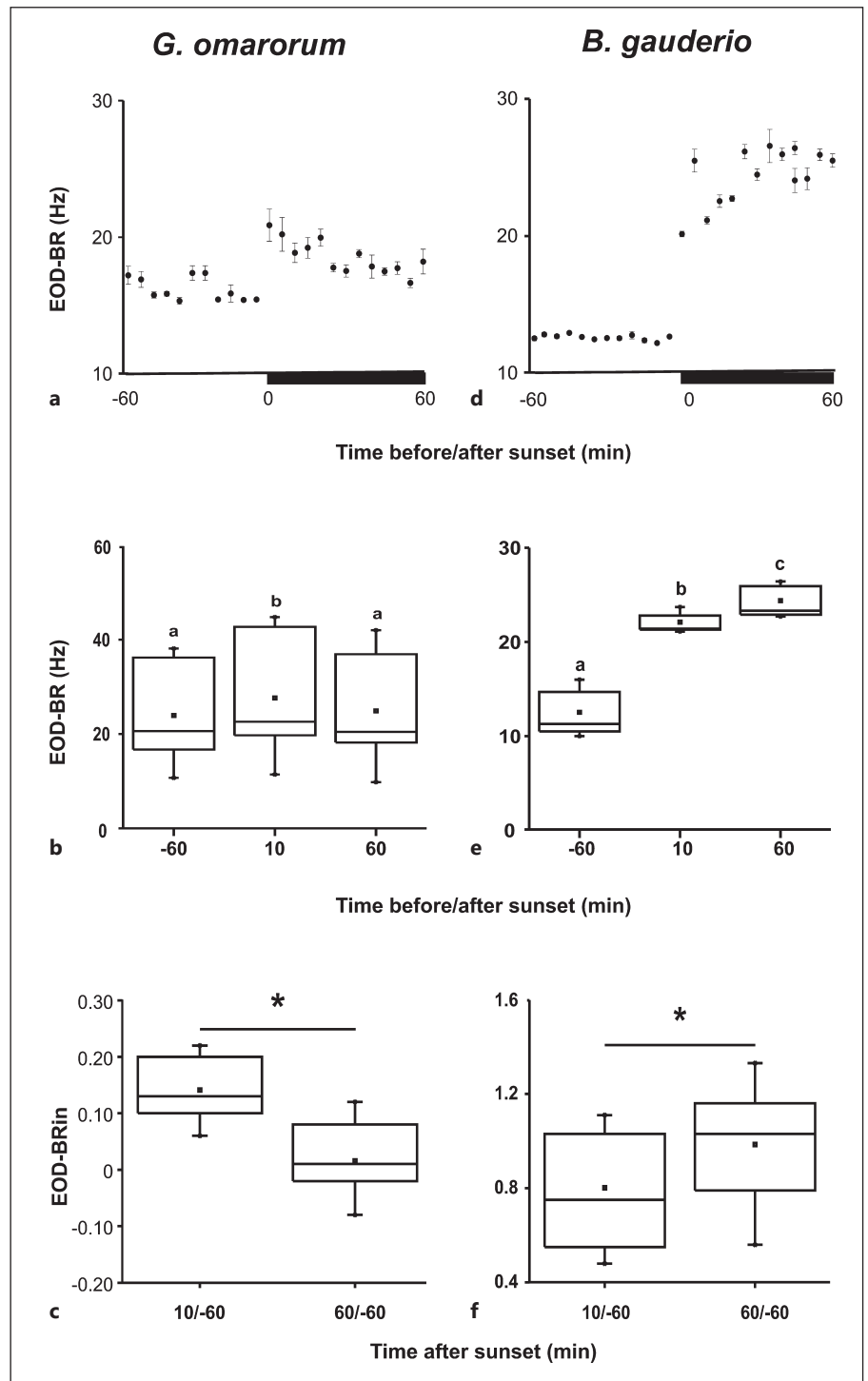


Fig. 1. Analysis of the dynamics of the nocturnal increase of EOD-BR. Day-night EOD-BR (mean \pm SD) recorded 60 min before and 60 min after sunset (sunset at 0) in isolated nonbreeding adult *G. omarorum* (a) and *B. gauderio* (d). Temporal change of the nocturnal increase of EOD-BR in *G. omarorum* (b; $n = 9$), and in *B. gauderio* (e; $n = 6$). Box plots show EOD-BR at 60 min before sunset (-60), and 10 and 60 min after sunset (10, 60). The letters above each box indicate statistical difference or lack of it (Wilcoxon's matched-pairs test following Friedman's test, $p \leq 0.001$). EOD-BRin at 10 and 60 min after sunset were compared for *G. omarorum* (c; Wilcoxon's matched-pairs test, * $p < 0.001$) and *B. gauderio* (f; Wilcoxon's matched-pairs test, * $p < 0.05$).

man and Mann-Whitney U statistical tests. For this reason, data are expressed as the median \pm median absolute deviation throughout, and represented in figures 1–3 using box plots.

We compared our data in two main ways:

(a) Paired variables in the same fish. Changes in the EOD-BR of untreated fish around sunset were compared using Friedman's

test (-60 vs. 10 vs. 60 ; $n = 9$, *G. omarorum*, $n = 6$, *B. gauderio*; fig. 1b, e). Changes in the EOD-BR of treated fish around sunset were likewise compared by the Friedman's test (-60 vs. -10 vs. 10 vs. 60 ; $n = 6$, *G. omarorum*, $n = 6$, *B. gauderio*; fig. 2b, e, 3b, e). EOD-BRin of the same fish were compared by Wilcoxon's matched-pairs test (fig. 1c, f). EOD-BRin of LUZ-treated fish were compared to EOD-

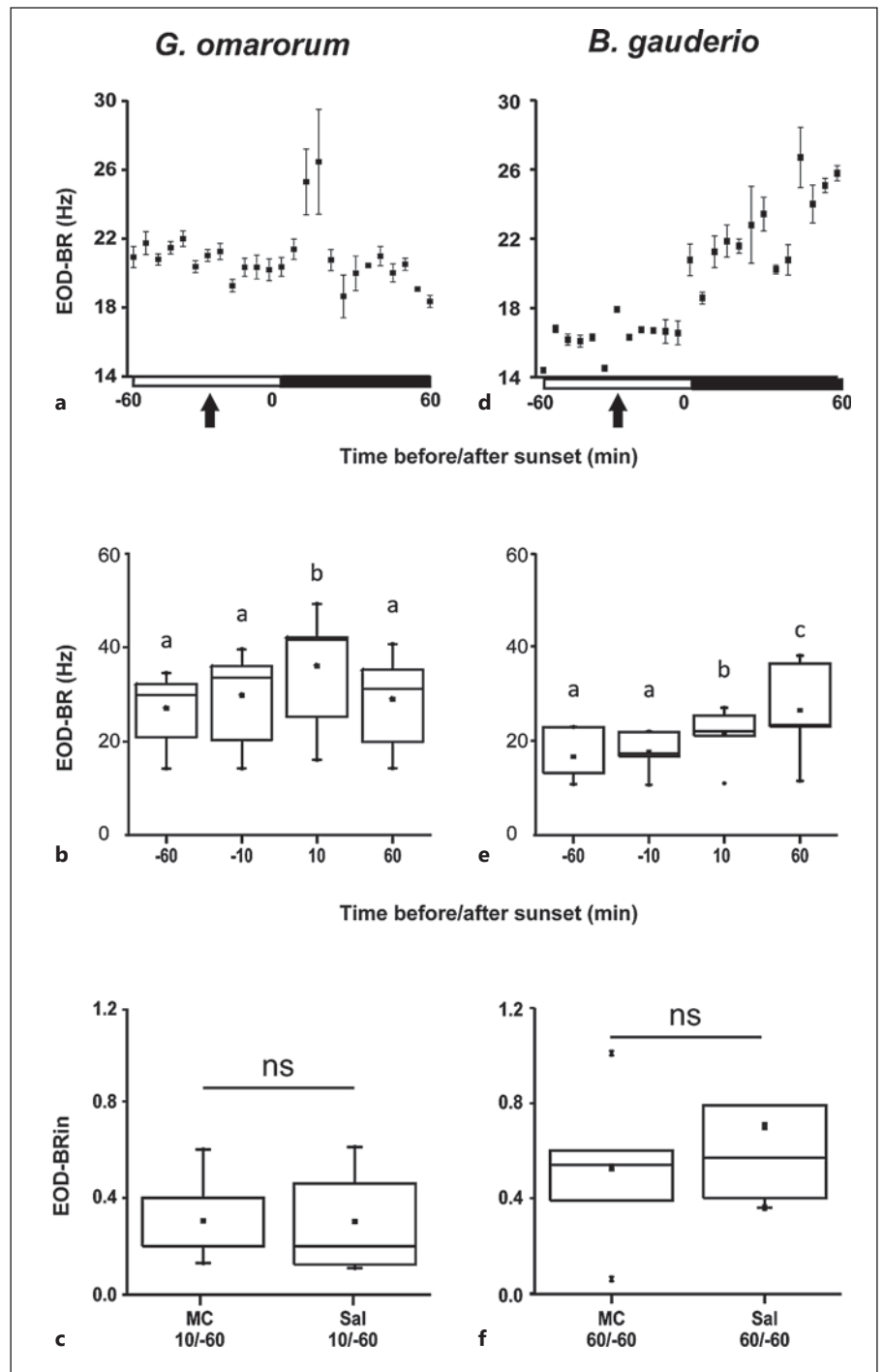


Fig. 2. Effect of the AVT antagonist MC on the nocturnal increase of EOD-BR. Day-night EOD-BR (mean \pm SD) recorded 60 min before and 60 min after sunset (sunset at 0) in isolated nonbreeding adults treated with MC 30 min before sunset (arrows) in *G. omarorum* (a) and *B. gauderio* (d). Temporal changes of the nocturnal increase of EOD-BR in MC-treated *G. omarorum* (b; $n = 6$) and in *B. gauderio* (e; $n = 6$). Box plots show EOD-BR at 60 and 10 min before sunset (-60, -10), and 10 and 60 min after sunset (10, 60). The letters above each box indicate statistical difference or lack of it (Wilcoxon's matched-pairs test following Friedman's test, $p < 0.001$). EOD-BRin was compared between saline and MC-treated fish in *G. omarorum* (c; 10/-60) and *B. gauderio* (f; 60/-60, Mann-Whitney U test). ns = Not statistically different.

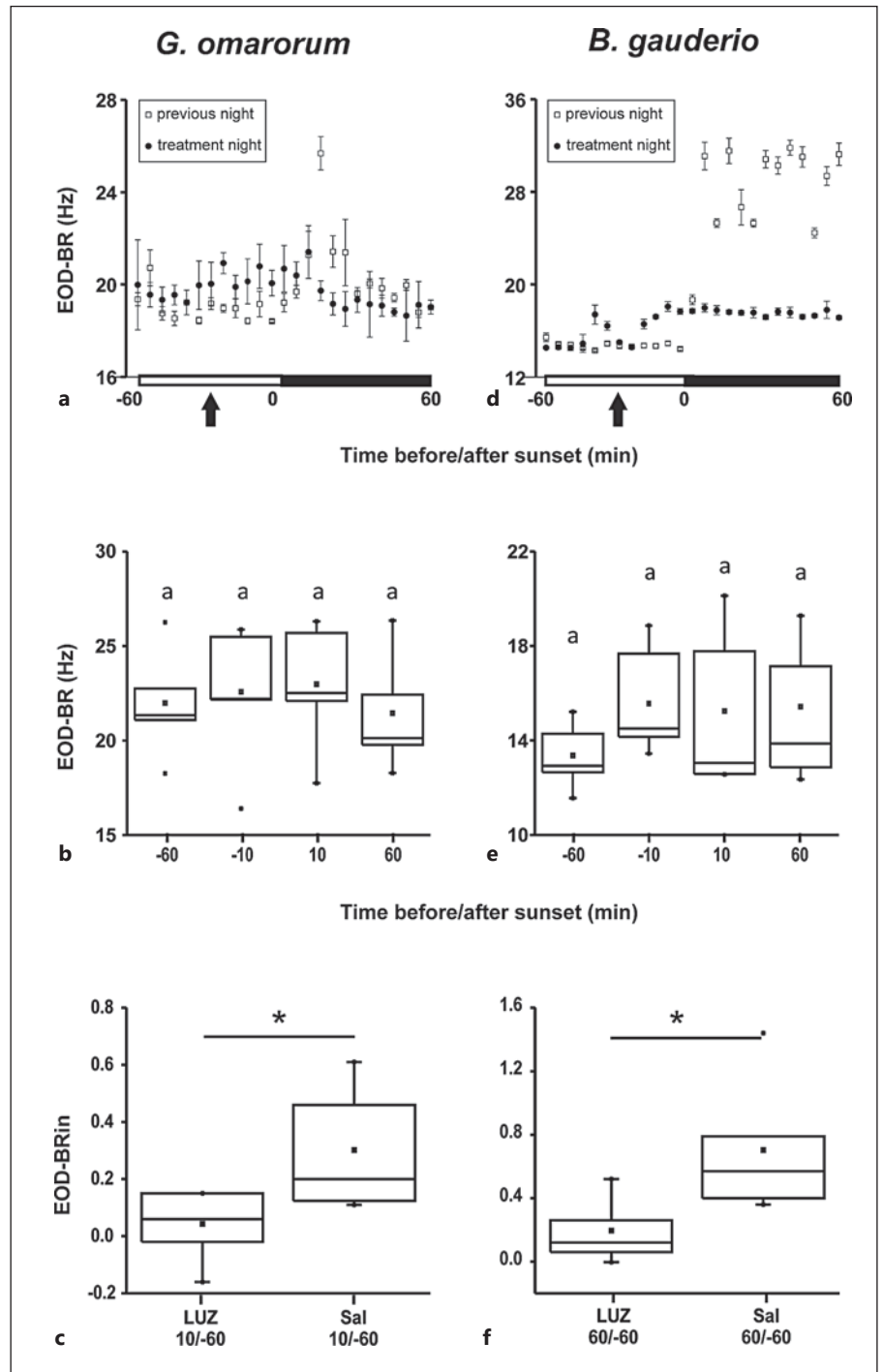
BRin for the same fish on the previous night by Wilcoxon's matched-pairs test.

(b) Independent variables using data sets from different individuals. EOD-BRin were compared by the Mann-Whitney U test between treated fish and saline controls (fig. 2c, f, 3c, f), as well as between the two species.

Results

In both *G. omarorum* and *B. gauderio*, isolated fish exhibited a nocturnal increase in EOD-BR during the first hour after artificial sunset (fig. 1). However, each species

Fig. 3. Effect of the melatonin antagonist LUZ on the nocturnal increase of EOD-BR. Day-night EOD-BR (mean \pm SD) recorded 60 min before and 60 min after sunset (sunset at 0) in isolated nonbreeding adults treated with LUZ (solid circles) 30 min before sunset (arrows) and in the same individual recorded the previous night (open squares) in *G. omarorum* (a) and *B. gauderio* (d). Temporal changes in the nocturnal increase of EOD-BR in LUZ-treated *G. omarorum* (b; n = 6) and in *B. gauderio* (e; n = 6). Box plots show EOD-BR at 60 and 10 min before sunset (-60, -10), and 10 and 60 min after sunset (10, 60). The letters above each box indicate the lack of statistical difference (Wilcoxon's matched-pairs test following Friedman's test, $p > 0.05$). EOD-BRin was compared between saline and LUZ-treated fish in *G. omarorum* (c; 10/-60, Mann-Whitney U test, * $p < 0.05$) and *B. gauderio* (f; 60/-60, Mann-Whitney U test, * $p < 0.01$).



shows a different timing and amplitude of nocturnal increase of EOD-BR. To compare this behavior between species, this increase was evaluated at 10 and 60 min after the lights were turned off in both species. In *G. omarorum*, EOD-BR increased after artificial sunset with a

peak at ~ 10 min after lights off (fig. 1a). At 60 min after sunset EOD-BR returned to daytime values. EOD-BR is at a maximum 10 min after sunset, and is statistically different from daytime EOD-BR (-60) and EOD-BR 60 min after sunset (60; n = 9, Wilcoxon's matched-pairs test fol-

lowing Friedman's test, $p = 0.0013$; fig. 1b). Consequently, EOD-BRin 10 min after lights off was significantly higher than the EOD-BRin at 60 min after sunset, indicating the transient nature of this increase ($n = 9$, Wilcoxon's matched-pairs test, $p = 0.01$; fig. 1c).

In *B. gauderio*, EOD-BR increased steadily during the first 60 min of night (fig. 1d). EOD-BR values increased progressively after sunset, with values at 10 min after sunset (10) significantly lower than those at 60 min after sunset (60; $n = 6$, Wilcoxon's matched-pairs test following Friedman's test, $p = 0.0001$; fig. 1e). EOD-BRin at 60 min after sunset was significantly higher than EOD-BRin at 10 min after sunset, indicating the persistent and progressive nature of this increase through the first hour of the night ($n = 6$, Wilcoxon's matched-pairs test, $p = 0.04$; fig. 1f).

The temporal dynamics of the nocturnal increase of EOD-BR during the first hour of the night differed between species. In *G. omarorum* maximum values (22.6 ± 3.7) were reached ~ 10 min after sunset, while in *B. gauderio* maximum values (24.5 ± 1.35) occurred 60 min after sunset. Moreover, the maximum nocturnal increase of EOD-BR was higher in amplitude in *B. gauderio* ($\text{EOD-BRin}_{\text{Bg}60} = 0.82 \pm 0.24$) than in *G. omarorum* ($\text{EOD-BRin}_{\text{Go}10} = 0.13 \pm 0.03$, $n_{\text{Bg}} = 6$, $n_{\text{Go}} = 9$, Mann-Whitney U test, $p = 0.0003$).

To analyze the possible role of AVT in the nocturnal increase of EOD-BR, fish were treated with the AVTergic antagonist MC (fig. 2). In both species the EOD-BR in MC-treated fish and control fish showed the same temporal profile of nocturnal increase (fig. 1) – a small increase with a peak at 10 min after sunset in *G. omarorum* and a greater increase building up gradually during the first hour of the night in *B. gauderio* (fig. 2a, d). The statistical analysis of the changes of EOD-BR in *G. omarorum* and *B. gauderio*, presented in figure 2b and e, respectively, confirms the maintenance of the species-specific temporal profiles (*G. omarorum*, $n = 6$, Wilcoxon's matched-pairs test following Friedman's test, $p = 0.0014$; *B. gauderio*, $n = 6$, Wilcoxon's matched-pairs test following Friedman's test, $p = 0.00001$). To rule out an effect of injection on EOD-BR, we included values taken 10 min before sunset (-10), when the fish had already been manipulated but the lights were still on, and confirmed that there was no effect of injection per se during daytime in both species (fig. 2b, e). In *G. omarorum*, the EOD-BRin of treated fish calculated at the time of maximum increase (10/ -60) was not different from the EOD-BRin of saline fish ($\text{EOD-BRin}_{\text{MC}} = 0.25 \pm 0.08$, $\text{EOD-BRin}_{\text{Sal}} = 0.25 \pm 0.13$, $n = 6$, Mann-Whitney U test, $p = 0.93$; fig. 2c). Similarly, in *B. gauderio*, the EOD-BRin of treated fish calculated at the time of maximum increase (60/ -60) was not

different to the EOD-BR of saline fish ($\text{EOD-BRin}_{\text{MC}} = 0.56 \pm 0.1$, $\text{EOD-BRin}_{\text{Sal}} = 0.61 \pm 0.2$, $n = 6$, Mann-Whitney U test, $p = 0.58$; fig. 2f). In short, MC does not block the nocturnal increase of EOD-BR in either species.

By contrast, the melatonin antagonist LUZ inhibited the nocturnal increase in EOD-BR in both species (fig. 3). In *G. omarorum*, EOD-BR in LUZ-treated fish did not show a transient nocturnal increase (fig. 3a, solid circles) compared to its own electric behavior displayed the previous night (fig. 3a, open squares). Similarly, in *B. gauderio*, EOD-BR in treated fish did not increase when the lights were turned off (fig. 3d, solid circles) compared to its own electric behavior displayed the previous night (fig. 3d, open squares). In both *G. omarorum* and *B. gauderio*, daytime EOD-BR was not significantly different from nighttime EOD-BR (*G. omarorum*, $n = 6$, Wilcoxon's matched-pairs test following Friedman's test, $p = 0.6$; *B. gauderio*, $n = 6$, Wilcoxon's matched-pairs test following Friedman's test, $p = 0.51$; fig. 3b, e). To rule out an effect of the injection on EOD-BR, we included values taken 10 min before sunset (-10), when fish had already been manipulated but the lights were still on, and confirmed no effect of injection during daytime in either species (fig. 3b, e).

EOD-BRin at the time of maximum increase was compared between LUZ-treated fish and the same fish on the previous night in both *G. omarorum* (10/ -60) and *B. gauderio* (60/ -60). In *G. omarorum*, the EOD-BRin of LUZ-treated fish was significantly lower than that observed the previous night ($\text{EOD-BRin}_{\text{LUZ}} = 0.07 \pm 0.06$, $\text{EOD-BRin}_{\text{PN}} = 0.18 \pm 0.08$, $n = 6$, Wilcoxon's matched-pairs test, $p = 0.046$). In *B. gauderio*, LUZ treatment also abolished the nocturnal increase ($\text{EOD-BRin}_{\text{LUZ}} = 0.17 \pm 0.1$, $\text{EOD-BRin}_{\text{PN}} = 0.77 \pm 0.2$, $n = 6$, Wilcoxon's matched-pairs test, $p = 0.046$). Treated fish were also compared with saline control fish injected on the same night. In *G. omarorum*, the EOD-BRin (10/ -60) displayed in control fish was significantly higher than that observed in LUZ-treated fish ($\text{EOD-BRin}_{\text{LUZ}} = 0.07 \pm 0.06$ vs. $\text{EOD-BRin}_{\text{Sal}} = 0.25 \pm 0.13$, $n = 6$, Mann-Whitney U test, $p = 0.023$; fig. 3c). Similarly, in *B. gauderio*, the EOD-BRin (60/ -60) of control fish was higher than that of LUZ-treated fish ($\text{EOD-BRin}_{\text{LUZ}} = 0.17 \pm 0.1$, $\text{EOD-BRin}_{\text{Sal}} = 0.61 \pm 0.2$, $n = 6$; Mann-Whitney U test, $p = 0.0086$; fig. 3f). In addition, the nocturnal increase of EOD-BR was similar in intact fish and saline controls of both species (*G. omarorum*, $\text{EOD-BRin}_{\text{Sal}} = 0.25 \pm 0.13$ vs. $\text{EOD-BRin}_{\text{PN}} = 0.18 \pm 0.08$, $n = 6$, Mann-Whitney U test, $p = 0.2$; *B. gauderio*, $\text{EOD-BRin}_{\text{Sal}} = 0.61 \pm 0.2$ vs. $\text{EOD-BRin}_{\text{PN}} = 0.77 \pm 0.2$, $n = 6$, Mann-Whitney U test, $p = 0.6$). In short, LUZ blocked the nocturnal increase of EOD-BR in both species.

Discussion

The electric behavior of weakly electric fish is a species-specific honest display, the waveform and rate of which are modulated by environmental and social influences [Franchina and Stoddard, 1998; Post and von der Emde, 1999; Franchina et al., 2001; Stoddard et al., 2007]. The nocturnal increase of EOD-BR is a common feature among South American weakly electric fish and coincides with a state of nocturnal arousal. In contrast to short-term novelty responses to sudden changes in prevailing lighting [Capurro, 1994; Post and von der Emde, 1999], a nocturnal increase in EOD-BR is consistent with higher levels of attention, motivation and perceptual efficacy during the active nocturnal phase [Silva et al., 2007; Jun et al., 2014]. There are no previous reports of daily changes in EOD-BR in the wild; however, in laboratory settings, a nocturnal increase in EOD-BR that persists in conditions of constant illumination has been reported in *Brachyhyopomus* [Stoddard et al., 2007].

In this study, we found that both species of weakly electric fish show a nocturnal increase of EOD-BR that differs between species in amplitude and dynamics. During the first hour of the night, the nocturnal increase in EOD-BR is transient and mild in *G. omarorum* but persistent and higher in amplitude in *B. gauderio*. Our analysis of the EOD-BRin allowed us to quantify precisely the dynamics of this nocturnal increase. The EOD-BR of *G. omarorum* increased when the lights were turned off with a peak after ~10 min, increasing up to 10% of daily values; by 1 h after artificial sunset EOD-BR had returned to daytime values. In contrast, *B. gauderio* showed a greater and sustained nocturnal increase of EOD-BR that grew gradually, almost duplicating daytime values towards the end of the first hour of darkness.

Considering that the EOD-BR serves perceptual as well as communicative functions, it is tempting to speculate that interspecific differences in the amplitude and timing of the nocturnal increase are related to differences in social structure in addition to phylogenetic differences among genera. The solitary species, whose individuals rarely interact, shows only a small transitory increase of EOD-BR, whereas the gregarious species produces a higher and persistent increase already known to be modulated by social stimuli [Silva et al., 2007; Stoddard et al., 2007; Perrone et al., 2010].

Signal emission does not come without a cost. Energy expenditure and predator detection risk constrain the EOD [Salazar and Stoddard, 2008]. Given that EOD is a costly signal [Nelson and MacIver, 2006; Salazar and

Stoddard, 2008; Gavassa et al., 2013], it is plausible that species with different levels of sociality employ different strategies of energy investment. We predict, for example, that the energy expenditure necessary to sustain the cost of the nocturnal increase is effective mainly in gregarious species that are continually engaged in communication. Social interactions might serve as stimuli to increase sensory acquisition and to enhance the effect of environmental darkness on the initiation of behavior, as shown previously [Silva et al., 2007; Stoddard et al., 2007].

Social behavior has evolved in vertebrates in parallel with the evolution of hypothalamic nonapeptides that regulate key species, sex and phenotypic variation [Goodson, 2008; O'Connell and Hofmann, 2012]. Identifying differences in electric behavior among species with different sociality prompted us to explore whether differences in the system of hypothalamic neuropeptides contribute to their control. Previous studies demonstrated that AVT differentially modulates EOD-BR in the two study species [Perrone et al., 2010; Perrone et al., 2014]. These differences are also evident at the medullary PN in which AVT induces a large persistent increase in firing rate in *B. gauderio* but a small transient one in *G. omarorum* [Perrone et al., 2010, 2014]. Interestingly, these differences resemble the species differences in the dynamics of the nocturnal increase presented in this study. In addition, AVT has a demonstrated role in establishing the dominant-subordinate status in both species [Perrone, 2012; Silva et al., 2013] and in the social component of the nocturnal increase of EOD-BR in *B. gauderio* [Perrone et al., 2010]. Taking all these observations into account, it is reasonable to expect that AVT mediates the interspecific differences in amplitude and timing of the nocturnal increase in EOD-BR. However, our results show that this is not the case, because inhibiting AVT action pharmacologically with MC did not prevent the nocturnal increase of EOD-BR. Furthermore, endogenous AVT does not seem to regulate daytime EOD-BR, since MC does not affect EOD-BR during the light phase in either species. This lack of an MC effect, in species in which its blocking efficacy has already been demonstrated, was surprising given the consistent stimulatory effect of AVT on EOD-BR and the proven robustness of MC antagonist action [Perrone et al., 2010, 2014].

Although our experiments do not show an AVTergic influence on nocturnal increase in EOD-BR in the laboratory, we cannot rule out the possibility that AVT mediates socially induced EOD modulations in free-living fish. It is well known that social neuropeptides such as AVT have species-, seasonal-, phenotypic- and contextual-depen-

dent actions [Goodson and Bass, 2000; Insel and Young, 2001; Lutterschmidt and Wilczynski, 2012]. EOD-BR recordings in the wild show a nocturnal increase that lasts for several hours in both species [unpubl. observations], contrasting to the shorter nocturnal increase recorded in laboratory settings for *G. omarorum*. The longer duration of the nocturnal increase in the wild might be sustained through social stimuli, since field recordings show that fish in the wild are within the communication range of other conspecifics, even in the solitary *G. omarorum*.

Increasing the EOD-BR during the active phase seems to be a useful behavior that would enhance perceptual efficacy when more information is needed. It is interesting to consider whether this nocturnal increase follows a circadian rhythm, and thus depends on an endogenous biological clock [Merrow et al., 2005]. In the wild, both *G. omarorum* and *B. gauderio* increase their EOD-BR towards sunset and keep it elevated throughout the night, gradually declining in the morning [unpubl. observations]. This pattern repeats daily even in free-running conditions, provided social stimuli are present [Stoddard et al., 2007]. Whether it is a circadian rhythm that would persist in total free-running conditions remains to be determined.

Melatonin is the timekeeping hormone across different taxa, signaling both the occurrence and the length of the dark phase of the photoperiod [Falcon et al., 2010; Maitra et al., 2012]. As the main modulator of the circadian system in teleost fish [Falcon et al., 2010], melatonin is a good candidate for modulating the nocturnal increase of EOD-BR. We found that inhibiting melatonin action with the antagonist LUZ (a nonselective MT1/MT2 antagonist) blocked the nocturnal increase of EOD-BR in both species, suggesting a causal role of circadian melatonin cycles in regulating the nocturnal increase in EOD-BR. This is the first report of melatonin action in weakly electric fish.

The basic action of the melatonergic system in the control of timekeeping processes seems to be more complex than predicted. Interspecific differences in melatonin pulses have been reported in response to identical environmental cues giving rise to three basic types of plasma melatonin profiles [Falcon et al., 2010]. In addition, melatonin can modulate the AVT system, and the interaction between daily changes in behavior and social influences is a current topic of research [Cassone and Westneat, 2011; Kronfeld-Schor et al., 2013]. In particular, recent studies indicate melatonin-AVT interactions in the control of daily and seasonal influences [Howard and Lutterschmidt, 2015]. In amphibians, melatonin production

during the dark phase influences the number of AVTergic cells [Lutterschmidt and Wilczynski, 2012]. Changes in the photoperiod, internally signaled by changes in melatonin pulses, influence AVT as well as arginine vasopressin systems, inducing seasonal and daily changes in behavior and reproductive state in fish and mice [Rodríguez-Illamola et al., 2011; Ben-Zaken et al., 2013]. In mammals, AVTergic production itself has an endogenous circadian rhythm [Jansen et al., 2000]. Multiple circadian clocks, central and peripheral, as well as multiple melatonin targets are observed in fish [Hurd et al., 1998; Falcon et al., 2010]. Interestingly, the preoptic area of the hypothalamus in teleosts has been reported as both an endogenous clock and a melatonin target [Falcon et al., 2010], as well as the location of AVT neurons [Dewan et al., 2008; Maruska, 2009; Perrone et al., 2014]. The reported difference in the distribution of the AVTergic system between *G. omarorum* and *B. gauderio* [Perrone et al., 2014] might represent the basis of how these species integrate circadian and social information to shape daily changes in behavior. We can therefore speculate that the richness and complexity of the interactions of the melatonergic and AVTergic systems, both highly conserved among vertebrates, contribute to the understanding of the huge diversity in the coupling of timekeeping and social behavior across vertebrates.

Acknowledgments

We thank Dr. Kent Dunlap and Dr. Diego Golombek for their generous revision and helpful comments on the manuscript. We are thankful to Federico Pedraja for his help with Matlab programming. We also would like to thank the two anonymous reviewers whose comments and suggestions greatly improved this article.

References

- Aguilera PA, Castello ME, Caputi AA (2001): Electrosensory processing in *Gymnotus carapo*: differences between self-generated and conspecific-generated signal carriers. *J Exp Biol* 204: 185–198.
- Ben-Zaken I, Haim A, Zubidat AE (2013): Long-day photoperiod interacts with vasopressin and food restriction to modulate reproductive status and vasopressin receptor expression of male golden spiny mice. *J Exp Biol* 216:3495–3503.
- Bennett MV, Pappas GD, Aljure E, Nakajima Y (1967): Physiology and ultrastructure of electrotonic junctions. II. Spinal and medullary electromotor nuclei in mormyrid fish. *J Neurophysiol* 30:180–208.

- Boyd SK (2013): Vasotocin modulation of social behaviors in amphibians; in Pfaff DW, Choleris E (eds): *Oxytocin, Vasopressin and Related Peptides in the Regulation of Behavior*. Cambridge, Cambridge University Press, pp 97–109.
- Capurro A (1994): Respuesta de novedad en *Gymnotus carapo*: La frecuencia de un oscilador biológico como manifestación conductiva; master thesis, Montevideo.
- Caputi A, Carlson B, Macadar O (2005): Electric organs and their control; in Bullock T, Hopkins C, Popper A, Fay R (eds): *Electroreception*. New York, Springer, vol 21, pp 410–451.
- Cassone VM, Westneat DF (2011): The bird of time: cognition and the avian biological clock. *Front Mol Neurosci* 5:32.
- Dewan AK, Maruska KP, Tricas TC (2008): Arginine vasotocin neuronal phenotypes among congeneric territorial and shoaling reef butterflyfishes: species, sex and reproductive season comparisons. *J Neuroendocrinol* 20: 1382–1394.
- Engler G, Zupanc GK (2001): Differential production of chirping behavior evoked by electrical stimulation of the weakly electric fish, *Apterontotus leptorhynchus*. *J Comp Physiol A* 187:747–756.
- Falcon J, Migaud H, Munoz-Cueto JA, Carrillo M (2010): Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 165:469–482.
- Franchina CR, Salazar VL, Volmar CH, Stoddard PK (2001): Plasticity of the electric organ discharge waveform of male *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. II. Social effects. *J Comp Physiol A* 187:45–52.
- Franchina CR, Stoddard PK (1998): Plasticity of the electric organ discharge waveform of the electric fish *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. I. Quantification of day-night changes. *J Comp Physiol A* 183:759–768.
- Freeman SM, Young L (2013): Oxytocin, vasopressin, and the evolution of mating systems in mammals; in Pfaff DW, Choleris E (eds): *Oxytocin, Vasopressin and Related Peptides in the Regulation of Behavior*. Cambridge, Cambridge University Press, pp 128–147.
- Gavassa S, Goldina A, Silva AC, Stoddard PK (2013): Behavioral ecology, endocrinology and signal reliability of electric communication. *J Exp Biol* 216:2403–2411.
- Giora J, Malabarba LR (2009): *Brachyhypopomus gauderio*, new species, a new example of underestimated species diversity of electric fishes in the southern South America (Gymnotiformes: Hypopomidae). *Zootaxa* 2093:60–68.
- Goodson JL (2008): Nonapeptides and the evolutionary patterning of sociality. *Prog Brain Res* 170:3–15.
- Goodson JL, Bass AH (2000): Forebrain peptides modulate sexually polymorphic vocal circuitry. *Nature* 403:769–772.
- Goodson JL, Kingsbury MA (2013): What's in a name? Considerations of homologies and nomenclature for vertebrate social behavior networks. *Horm Behav* 64:103–112.
- Howard CM, Lutterschmidt DI (2015): The effects of melatonin on brain arginine vasotocin: relationship with sex and seasonal differences in melatonin receptor type 1 in green treefrogs (*Hyla cinerea*). *J Neuroendocrinol* 27:670–679.
- Hurd MW, Debruyne J, Straume M, Cahill GM (1998): Circadian rhythms of locomotor activity in zebrafish. *Physiol Behav* 65:465–472.
- Insel TR, Young LJ (2001): The neurobiology of attachment. *Nat Rev Neurosci* 2:129–136.
- Jansen K, van der Zee EA, Gerkema MP (2000): Being circadian or not: vasopressin release in cultured SCN mirrors behavior in adult voles. *Neuroreport* 11:3555–3558.
- Jun JJ, Longtin A, Maler L (2014): Enhanced sensory sampling precedes self-initiated locomotion in an electric fish. *J Exp Biol* 217:3615–3628.
- Kronfeld-Schor N, Bloch G, Schwartz WJ (2013): Animal clocks: when science meets nature. *Proc Biol Sci* 280:20131354.
- Lima-Cabello E, Díaz-Casado ME, Guerrero JA, Otolara BB, Escames G, López LC, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D (2014): A review of the melatonin functions in zebrafish physiology. *J Pineal Res* 57:1–9.
- Lissmann HW (1958): On the function and evolution of electric organs in fish. *J Exp Biol* 35: 156–191.
- Lutterschmidt DI, Wilczynski W (2012): Sexually dimorphic effects of melatonin on brain arginine vasotocin immunoreactivity in green treefrogs (*Hyla cinerea*). *Brain Behav Evol* 80: 222–232.
- Maitra SK, Chatteraj A, Mukherjee S, Moniruzzaman M (2012): Melatonin: a potent candidate in the regulation of fish oocyte growth and maturation. *Gen Comp Endocrinol* 181:215–222.
- Maruska KP (2009): Sex and temporal variations of the vasotocin neuronal system in the damselfish brain. *Gen Comp Endocrinol* 160:194–204.
- Morrow M, Spoelstra K, Roenneberg T (2005): The circadian cycle: daily rhythms from behaviour to genes: first in the cycles review series. *EMBO Rep* 6:930–935.
- Miranda M, Silva A, Stoddard P (2008): Use of space as an indicator of social behavior and breeding systems in the gymnotiform electric fish *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. *Environ Biol Fish* 83:379–389.
- Nelson ME, MacIver MA (2006): Sensory acquisition in active sensing systems. *J Comp Physiol A* 192:573–586.
- O'Connell LA, Hofmann HA (2012): Evolution of a vertebrate social decision-making network. *Science* 336:1154–1157.
- Perrone R (2012): La vasotocina modula el comportamiento social de dos especies de peces eléctricos con diferente socialidad; PhD thesis, Montevideo.
- Perrone R, Batista G, Lorenzo D, Macadar O, Silva A (2010): Vasotocin actions on electric behavior: interspecific, seasonal, and social context-dependent differences. *Front Behav Neurosci* 4:52.
- Perrone R, Migliaro A, Comas V, Quintana L, Borde M, Silva A (2014): Local vasotocin modulation of the pacemaker nucleus resembles distinct electric behaviors in two species of weakly electric fish. *J Physiol Paris* 108: 203–212.
- Post N, von der Emde G (1999): The 'novelty response' in an electric fish: response properties and habituation. *Physiol Behav* 68:115–128.
- Richer-de-Forges MM, Crampton WGR, Albert JS (2009): A new species of *Gymnotus* (Gymnotiformes, Gymnotidae) from Uruguay: description of a model species in neurophysiological research. *Copeia* 2009:538–544.
- Rodríguez-Illamola A, López Patiño MA, Soengas JL, Ceinos RM, Míguez JM (2011): Diurnal rhythms in hypothalamic/pituitary AVT synthesis and secretion in rainbow trout: evidence for a circadian regulation. *Gen Comp Endocrinol* 170:541–549.
- Salazar VL, Stoddard PK (2008): Sex differences in energetic costs explain sexual dimorphism in the circadian rhythm modulation of the electrocommunication signal of the gymnotiform fish *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. *J Exp Biol* 211:1012–1020.
- Silva A, Perrone R, Macadar O (2007): Environmental, seasonal, and social modulations of basal activity in a weakly electric fish. *Physiol Behav* 90:525–536.
- Silva A, Perrone R, Zubizarreta L, Batista G, Stoddard PK (2013): Neuromodulation of the agonistic behavior in two species of weakly electric fish that display different types of aggression. *J Exp Biol* 216:2412–2420.
- Silva A, Quintana L, Galeano M, Errandonea P (2003): Biogeography and breeding in Gymnotiformes from Uruguay. *Environ Biol Fish* 66:329–338.
- Stoddard PK (2002): The evolutionary origins of electric signal complexity. *J Physiol Paris* 96: 485–491.
- Stoddard PK, Markham MR, Salazar VL, Allee S (2007): Circadian rhythms in electric waveform structure and rate in the electric fish *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. *Physiol Behav* 90:11–20.
- Thompson RR, Walton JC (2009): Vasotocin immunoreactivity in goldfish brains: characterizing primitive circuits associated with social regulation. *Brain Behav Evol* 73:153–164.
- Zhdanova IV, Reeb SG (2006): Circadian rhythms in fish; in Sloman KA, Wilson RW, Blashine S (eds): *Fish Physiology: Behaviour and Physiology of Fish*. New York, Elsevier, vol 24, p 41.
- Zhdanova IV, Tucci V (2003): Melatonin, circadian rhythms, and sleep. *Curr Treat Options Neurol* 5:225–229.

Author Queries

Journal: Biology Open

Manuscript: BIO036319

When reviewing your proofs, please keep in mind that the article has been edited to comply with the basic requirements of the journal. The enclosed eProof is not to be regarded as an opportunity to alter, amend or revise your paper; it is intended to be for correction purposes only.

Please indicate your corrections using comments/annotations and do not edit the actual text of the PDF.

Please check the **entire proof** thoroughly, paying particular attention to any text highlighted in red.

Please ensure that all tables, figures and equations are present and in the correct order.

Check carefully that the authors' names, affiliations and the corresponding author's e-mail address are correct.

IMPORTANT: If you submit revised figures, please let us know what has been changed in the figures so that we can check that the files have been substituted in the final proof.

Author funding: It is the responsibility of the corresponding author to provide the relevant funding information from **all** authors. The funding data linked to your article are summarised in a table at the end of the proof ('Funding details'). **Please check that all funders supporting your work and relevant grant numbers are included.** Funder names may have been edited to match the Crossref Open Funder Registry (see <http://search.crossref.org/funding>). Note that the table at the end of the proof will not be included in your published paper.

PMC deposition: All papers are deposited in PMC with instruction for immediate release.

Supplementary information: If you have submitted supplementary data, please check that a link has been added before the references and that citations are included in the text. Please note there are no proofs for supplementary information as the files are not edited. If you wish to make any changes to your supplementary information, please provide replacement file(s).

Summary statement: Please carefully check the Summary statement at the end of the paper, which will appear on the Table of Contents page, and the email alert for the issue.

Author contributions: Please provide a statement that specifies the contribution of every author listed on the article. We encourage you to use the **CRediT taxonomy** to define individual author contributions.

Data availability: All publicly available datasets supporting your work should be reported in the 'Data availability' section. Details should include repository name, identifier such as accession number or doi, and where possible a hyperlink to the URL of the dataset. For more information on our data deposition requirements, see <http://bio.biologists.org/content/journal-policies#data>.

Cover suggestions: If you have not already but would like to submit a cover suggestion(s) relating to your article, please email it to the editorial office (bio@biologists.com). The images should be 23 cm (width) × 24 cm (height), with a minimum resolution of 300 ppi, and saved as TIFF or JPG at maximum quality, in RGB mode. Cover suggestions should be accompanied by a cover caption describing the image (up to 100 words). Authors are welcome to supply a mock-up of a potential cover, but original images will still be required.

Please answer the hyperlinked queries below and indicate any necessary changes on the proof.

[AQ1](#) Please provide city name for affiliations [1 and 2]; postal code for affiliations [1–3].

[AQ2](#) Please provide institution for L. Zubizaretta.

[AQ3](#) Please use full terms before abbreviating (FB_{sunset}, FB₆₀)

[AQ4](#) Could you please try rephrasing this section for clarity?

[AQ5](#) Times have been edited to match house style. Please confirm.

[AQ6](#) Please check Author contributions.


[AQ7](#) We are partnered with the Dryad data repository (<http://www.datadryad.org>) to support authors in making the data underlying their research available to the community, and to better integrate data accessibility with manuscript submission. Do you have any data associated with this paper that you would consider depositing in Dryad or a similar database and linking to our Data availability section?

[AQ8](#) Please provide editor names for reference [Bullock et al. (2005)].

[AQ9](#) Please check the reference [Capurro (1994)].

AQ10 Please check the reference [Diez-Noguera (1999)].

AQ11 Please check the reference [Fontanarroza et al. (2010)].

2 Please revise figure legend for Fig 2. Can you please define what each coloured line represents in the upper panel? You mention a blue line in the lower panel, but there is none present. Please also clearly define the red and blue lines in the lower graph.

RESEARCH ARTICLE

Daily changes in the electric behavior of weakly electric fish naturally persist in constant darkness and are socially synchronized

Adriana Migliaro^{1,2}, Victoria Moreno^{1,2}, Paul Marchal^{2,3,*} and Ana Silva^{1,2,‡}

ABSTRACT

Daily rhythms allow anticipation of changes and allocation of energy to better cope with predictable events. Rhythms in behavior result from a complex combination of physiological processes timed by the nervous system and synchronized with external information. We aimed to understand how rhythmic behaviors arise in nature, when weakly electric fish are exposed to cyclic environmental influences and social context. *Gymnotus omarorum* is a South American nocturnal pulse-type gymnotiform. Its electric behavior encodes information about species, sex and physiological state. The rate of emission of the electric organ discharge (EOD-BR) is modulated by exploratory activity and by physical and social environmental stimuli. We show that the EOD-BR increases during the night in the natural habitat even in individuals maintained in constant dark conditions. Locomotor activity is higher at night, however the nocturnal increase of EOD-BR still occurs in motionless fish, demonstrating an independent origin for the locomotor and electric components of exploratory behavior. When fish are observed in nature, social context exerts a synchronizing role on electric behavior. *G. omarorum* emerges as an exciting wild model for the study of daily rhythms arising in the complexity of the real world, integrating environmental, physical and social cues in the modulation of rhythmic behavior.

KEY WORDS: Daily rhythms, Electric behavior, Electric fish, Temperature, Environmental influences, Social context

INTRODUCTION

Circadian rhythms allow living organisms to anticipate changes and allocate energy to cope with predictable events. Current knowledge about circadian systems provides deep insight into temporal dynamics as well as in molecular processes subserving rhythmicity. However, these analyses have mostly been carried out in precisely controlled laboratory conditions, which lack the complexity of natural environmental constraints, leading to

interpretations that fail to include the whole range of modulating factors operating in nature (Tomotani et al., 2012). In our quest to understand the adaptive role of circadian systems we should aim at broadening our scope by including novel animal models and rhythmic variables that arise in natural environments, synchronous with natural environmental cues. Current chronobiological research thus faces a double challenge: on the one hand, to be considered a proper circadian rhythm, daily variations of a given trait should fulfil a number of requirements that include persistence in free-running conditions of illumination as well as independence from social and environmental changes. On the other hand, the analysis of how biological clocks adapt to constantly changing environments – i.e. in the real world – needs to be added to the agenda of chronobiological studies (Kronfeld-Schor et al., 2013).

Nocturnal fishes of the South American order Gymnotiformes are characterized by the emission of species-specific weak electric discharges that serve electrosensory and electrocommunicative purposes (Lissmann, 1958; Stoddard, 2002). These fish exhibit a typical electric behavior consisting of pulse discharges (the ‘electric organ discharge’, EOD) emitted continuously by a specialized electric organ. The medullary pacemaker nucleus commands the basal rate of the EOD (EOD-BR) (Bennett et al., 1967) and receives modulatory central connections from prepacemaker structures. Rate modulations of the EOD depend on several environmental factors, in particular and very importantly, on water temperature, in a direct relationship that is sustained by the influence of temperature on physiological processes (Ardanaz et al., 2001). The EOD is a behavioral display that encodes information (in waveform and frequency domains) about an individual’s species identity, sex and physiological state (Bullock et al., 2005). In addition, the EOD is the physical carrier of perceptually relevant sensory information (Aguilera et al., 2001). Arousal states in weakly electric fish imply an increase in EOD basal rate, providing a greater amount of available sensory information. Exploratory movements, novelty detection, escape responses and even volition are associated with increases in EOD-BR. Arousal is expected to coincide with the activity phase and thus EOD-BR is expected to be higher during the night (Black-Cleworth, 1970; Jun et al., 2014; Migliaro and Silva, 2016; Silva et al., 2007). Two main questions are then to be addressed: (1) Is this nocturnal increase in EOD-BR also observed in nature? (2) Is the nocturnal increase in EOD-BR an independent trait or only a consequence of fish locomotion?

Gymnotus omarorum is a pulse type gymnotiform widely distributed in Uruguay (Richer-de-Forges et al., 2009; Silva et al., 2003) and an excellent model system for the study of modulation of the biological clock by environmental influences. It is a seasonal breeder that displays intra and inter-sexual aggression all year round (Batista et al., 2012; Silva et al., 2003), it exhibits high-site fidelity and shows neighbor intolerance consistent with territoriality


¹Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay. ²Unidad Bases Neuronales de la Conducta, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Ministerio de Educación y Cultura, Uruguay. ³Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Claude Bernard, Lyon, France.

*Present address: Centre de Recherche sur la Cognition Animale, Université Paul Sabatier, Toulouse, France.

‡Author for correspondence (asilva@fcien.edu.uy)

© A.M., 0000-0002-7172-6699; V.M., 0000-0002-1388-3768; A.S., 0000-0003-2890-0353

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

AQ2 (L. Zubizarreta, , xxx(institution), personal communication). Isolated individuals in laboratory settings show a melatonin-dependent nocturnal increase in EOD-BR during the first hour of darkness under a 12:12 light-dark cycle and constant temperature (Migliaro and Silva, 2016).

Our aim was to analyze if the nocturnal increase in EOD-BR, previously recorded in laboratory settings in *G. omarorum*, is a trait that can also be observed in nature. To do so, we first confirmed that though these nocturnal animals increase their exploratory activity during nighttime, the nocturnal increase in EOD-BR persists even in sheltered fish. Secondly, we found a marked daily rhythm in EOD-BR in freely moving fish recorded in their natural habitat, which is independent of light-dark clues as it occurs in constant darkness.

RESULTS

Nocturnality in *G. omarorum*

G. omarorum has long been considered nocturnal based on behavioral analysis that took into account their general increase in activity during the night. Our first aim was to determine if active exploration was enhanced during nighttime as an individual trait. When isolated animals are presented with an enriched environment to explore and exposed to the natural photoperiod, sheltering behavior occurs mainly during daytime. Fig. 1 shows the percentage of fish recorded inside shelters at 30 min intervals during a 24 h period. During the night (19:00 h–07:00 h) 0–30 % of fish are sheltered, whereas during the day, 100 % of fish are sheltered most of the time ($n=6$; Wilcoxon test, $P=0.02$). This experiment shows that the motor component of exploratory behavior increases during the night. Exploratory activity in this species is also characterized by an increase in EOD-BR; an increase in sampling frequency that enhances perception. In order to break down the complexity of this joint increase in movement and EOD-BR, we recorded daily

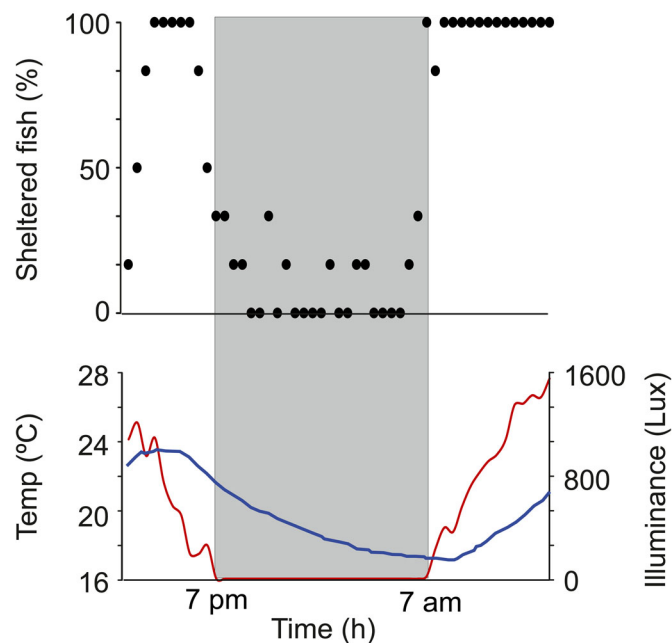


Fig. 1. Daily changes in sheltering behavior. (Upper panel) Percentage of sheltered fish through a 24 h period. Each black dot accounts for the percentage of isolated fish ($n=6$) found in one of the 12 available shelters each 30 min. (Lower panel) Red line shows mean light intensity under the water. Blue line shows mean water temperature. Mean values from the six consecutive days of recording. Gray shadow signals the dark period (19:00 h–07:00 h).

changes in EOD-BR in sheltered fish in semi-natural settings (Fig. 2). EOD-BR is higher during nighttime; more specifically, at sunset, EOD-BR values are 17.5 % higher than in the previous hour [index of BR change (BrIn)= 0.175 ± 0.09] (FB_{sunset} versus FB_{-60} ; $n=5$; Wilcoxon test; $P=0.04$). Since EOD was recorded only if fish were sheltered and thus not swimming, these results show that the nocturnal increase in EOD-BR is independent of the increase in locomotor activity.

Daily changes of electric behavior in nature

Assessing the daily changes of electric behavior in the wild is mandatory for understanding its regulation in a natural context. Light and temperature changes inside and outside the water were monitored over 72 h in the natural habitat of the fish. While outside light levels followed the obvious day-night rhythm, the environment under the thick vegetation that characterizes electric fish habitats was constantly dark (Fig. 3). Water temperature cycled as expected, rising through the day and peaking towards sunset. Fish were recorded in their natural habitat under dense vegetation with each individual placed in a large plastic mesh. Fish could move within the mesh and eventually perceive near conspecifics. Fig. 4 shows individual ($n=6$) EOD-BR changes over 72 h. Electric behavior has a clear daily rhythm, rising towards sunset and decaying towards dawn. Mean EOD-BR is 12 % higher at sunset compared to 60 min before sunset ($BrIn=0.12\pm 0.05$) (FB_{sunset} versus FB_{-60} ; $n=6$; Wilcoxon test, $P=0.02$). Daily rhythmicity was confirmed by cosinor analysis for a 24 h period. Table 1 presents the parameters obtained for each tested fish. It is interesting to note that five out of six recorded fish showed a statistically significant 24 h cosinor fit whose phase occur during nighttime. It is also noteworthy that the one fish in which the cosinor fit failed to be significant was also the fish in which we missed several EOD samples (fish 1 in Fig. 3 and Table 1).

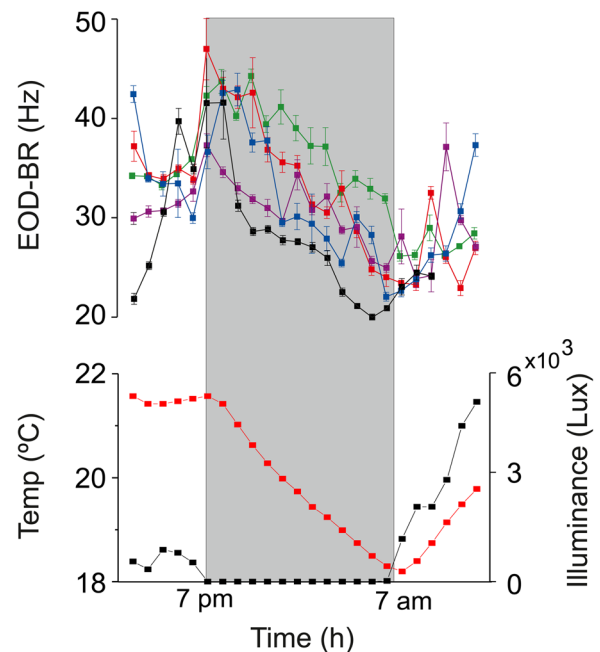


Fig. 2. 24 h recordings of EOD-BR of isolated animals ($n=5$) in a semi-natural setup. (Upper panel) Fish were recorded each hour only when motionless (EOD-BR values represent the median for \pm MAD). (Lower panel) Water temperature (black line) and light intensity recorded under the water (red line) in one tank. Gray shadow signals the dark period (19:00 h–07:00 h).

AQ3

AQ4

AQ12

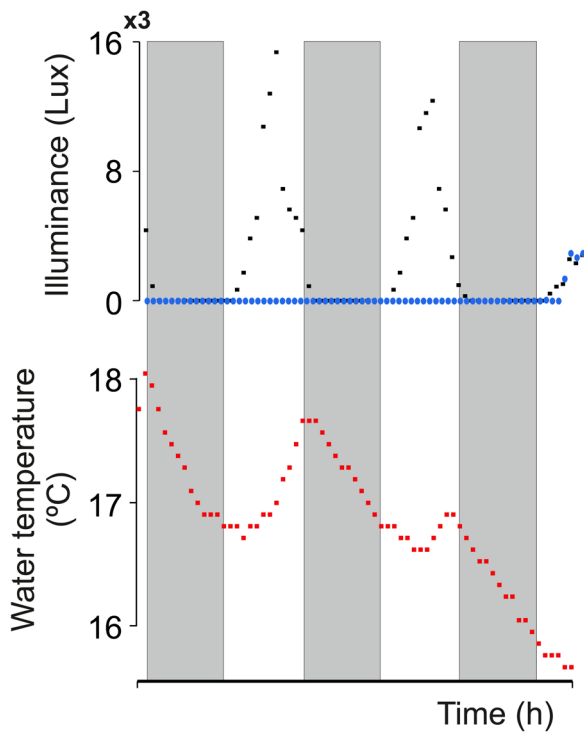


Fig. 3. Light and temperature recordings during 72 h in the natural habitat. (Upper panel) Light intensity outside (black squares) and inside the water (blue circles). (Lower panel) Water temperature. Gray shadows signal the three dark periods (19:00 h–07:00 h).

Environmental influences on the nocturnal increase in electric behavior

EOD-BR recordings presented here were carried out in two different conditions regarding environmental daily cues. Fish kept in plastic

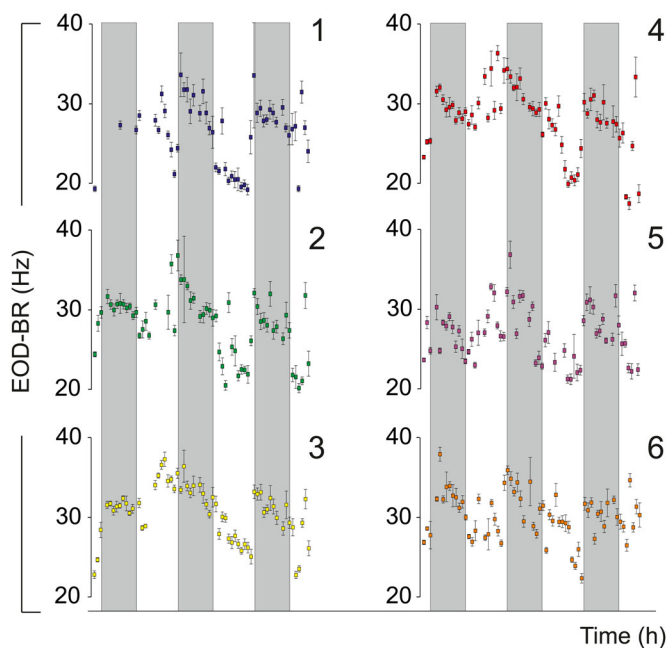


Fig. 4. 3 day recordings of EOD-BR in the natural habitat. The EOD was recorded each hour (EOD-BR values represent the median for \pm MAD) in six fish (numbered 1-6). Gray shadows signal the three dark periods (19:00 h–07:00 h).

Table 1. Cosinor values for the daily rhythmicity of EOD-BR

Fish no.	P-value	Acrophase (hours)
1	0.07	18.35
2	0.001	21.9
3	0.002	20.43
4	0.04	21.88
5	0.03	20.77
6	0.05	19.81

Acrophase and P-values for EOD-BR cosinor analysis for fish recorded in the natural habitat (n=6; same fish as in Fig. 3). Cosinor fit was significant for fish 2–6 and marginal for fish 1.

meshes inside the lagoon under natural vegetation (natural condition), were in a constant darkness environment. Isolated fish, on the other hand, were kept in plastic containers exposed to daily photoperiodic changes (semi-natural condition), albeit partially submerged in the lagoon and partially covered by vegetation. Possible effects of these different environments on EOD-BR rhythmicity were then analyzed. In the natural scenario, EOD-BR increases towards sunset, peaking on the second or third hour of the night. The acrophase for this group was calculated taking into account only those individuals with a cosinor P-value < 0.05 (n=5). Rayleigh tests for each condition are shown in Fig. 5. Median acrophase for fish recorded in nature is $21:09 \text{ h} \pm 12:09 \text{ h}$, showing a high degree of synchronization among individuals ($r=0.988$; $P=0.002$). Fish recorded in the semi-natural experiment show a similar daily rhythm with a very similar population acrophase: $21:00 \text{ h}$ ($r=0.902$; $P=0.009$). However, the individual acrophases are more scattered during a 4 h period and hence show less synchronization than fish in natural conditions.

AQ5

DISCUSSION

With the aim of contributing to the understanding of the adaptation of biological clocks to natural life, we provide a novel animal model system in which to analyze daily changes in the wild under the natural constraints of physical and social environmental clues. In this study, we show that *G. omarorum* is a clearly nocturnal fish that increases both its exploratory behavior and its electric behavior during the night. We were also able to demonstrate that the nocturnal electrical arousal is independent of locomotion and occurs under natural constant darkness.

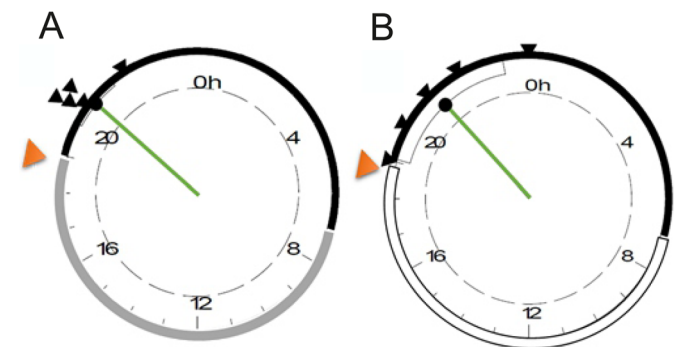


Fig. 5. Daily rhythms in populations recorded in natural and semi-natural settings. Rayleigh test for fish recorded (A) in the natural (n=5), and (B) the semi-natural conditions (n=5). Black arrowheads indicate each individual's acrophase, orange arrowheads signal the time of maximum water temperature. Green line shows mean population acrophase and its length represents the Rayleigh radius (r). Dashed circle represents P=0.05 confidence level. Photoperiod is depicted by the outline of each circle: black, night; white, day; gray, constant darkness during daytime.

Fresh water South American weakly electric fish are well known as nocturnal animals. Nocturnality has been explored in several species of Gymnotiformes with behavioral approaches that focused on locomotor activity, electric behavior and electrocommunication. While early experiments showed a nocturnal increase in locomotor activity and exploratory behavior with a natural photoperiod (Black-Cleworth, 1970; Lissmann and Schwassmann, 1965), more recent reports attempted to demonstrate the circadian nature of nocturnal variations in electric behavior. Zupanc (2001) showed that social electric signals occur during the night or the subjective night when animals are in constant darkness. Stoddard et al. (2007) showed that the basal rate of the EOD has a rhythm of nocturnal increase that persisted in constant light and constant darkness only expressed in social context as animals would lose their rhythm in isolation. Strictly speaking, so far it has not been possible to demonstrate the persistence of an endogenous circadian rhythm of electric behavior in isolated individuals in free running conditions. In this study, we show the emergence of this rhythm in nature, its independence from locomotion and its persistence in constant darkness, albeit in the presence of other cyclic variables such as social context and temperature.

Nocturnality is, of course, an expected adaptation for animals that depend on a main sensory modality whose resolution is independent of environmental light changes. So, while nocturnality of weakly electric fish is not a matter for discussion, the dissection between locomotor and electric arousal during the nocturnal active phase has always been difficult to achieve, given their mutual influences. In other words, as locomotion is associated with exploration and, therefore, to an increase in the demands of electrosensory information (i.e. to an increase of EOD rate), no specific attempts have been made to distinguish daily variations of locomotor and electric displays as separate traits. To do that, the first step of this study was to confirm the nocturnality of *G. omarorum*. In an enriched environment (outdoor tank with multiple shelters), individuals of *G. omarorum* tend to rest during daytime and abandon shelters during the night (Fig. 1).

It is generally accepted that electric behavior is modulated by different environmental factors. Particularly, changes in water temperature induce direct proportional changes in EOD-BR in *G. omarorum* as a result of the thermal dependence of the ectotherm's physiological processes (Ardanaz et al., 2001). Additionally, in this species, the detection of novel stimuli is associated with a fast and transient (<1 s) increase in EOD rate known as novelty response (Caputi et al., 2003), the dynamics of which depend on the stimulus intensity and its sensory modality (Capurro, 1994; Caputi et al., 2003). The activation of the Mauthner cell, a trigger for escape responses, also generates an abrupt and short (5 s) increase in electric behavior in *G. omarorum* (Falconi et al., 1995). Social context is a strong modulator of EOD rate modifying its basal rate in this species (Perrone and Silva, 2018) as well as influencing the generation of transient modulations, the social electric signals (Hagedorn and Heiligenberg, 1985). These social modulations are mediated by the hypothalamic neuropeptide arginine-vasotocin, which directly influences the discharge rate of the medullary pacemaker nucleus (Perrone et al., 2014). Locomotion is also associated with a general increase in electric behavior as has been documented in several gymnotiform species (Black-Cleworth, 1970; Jun et al., 2014; Kawasaki and Heiligenberg, 1989). Moreover, recent findings highlight the occurrence of transient increases in EOD rate immediately before the beginning of movement, a behavioral display that has been pinpointed as an evidence of volition (Jun et al., 2014). Except for water temperature

changes, the factors mentioned so far occur with a greater probability during the night. So, we can pose the question of whether the nocturnal increase of EOD-BR is a genuine independent attribute or if it is secondary to a complex combination of all these diverse stimulating effects. In this study, we were able to demonstrate that the nocturnal increase of EOD-BR stands as an independent trait as it persists through the night even in isolated motionless fish (Fig. 2).

We hypothesize that the nocturnal electric arousal; i.e. the nocturnal increase of EOD-BR, emerges from an endogenously-driven circadian rhythm of EOD-BR. In a previous study, we observed that isolated individuals of *G. omarorum* in laboratory settings show a transient melatonin dependent increase in EOD-BR during the first hour of the night, strongly suggesting a circadian control of electric arousal (Migliaro and Silva, 2016). We now add relevant evidence to support the robustness of the nocturnal increase of EOD-BR as: (1) it occurs in freely moving fish in the wild, confirming its adaptive relevance (Fig. 4); (2) it stands as a locomotor-independent trait (Fig. 2); and (3) it persists in constant darkness in the wild (Fig. 3). It is notable to confirm that while fish stay under a thick layer of aquatic plants that prevents light penetration (Fontanarrosa et al., 2010) EOD-BR swings daily regardless of the lack of environmental light information. Somehow, the constant darkness in which these animals normally live provides a natural experiment to demonstrate that daily variations of EOD-BR do not require photoperiodic information.

Even though these fish live in constant darkness, other environmental temporal information must be available in the wild to allow synchronization of natural rhythms. Besides light, daily changes of environmental temperature have been traditionally recognized as reliable entrainers of endogenous circadian rhythms and are particularly important for ectothermic animals (Pittendrigh, 1960). Seasonal water temperature changes have been reported to trigger the onset of the breeding season in a sympatric gymnotiform species (Quintana et al., 2004; Silva et al., 2003). In these reports, manipulation of water temperature induced gonadal maturation, sexual dimorphism and reproductive behavior, thus synchronizing the reproductive cycle. In *G. omarorum*, daily variations in water temperature have also been reported to affect the information encoded by electric cues (Ardanaz et al., 2001). In the present study, we confirmed that while environmental illumination remains constant, water temperature shows daily rhythms that peak close to sunset (Figs 3 and 5). This evidence allows us to postulate that water temperature is the most likely candidate to synchronize the daily rhythm in the natural electric behavior of *G. omarorum*. Given the strong influence temperature has on EOD rate, it is worth noticing that the nocturnal increase of EOD-BR occurs while environmental temperature decreases (Fig. 4), i.e. with an inverted correlation than the expected by the unspecific positive effects of temperature on EOD-BR (Ardanaz et al., 2001). As a consequence, EOD-BR peak does not coincide with the daily peak in temperature (Fig. 5), occurring during the decaying phase of the temperature cycle. In other words, there are at least two different pathways by which temperature exerts its effects on EOD-BR: (1) the non-specific and positive metabolic effect (Ardanaz et al., 2001); and (2) a zeitgeber effect, by which the slight daily variation of water temperature might be used as an environmental cue for the onset of arousal.

Though the role of daily changes in temperature have been postulated as putative circadian entrainers since pioneer studies (Pittendrigh, 1960), there are only very few species in which environmental temperature has been confirmed as a relevant zeitgeber. For example, it has been reported that temperature

cycles not only synchronize the circadian clock of *Drosophila* in constant illumination conditions (Busza et al., 2007), but also act as the main circadian zeitgeber in certain misalignments of light and temperature cycles (Harper et al., 2016). This sensitivity to temperature cycles seems to be quite rare in nature. The results presented in this study suggest, for the first time in anamniote vertebrates, the role of water temperature cycle as a circadian zeitgeber that needs to be further explored and confirmed in free-running laboratory conditions.

The daily rhythm in electric behavior is not a consequence of movement, as evidenced by recordings made of motionless fish (Fig. 2). Even though motionless fish have a wider distribution of acrophase values, it is remarkable that the mean population acrophase is similar to the one observed in freely moving fish (recorded in the lagoon under natural vegetation, Fig. 5). This constancy in mean population acrophase is surprising considering that motionless fish were recorded in tanks in which photoperiodic information is available, whereas fish recorded in their natural habitat are in constant darkness conditions. Contrary to our speculation, the availability of photic information did not increase the synchronization among motionless fish which are, in fact, desynchronized in comparison to fish in their natural habitat. In this sense, it might be important to consider the effect of social context in circadian synchronization. Fish recorded in the lagoon are only restricted by a plastic mesh and can perceive other fish electric discharges, while motionless fish are isolated in plastic tanks and hence isolated from conspecifics discharges. Social synchronization of circadian rhythms is currently an area of great interest and debate in chronobiology, one in which electric fish also offer an interesting model.

Concluding remarks

The nocturnality of electric arousal in *G. omarorum*: (1) is independent of locomotion; (2) persists in constant darkness in the wild; (3) is most likely synchronized by daily variations of both water temperature daily variations and by social cues. *G. omarorum* thus emerges as an exciting wild model system for the study of the circadian rhythms that arise in the complexity of the real world, allowing us to evaluate the integration of environmental physical and social clues in the modulation of the circadian system.

MATERIALS AND METHODS

Adult *G. omarorum* (Richer-de-Forges et al., 2009) ($n=17$) were used in laboratory ($n=6$) and natural settings, including the recording of six individuals in natural conditions and five individuals isolated in shelters (semi-natural). All specimens were collected in Laguna del Sauce, Depto. de Maldonado (34° 48' S, 55° 18' W). Fish were identified using a 'fish detector': an electronic audio amplifier connected to a pair of electrodes as described elsewhere (Silva et al., 2003).

The experiments were conducted during the non-breeding season at the peri-equinox period, under a natural light-dark cycle of 12:12. Periodic light and temperature measures were taken each 30 min, inside the water under the natural vegetation and outside the water (HOBO-MicroDAQ: UA-002-08). Measurements range: temperature, -20° to 70°C (-4° to 158°F); light, 0 to 320,000 lux (0 to 30,000 lumens/ft²).

All research procedures complied with ASAP/ABS Guidelines for the Use of Animals in Research and were approved by the Institutional Ethical Committee (Comisión de Ética en el Uso de Animales, Instituto Clemente Estable, MEC, 008/11).

Exploratory behavior recordings in laboratory settings

With the aim of demonstrating the nocturnality in this species we recorded the presence of exploratory behavior throughout the day. Fish used in these experiments were transported from the collecting site, housed in individual

compartments within 500 l outdoor housing tanks and fed *Tubifex tubifex ad libitum*. Recordings were carried out in a naturalistic tank (500 l) containing an ordered array of 12 small shelters (25 cm in length and 3.3 cm in diameter, plastic tubes) each equipped with a pair of electrodes that allowed the recording of the EOD only when animals were sheltered. Animals ($n=6$) were placed individually in the tank and shelters were checked for fish presence once per hour over 24 h. If the fish remained undetected after checking all the shelters it was assumed to be swimming around the tank displaying exploratory behavior.

EOD-BR recordings in the natural habitat

EOD-BR was recorded from fish ($n=6$) placed in plastic nets with electrodes under the natural vegetation in their natural habitat (Laguna del Sauce) during 72 h. 30 s recordings were made once an hour. Fish in this condition are almost always detectable although they are able to move around and perceive the electric signals of conspecifics.

EOD-BR recordings in isolated semi-natural settings

Fish ($n=5$) were placed in 50 l individual plastic tanks containing a shelter equipped with a pair of electrodes (as described above). Given the size of the shelters, when recordings show stable EOD amplitudes, we can reliably assume fish remain still while sheltered. EOD-BR was recorded for 30 s per hour over 24 h, if fish were sheltered and hence still. Fish in this condition are isolated from the influence of conspecifics. Light and temperature were monitored as described earlier.

Data processing and statistical analysis

The EOD was recorded through electrodes placed in the water, digitalized using standard computer soundcards and recorded with a custom developed Matlab (MathWorks, Inc.) program which detects the moment of EOD occurrence.

EOD-BR was calculated as the inverse of the inter EOD intervals in the recordings and expressed in terms of the median \pm MAD values. As fish differ in their EOD-BR, an index (the BRIn) was calculated to determine the increase between the hour before sunset (BR₋₆₀) and sunset (BR_{sunset}), regardless of absolute values for each fish. The global BRIn for the whole group was calculated as the median \pm MAD value of individual indexes.

$$\text{BRIn} = (\text{BR}_{-60} - \text{BR}_{\text{sunset}}) / \text{BR}_{-60}.$$

In order to normalize the effect of water temperature on EOD-BR, values were corrected to a constant 20°C temperature by using the Q₁₀ value of 1.5 as calculated for electric fish (Dunlap et al., 2000; Silva et al., 2007). Q₁₀ is a unitless quantity calculated as the factor by which the rate increases when the temperature (T) is raised by ten degrees Celsius.

$$Q_{10} = \text{EOD} - \text{BR} \times (T) / \text{EOD} - \text{BR} \times (T + 10).$$

A paired non-parametrical two-tailed Wilcoxon test was used for statistical analysis. Data are shown as median \pm MAD.

The analysis of the nocturnal increase in EOD-BR was carried out using a cosinor fit (Diez-Noguera, 1999). Cosinor gives a statistical validation for the fitting of a cosine function within a 24 h period to each fish EOD rate data, as well as the acrophase value in lineal hours for each fish that are then transformed to clock hours for simplicity. For animals recorded during a single cycle of 24 h, acrophase was determined by the hour of the maximum EOD-BR value. Population acrophase was calculated and statistically validated using the Rayleigh test with the individual acrophases calculated as described (Refinetti et al., 2007).

Acknowledgements

The authors strongly thank Rossana Perrone, Lucía Zubizarreta, Cecilia Jalabert and Michael McGinnis for their assistance during field work. We are very grateful to Laura Quintana, Rossana Perrone, Carlos Passos, Federico Reyes, Bettina Tassino, and Lucía Zubizarreta for their useful discussions during the BERTA Workshop, Cerro del Toro, Piriápolis, Uruguay.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

AQ6 Author contributions

Conceptualization: A.M., A.S.; Methodology: A.M., A.S.; Formal analysis: A.M., A.S.; Investigation: A.M., V.M., P.M., A.S.; Resources: A.M., A.S.; Writing - original draft: A.M., A.S.; Writing - review & editing: A.M., A.S.; Visualization: A.M.; Supervision: A.S.; Project administration: A.M., A.S.; Funding acquisition: A.M., A.S.

Funding

This research was funded by Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Universidad de la República, Uruguay.

AQ7 Data availability**References**

Aguilera, P. A., Castello, M. E. and Caputi, A. A. (2001). Electroreception in *Gymnotus carapo*: differences between self-generated and conspecific-generated signal carriers. *J. Exp. Biol.* **204**, 185-198.

Ardanaz, J. E., Silva, A. and Macadar, O. (2001). Temperature sensitivity of the electric organ discharge waveform in *Gymnotus carapo*. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.* **187**, 853-864.

Batista, G., Zubizarreta, L., Perrone, R. and Silva, A. (2012). Non-sex-biased dominance in a sexually monomorphic electric fish: fight structure and submissive electric signalling. *Ethology* **118**, 398-410.

Bennett, M. V. L., Pappas, G. D., Aljure, E. and Nakajima, Y. (1967). Physiology and ultrastructure of electrotonic junctions. II. Spinal and medullary electromotor nuclei in mormyrid fish. *J. Neurophysiol.* **30**, 180-208.

Black-Cleworth, P. (1970). The role of electrical discharges in the non-reproductive social behaviour of *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Pisces). *Anim. Behav. Monogr.* **3**, 1-77.

Bullock, T., Hopkins, C., Popper, A., Fay, R., Caputi, A., Carlson, B. and Macadar, O. (2005). Electric organs and their control. In *Electroreception*, Vol. **21**, pp. 410-451. Springer New York.

Busza, A., Murad, A. and Emery, P. (2007). Interactions between circadian neurons control temperature synchronization of *Drosophila* behavior. *J. Neurosci.* **27**, 10722-10733.

Capurro, J. (1994). Respuesta de novedad en *Gymnotus carapo*: La frecuencia de un oscilador biológico como manifestación conductual. In *PEDECIBA*. Montevideo.

Caputi, A. A., Aguilera, P. A. and Castello, M. E. (2003). Probability and amplitude of novelty responses as a function of the change in contrast of the reafferent image in *G. carapo*. *J. Exp. Biol.* **206**, 999-1010.

Diez-Noguera, J. (1999). El Temps, version 1. *Software available on the Web*: <http://www.Farmacia.far.ub.es/pub/crono/Eltemps.zip>.

Dunlap, K. D., Smith, G. T. and Yekta, A. (2000). Temperature dependence of electrocommunication signals and their underlying neural rhythms in the weakly electric fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *Brain Behav. Evol.* **55**, 152-162.

Falconi, A., Borde, M., Hernández-Cruz, A. and Morales, F. R. (1995). Mauthner cell-initiated abrupt increase of the electric organ discharge in the weakly electric fish *Gymnotus carapo*. *J. Comp. Physiol. A* **176**, 679-689.

Fontanarrosa, M., Chaparro, G., de Tezanos Pinto, P., Rodriguez, P. and O'Farrell, I. (2010). Zooplankton response to shading effects of free-floating plants in shallow warm temperate lakes: a field mesocosm experiment.

Hagedorn, M. and Heiligenberg, W. (1985). Court and spark: electric signals in the courtship and mating of gymnotoid fish. *Anim. Behav.* **33**, 254-265.

Harper, R. E. F., Dayan, P., Albert, J. T. and Stanewsky, R. (2016). Sensory conflict disrupts activity of the *Drosophila* circadian network. *Cell Rep.* **17**, 1711-1718.

Jun, J. J., Longtin, A. and Maler, L. (2014). Enhanced sensory sampling precedes self-initiated locomotion in an electric fish. *J. Exp. Biol.* **217**, 3615-3628.

Kawasaki, M. and Heiligenberg, W. (1989). Distinct mechanisms of modulation in a neuronal oscillator generate different social signals in the electric fish *Hypopomus*. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.* **165**, 731-741.

Kronfeld-Schor, N., Bloch, G. and Schwartz, W. J. (2013). Animal clocks: when science meets nature. *Proc. Biol. Sci.* **280**, 20131354.

Lissmann, H. (1958). On the function and evolution of electric organs in fish. *J. Exp. Biol.* **35**, 156-191.

Lissmann, H. W. and Schwassmann, H. O. (1965). Activity rhythm of an electric fish, *Gymnorhamphichthys hypostomus*, Ellis. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.* **51**, 153-171.

Migliaro, A. and Silva, A. (2016). Melatonin regulates daily variations in electric behavior arousal in two species of weakly electric fish with different social structures. *Brain Behav. Evol.* **87**, 232-241.

Perrone, R. and Silva, A. C. (2018). Status-dependent vasotocin modulation of dominance and subordination in the weakly electric fish *Gymnotus omarorum*. *Front. Behav. Neurosci.* **12**, 1.

Perrone, R., Migliaro, A., Comas, V., Quintana, L., Borde, M. and Silva, A. (2014). Local vasotocin modulation of the pacemaker nucleus resembles distinct electric behaviors in two species of weakly electric fish. *J. Physiol. Paris* **108**, 203-212.

Pittendrigh, C. S. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **25**, 159-184.

Quintana, L., Silva, A., Berois, N. and Macadar, O. (2004). Temperature induces gonadal maturation and affects electrophysiological sexual maturity indicators in *Brachyhyopomus pinnicaudatus* from a temperate climate. *J. Exp. Biol.* **207**, 1843-1853.

Refinetti, R., Cornélissen, G. and Halberg, F. (2007). Procedures for numerical analysis of circadian rhythms. *Biol. Rhythm. Res.* **38**, 275-325.

Richer-de-Forges, M. M., Crampton, W. G. R. and Albert, J. S. (2009). A new species of *Gymnotus* (Gymnotiformes, Gymnotidae) from Uruguay: description of a model species in neurophysiological research. *Copeia* **2009**, 538-544.

Silva, A., Quintana, L., Galeano, M. A. and Errandonea, P. (2003). Biogeography and breeding in gymnotiformes from Uruguay. *Environ. Biol. Fishes* **66**, 329-338.

Silva, A., Perrone, R. and Macadar, O. (2007). Environmental, seasonal, and social modulations of basal activity in a weakly electric fish. *Physiol. Behav.* **90**, 525-536.

Stoddard, P. K. (2002). The evolutionary origins of electric signal complexity. *J. Physiol. Paris* **96**, 485-491.

Stoddard, P. K., Markham, M. R., Salazar, V. L. and Allee, S. (2007). Circadian rhythms in electric waveform structure and rate in the electric fish *Brachyhyopomus pinnicaudatus*. *Physiol. Behav.* **90**, 11-20.

Tomotani, B. M., Flores, D. E. F. L., Tachinardi, P., Paliza, J. D., Oda, G. A. and Valentinuzzi, V. S. (2012). Field and laboratory studies provide insights into the meaning of day-time activity in a Subterranean Rodent (*Ctenomys* aff. *knights*), the Tuco-Tuco. *PLoS ONE* **7**, e37918.

Zupanc, G. K. H. (2001). Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *Brain Behav. Evol.* **58**, 250-275.

Summary: The nocturnal increase of electric behavior in *Gymnotus omarorum* is analyzed in the wild, in constant darkness and social isolation. This daily trait is independent of locomotor activity and modulated by social context.

Funding details

S.No.	Funder name	Funder ID	Grant ID
1	Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas		