



**Universidad de la República
Licenciatura en Biología Humana**



Informe de Pasantía de Grado

**El Núcleo Marcapaso de *Gymnotus omarorum*:
Caracterización de la Variabilidad de un Modelo de Oscilador
Neural en Vertebrados.**

Magdalena Vitar

Laboratorio de Neurofisiología Celular & Sináptica, Departamento de Fisiología,
Facultad de Medicina, UDELAR

Tutor: Michel Borde

Orientador de Pasantía: Michel Borde

Co-orientador: Virginia Comas

Agradecimientos.

Quiero dedicar un agradecimiento muy especial a mi tutor Michel Borde. Porque su compromiso como orientador estuvo presente de manera cotidiana en cada paso de mi formación. Porque su rigor académico y su profunda calidez humana conviven de la mano generando en todo momento un terreno fértil para mi crecimiento personal y profesional.

A mi co-orientadora Virginia Comas. A mi compañera Carolina Acordagoitia. A mis queridísimos amigos Esteban Pino y Lucía Zubizarreta porque su apoyo y compañerismo convierten las dificultades en desafíos y el trabajo cotidiano en una aventura colectiva. A mis padres y hermanos por respaldarme incondicionalmente. A mi novio Pablo por tanta paciencia.

El Núcleo Marcapaso de *Gymnotus omarorum*: Caracterización de la Variabilidad de un Modelo de Oscilador Neural en Vertebrados.

Palabras Clave

Glutamato, GABA, Eferencia rítmica, Órgano eléctrico, Pez eléctrico, Núcleo Electromotor Bulbar (NEB), Descarga del órgano eléctrico.

Resumen

El presente trabajo se encuentra inscripto en el marco general del estudio de la variabilidad de la actividad rítmica en osciladores neurales. Estos últimos forman parte de un conjunto más amplio, los osciladores biológicos (de los cuales el corazón es el más estudiado en la actualidad), generadores de ritmos inherentes a una multiplicidad de procesos fisiológicos. El estudio de los osciladores neurales constituye un campo de creciente interés. Asimismo, el estudio de la variabilidad de las eferencias generadas por los osciladores neurales brinda claves para la comprensión de su organización anatómo-funcional y de los mecanismos implicados en su desempeño.

En *Gymnotus omarorum*, pez eléctrico sudamericano, el núcleo electromotor bulbar (NEB) es la estructura neural origen del comando electromotor para la descarga del órgano eléctrico (DOE). Se acepta que el NEB es un oscilador neural cuyas células marcapaso (cMP) generan una descarga rítmica sincrónica. Este comando es capaz de organizar a través de una compleja vía de transmisión, la actividad concertada de centenares de electrocitos, células musculares modificadas, a lo largo del cuerpo del animal generando una descarga eléctrica con un curso temporal estereotipado característico de la especie. La frecuencia de la DOE está determinada por la frecuencia de descarga de las cMP. El NEB constituye una estructura neural relativamente sencilla, bien estudiada y accesible a las técnicas habituales de laboratorio que permite ensayar diversos abordajes experimentales lo que lo proyecta como un modelo de elección para avanzar en el conocimiento de los osciladores neurales.

En este trabajo se llevó a cabo, en primera instancia, una caracterización de la variabilidad del intervalo de la DOE del animal en reposo a través de la implementación de un conjunto herramientas estadísticas comúnmente utilizadas en el análisis de la variabilidad de la frecuencia cardíaca (VFC). En una segunda etapa, utilizando técnicas electrofisiológicas en animales inmovilizados, se llevaron a cabo registros simultáneos de actividad eléctrica de la DOE y la descarga del NEB (dNEB) para determinar en qué medida la línea de transmisión interpuesta entre el NEB y el órgano eléctrico (OE) aporta variabilidad al intervalo de la DOE. Aplicamos las mismas herramientas estadísticas para la caracterización de la variabilidad de la frecuencia a ambas señales, con el objetivo de comparar el desempeño del sistema electrogenerador a dos niveles de su organización jerárquica y evaluar la calidad y fidelidad de la DOE como indicador del desempeño del NEB como oscilador biológico.

Encontramos que, en el animal en reposo, la DOE constituye una señal rítmica robusta, en la que la variabilidad del intervalo es llamativamente baja en comparación con la que exhiben otros osciladores biológicos. No encontramos diferencias significativas en los parámetros estadísticos de variabilidad del intervalo de la dNEB y de la DOE lo que

indica la fidelidad y alto factor de seguridad de la línea de transmisión entre el NEB y el OE pese a su extrema complejidad circuital y hace posible que el desempeño del NEB como oscilador neural pueda ser analizado a través del registro de la DOE. Dado el carácter no invasivo y técnicamente sencillo de este tipo de registro, este puede ser obtenido en diferentes situaciones comportamentales haciendo posible analizar indirectamente el desempeño del NEB en múltiples circunstancias experimentales y conductuales.

Introducción

I- Osciladores biológicos

Los osciladores son unidades funcionales en las que de la interacción de las partes que los componen emerge un fenómeno periódico. Llamamos osciladores biológicos a aquellas estructuras implicadas en la generación de ritmos biológicos. Existen numerosos ejemplos de la participación de dichos ritmos en una multiplicidad de procesos fisiológicos indispensables para la vida. Algunos participan de la generación de patrones motores, como los implicados en la masticación, la locomoción y la respiración (Harris-Warrick, 2010; Calabrese, 1998). En el tracto gastrointestinal, el patrón rítmico generado por las células intersticiales de Cajal (conocido como patrón de ondas lentas) constituye el sustrato electrofisiológico que subyace a la generación de movimientos peristálticos que movilizan el bolo intestinal (Thuneberg et al.; 1983; Drumm & Baker 2016). La actividad rítmica del núcleo supraquiasmático del hipotálamo (responsable de la generación del ciclo circadiano) participa de la modulación rítmica de la actividad de otros núcleos hipotalámicos, imprimiendo un patrón circadiano a la secreción de ciertas hormonas producidas por el eje hipotalámico-hipofisario (Carpenter, 1982). La actividad rítmica de la bomba cardíaca está determinada por la actividad marcapaso de las células del nodo sinoauricular. La ubicuidad de los mecanismos generadores de patrones rítmicos así como la importancia fisiológica de los procesos en los que están implicados, hacen del estudio de los osciladores biológicos un área de interés particular para la Biología contemporánea.

El marcapaso cardíaco constituye uno de los osciladores biológicos más estudiados. En este caso resulta sencillo identificar una estructura, el nodo sinoauricular, de cuyas propiedades electrofisiológicas (excitabilidad y automatismo) emerge la frecuencia cardíaca como un ritmo biológico que puede ser modulado por una serie de mecanismos que actúan sobre dicha red de células excitables (Ledrer, 2012). Osciladores neurales circuitales, como el NEB de *G. omarorum*, se componen generalmente de redes neuronales de cuyas propiedades electrofisiológicas y las características de conectividad de la red, emerge una referencia periódica (Buzaki, 2006). Sin embargo los ritmos biológicos no siempre pueden atribuirse a la actividad concertada de las células de una estructura concreta, sino que constituyen una característica emergente de la actividad de sistemas fisiológicos complejos. Tal es el caso de los ritmos circadianos, o del ciclo sexual femenino (Winfree, 2001). Más aún, la mayor parte de los mecanismos involucrados en la generación de estos patrones rítmicos indispensables para la vida, están lejos de ser dilucidados.

Los osciladores biológicos más estudiados se engloban mayoritariamente dentro de la categoría de “osciladores de ciclo límite”. En la representación gráfica del plano de fase (phase plane plot) que ilustra la relación entre dos variables de estos sistemas dinámicos

(V_m y dV_m/dt , p. ej, en un oscilador celular) el comportamiento rítmico del oscilador sigue una trayectoria que suele ser elíptica o circular (Hutcheon & Yarom, 2000). Luego de ocurrida una perturbación que desvíe el desempeño de estos osciladores de su trayectoria, el comportamiento del oscilador retornará a describir la trayectoria original. Los osciladores de ciclo límite suelen ser de dos tipos: Osciladores harmónicos o pendulares y los no harmónicos en donde la eferencia ocurre luego de una fase de preparación, o acumulación de energía (oscilador de tipo van der Pol, Buzaki, 2006).

Para osciladores neurales los mecanismos que hacen posible la generación de una señal rítmica pueden operar a nivel celular y/o circuital. En osciladores circuitales integrados por una red neuronal donde las células aisladas carecen de actividad marcapaso, la señal rítmica puede emerger de las características funcionales de la red, i.e. patrones de conectividad y características dinámicas de las sinapsis involucradas. Asimismo, en determinadas circunstancias, las neuronas -y otras células excitables- se comportan como osciladores de ciclo límite de tipo van der Pol. En osciladores celulares el repertorio de conductancias de membrana de las neuronas con actividad rítmica intrínseca puede determinar la existencia de oscilaciones periódicas de su potencial de membrana. Ambos mecanismos (celular y circuital) no son mutuamente excluyentes de modo que un oscilador neural puede estar conformado por células cuyo potencial de membrana oscila intrínsecamente, pero la conectividad circuital (a través por ejemplo de uniones gap) logra amplificar dichas oscilaciones. Como resultado se obtiene un oscilador circuital donde la población de neuronas presenta una descarga repetitiva sincrónica. (Hutcheon & Yarom, 2000).

En el corazón, las células principales del nodo sinoauricular presentan características electrofisiológicas únicas que les confieren la propiedad de automatismo, incluso aisladas en cultivo (Nathan, 1986). Así, el intervalo entre dos potenciales de acción cardíacos se caracteriza por un potencial de membrana que se despolariza progresivamente (potencial marcapaso) hasta alcanzar el nivel de disparo. El disparo de un potencial de acción es condición necesaria y suficiente para que una vez finalizada la repolarización, el potencial de membrana comience a despolarizarse progresivamente y de inicio a un nuevo ciclo de actividad (Boron, 2012). Si bien se desconoce aún si las cMP del NEB presentan descarga rítmica una vez aisladas de la red, el registro intracelular de estas neuronas obtenido *in vivo* (Curti et al., 2006; Bennett et al., 1967) e *in vitro* (Comas & Borde, 2012; 2016; Quintana et al., 2014) revela la existencia de un potencial marcapaso típico precediendo a la descarga de un potencial de acción.

II- Herramientas para el análisis de la variabilidad en osciladores biológicos.

El análisis de la variabilidad de la secuencia temporal de los eventos rítmicos constituye un abordaje accesible, a través del cual se puede caracterizar el desempeño de los osciladores biológicos mediante la utilización de herramientas estadísticas relativamente sencillas. Dicha caracterización, aún cuando no se conozcan los mecanismos implicados en la generación o modulación de la actividad periódica de un oscilador, permite evaluar el desempeño del mismo así como el estado funcional de los mecanismos de control de la actividad rítmica. Testimonio de esto es el estudio de la VFC y su aplicación en la clínica como herramienta diagnóstica y pronóstica de ciertas patologías en el ser humano (Pascale et al., 1996; Nunan et al., 2010).

Para abordar el análisis de la variabilidad en la frecuencia de la DOE y la dNEB hemos hecho acopio de las herramientas corrientemente utilizadas para el estudio de la VFC, tomando en cuenta que el oscilador cardíaco constituye uno de los osciladores biológicos mejor caracterizados en la actualidad (Mansier, 1996). Además, hemos incluido en nuestro análisis el cálculo de parámetros estadísticos básicos, propios de la estadística descriptiva, como la elaboración de histogramas de intervalos de primer orden y el cálculo del coeficiente de asimetría de su distribución (coeficiente de asimetría de Fisher), herramientas que proporcionaron información cualitativa valiosa respecto del origen de la variabilidad cuantificada a través del coeficiente de variación.

Para evaluar cuantitativamente la variabilidad de los intervalos en el dominio del tiempo utilizamos un conjunto de medidas de dispersión (varianza, desvío estándar y coeficiente de variación). Éstos parámetros permiten cuantificar la dispersión en la distribución estadística de una población de datos o espacio muestral. En el contexto de esta pasantía, el espacio muestral al que aplicamos éstas medidas está constituido por el listado de intervalos de primer orden o tacograma (de la DOE y dNEB). En dichas condiciones las medidas de dispersión son indicativas de la variabilidad de los intervalos entre los eventos sucesivos.

a- Análisis de la variabilidad en el dominio del tiempo

Tacograma. Constituye uno de los pasos iniciales en el estudio de series temporales. Se trata de un gráfico de intervalos en función del tiempo de ocurrencia de los eventos. La inspección de este gráfico permite apreciar las diferencias entre eventos sucesivos en el tiempo y hacer una evaluación primaria de su variabilidad. Con los ajustes necesarios, el tacograma puede ser evaluado mediante herramientas más complejas, como lo es el análisis espectral (ver más adelante; Pascale, 1996).

Histograma de intervalos. El histograma de intervalos de primer orden expresa el número de intervalos en función de las magnitudes de éstos expresadas en rangos discretos. Este histograma refleja la probabilidad de ocurrencia de los eventos dentro de dichos rangos y permite evaluar el grado de periodicidad de una serie temporal. La dispersión en el histograma aplicado a series temporales se relaciona con la variabilidad de éstas. Cuanto mayor sea la dispersión consideraremos que la frecuencia de la señal presenta mayor variabilidad y por lo tanto que la señal es menos periódica (García-Austt & Buño, 1980).

Coefficiente de asimetría de Fisher (CAF). Cuantificación del sesgo de una distribución. Este parámetro es distinto de cero cuando la distribución de los datos difiere de una distribución normal por lo que la media difiere de la mediana (el valor central en la serie de datos ordenados de menor a mayor). Cuando esto sucede, una de las colas de la distribución abarca un rango mayor que la otra apareciendo un sesgo hacia la izquierda (CAF negativa) o un sesgo hacia la derecha (CAF positiva). Estadísticamente se puede hallar el parámetro g_1 como medida de CAF, según:

$$g_1 = \frac{\sum[(x - \bar{x})^3]}{n \cdot \sigma^3}$$

Siendo cada x una de las magnitudes asumidas por uno o más datos de la serie; \bar{x} el

valor medio de la serie, n el número total de datos de la serie y σ el desvío estándar de la serie de datos (ver más adelante).

Media: De una serie de datos numéricos, puede hallarse el valor medio (\bar{x}) como la suma de todos los datos ($\sum x$) sobre el número total de datos de la serie (n), según:
$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$
 (Sokal & Rohlf, 1981).

Varianza: La varianza (σ^2) de una serie de datos numéricos se define como:

$$\sigma^2 = \frac{\sum [f \cdot (x - \bar{x})^2]}{n}$$

Siendo f la frecuencia de una magnitud x de la serie, es decir, el número de datos que asumen el valor x en la serie.

La varianza es una medida de la dispersión: su magnitud es directamente proporcional a la dispersión de los datos de una serie con respecto al valor de la media. (Sokal & Rohlf, 1981).

Desvío estándar (DE). El desvío estándar (σ) es una medida de dispersión frecuentemente utilizada para series de datos que se ajustan a una distribución normal, y se define como la raíz cuadrada de la varianza. Para una distribución normal, representada por una campana de Gauss, el rango determinado por $[\bar{x} \pm \sigma]$ concentra una probabilidad del 68%, mientras que $[\bar{x} \pm 3\sigma]$ concentra el 99% abarcando prácticamente todo el rango de la distribución. (Sokal & Rohlf, 1981).

Coefficiente de variación. Si bien el desvío estándar nos permite estimar la variabilidad en una población de datos, si deseáramos comparar variabilidad entre distintas poblaciones de datos cuya media difiere, necesitaríamos recurrir a otro parámetro estadístico. Para comparar la variabilidad relativa de series de datos con medias distintas puede usarse el coeficiente de variación (CV) según:

$$CV = \sigma / \bar{x}$$

Root Mean Square of the Successive Difference (RMSSD). Se trata de la raíz cuadrada de la media de las diferencias entre intervalos sucesivos de una serie elevadas al cuadrado. Este parámetro estadístico constituye una manera de cuantificar la variabilidad de alta frecuencia de series temporales y es frecuentemente utilizado como indicador de la VFC (Bernston et al., 2005).

b- Análisis no lineal: Diagramas de Poincaré.

El gráfico se elabora representando la correlación entre eventos sucesivos, de manera que cada evento (n) se grafica contra el siguiente ($n+1$). El área de dispersión de la nube de puntos así generada guarda relación con la variabilidad de la serie de datos, y puede objetivarse a través del ajuste de una elipsoide cuyos radios son los parámetros SD1 y SD2.

Dicha elipse se encuentra orientada según la línea de identidad ($n_j = n_{j+1}$). Así, SD1, el radio menor de la elipse, representa el desvío estándar de los puntos perpendicularmente a la línea de identidad y refleja la variabilidad de alta frecuencia, mientras que SD2 representa el desvío estándar de los puntos a lo largo de la línea de identidad, asociándose con la variabilidad de baja frecuencia (Brennan et al. 2001). Asimismo los parámetros SD1 y SD2 se relacionan con el DE y la RMSSD (Brennan et al. 2001), según:

$$SD2 = \sqrt{2 \cdot DE^2 - 1/2 \cdot RMSSD^2}$$

$$SD1 = \sqrt{2 \cdot DE^2 - SD2^2}$$

c- Análisis en el dominio de la frecuencia: análisis espectral

Se denomina análisis espectral al conjunto de métodos utilizados para estimar la función de densidad espectral de una determinada serie temporal. Una de estas herramientas es el periodograma (gráfico de potencia en función de la frecuencia) (Chatfield, 1984; Warner, 1998).

El diagrama de Fourier es un periodograma clásico derivado de la aplicación de la Transformada Rápida de Fourier (FFT de Fast Fourier Transform) a una señal continua. Se trata de un gráfico de potencia en función de la frecuencia. La aplicación de esta herramienta al tacograma permite cuantificar la magnitud de la variabilidad de la serie temporal, para cada uno de los rangos de frecuencia considerados (Chatfield, 1984; Warner, 1998).

La utilización de estas herramientas de análisis adaptadas al estudio del sistema electrogenerador de *Gymnotus omarorum* permite comenzar a explorar el desempeño del NEB como oscilador neural, avanzar en la comprensión de los mecanismos neurales responsables de la elaboración de la eferencia rítmica del sistema electrogenerador y de aquellos implicados en la modulación de su actividad. El análisis del desempeño del NEB a través del registro de la DOE requiere de la evaluación previa de la fidelidad en la transmisión de la vía neural interpuesta entre el NEB y el OE, aspecto que fue abordado específicamente en esta pasantía.

III- *Gymnotus omarorum* como modelo experimental.

G. omarorum es un pez eléctrico de pulso: emite descargas eléctricas débiles al entorno (la DOE) que se caracterizan por presentar intervalos entre descargas más prolongados que la duración de las mismas. El NEB de *G. omarorum* es un oscilador neural, generador del comando rítmico para la DOE. La DOE cumple dos funciones: forma parte de un sistema sensorial activo (electrorrecepción activa), probablemente el sistema sensorial más importante para en estas especies, y de un sistema de comunicación intraespecífico (electrocomunicación).

El sistema de **electrorrecepción activa** en peces eléctricos consta de un sector

responsable de la emisión de pulsos eléctricos (sistema electromotor) y de un sistema electrosensorial capaz de detectar y procesar la información derivada de los pulsos eléctricos emitidos. Dichos pulsos serán distorsionados a causa de la heterogeneidad en la impedancia eléctrica del entorno y la señal distorsionada es detectada por electrorreceptores ubicados en la piel del animal (Lissman & Machin, 1958). El perfil espacial y temporal de las corrientes transcutáneas que son moduladas por estas impedancias forma en la piel del animal una “imagen eléctrica” que será transducida por los electrorreceptores y procesada por los distintos elementos neurales del sistema electrosensorial que median la percepción de objetos del entorno (Lissman, 1951). Incrementos de la frecuencia de la DOE como resultado de la modulación de la descarga del NEB se asocian a incrementos de la frecuencia en la adquisición de la información de imagen eléctrica contribuyendo a aumentar la discriminación temporal del sistema sensorial (Caputi et al., 2005).

La DOE cumple también un rol social en peces eléctricos. Modulaciones tanto en la frecuencia como en la forma de onda de la DOE constituyen señales sociales para la interacción entre individuos de la misma especie. Estas modulaciones resultan de la activación específica de estructuras premarcapaso que proyectan al NEB y modulan su actividad. Dependiendo de la especie, este tipo de señales puede emitirse por ejemplo durante el cortejo y en encuentros agonistas para señalar el status social (Caputi et al., 2005),

Lo antedicho pone en evidencia la importancia que tiene la DOE para la vida de estos animales. Esta señal es emitida de manera continua por el animal durante toda su vida. En reposo, muestra una frecuencia de aproximadamente 25 Hz y una baja variabilidad lo que sugiere la robustez de los mecanismos responsables de su generación. Asimismo debe ser suficientemente versátil para dar lugar a la modulación rápida de la forma de onda y el ritmo de la descarga satisfaciendo las necesidades que impone el entorno. Un ejemplo de esto es el incremento abrupto de la frecuencia de descarga de la DOE durante la respuesta de escape en *G. omarorum* (Falconi et al., 1995, 1997; Comas & Borde, 2010), que se postula podría contribuir a un incremento de la frecuencia de muestreo del entorno para facilitar la selección de la trayectoria de escape.

IV- El NEB como oscilador y el mecanismo de generación de la DOE.

El NEB está constituido por dos tipos neuronales diferentes: células marcapaso (cMP) y células relé (cR). Las cMP descargan sincrónicamente de manera rítmica a la frecuencia de la DOE y constituyen el verdadero oscilador del NEB. Existen evidencias que sugieren la existencia del acoplamiento electrotónico entre las células del NEB, si bien se desconoce aún el arreglo circuital de conexiones entre los dos tipos celulares que lo integran aunque las evidencias apuntan a que las cMP se encuentran acopladas entre sí y estas con las cR (Comas & Borde, 2012; 2016). Este aspecto se encuentra actualmente bajo investigación en el laboratorio donde se desarrolla el presente trabajo. Cada descarga de la población de cMP se corresponde con una descarga de las células cR, exhibiendo un patrón de descarga “uno a uno”. Las cR realizan el relevo de la descarga marcapaso, proyectando sus axones caudalmente a lo largo de la médula espinal sobre las electromotoneuronas (EMNs) a través de contactos sinápticos de tipo mixto (químico-eléctrico) "en passant" que han sido poco estudiados (Trujillo-Cenóz et al., 1987). Las EMNs, a su vez transmiten el comando a los electrocitos, que componen el

OE (fig. 1), a través de contactos sinápticos químicos colinérgicos cuyas peculiaridades no serán detalladas en el presente trabajo. El reclutamiento espacial y temporalmente organizado de cientos de electrocitos tiene como resultado la generación de la DOE con su forma de onda característica de la especie. Se trata de una señal periódica de secuencia temporal estereotipada. Cuando se analiza un registro bitópico cabeza - cola del animal pueden reconocerse cuatro fases V1, V2, V3 y V4 (Fig. 2).

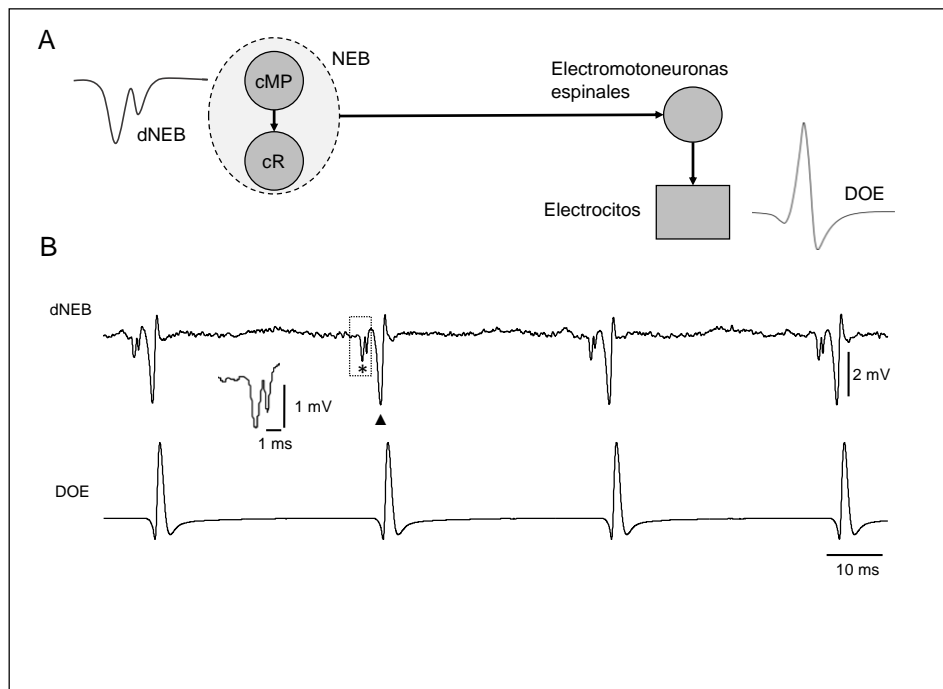


Figura 1. Representación esquemática de la organización general del sistema electrogenerador en *Gymnotus omarorum*. **A**, El núcleo electromotor bulbar (NEB) se encuentra integrado por dos poblaciones de neuronas: células marcapaso (cMP) origen del comando rítmico para la DOE y células relé, (cR). El comando originado en las cMP es relevado por las cR que proyectan sus axones a través de la médula espinal para reclutar a las electromotoneuronas que inervan a los electrocitos del OE. Se representan esquemáticamente: a izquierda el potencial de campo generado por la actividad rítmica del NEB adquirido en la vecindad de las cMP (dNEB) y una DOE a la derecha, eferencia del sistema electrogenerador. **B**, Se muestran dos registros simultáneos de dNEB (trazado superior) y DOE (trazado inferior) donde se puede evidenciar la descarga rítmica del NEB y su relación uno a uno con la DOE. La flecha negra señala la deflexión correspondiente al artefacto generado por la DOE en el registro de campo del NEB. La porción de la señal incluida en el recuadro corresponde al registro de la actividad sincrónica marcapaso (primera deflexión negativa, marcada con un asterisco) y relé (segunda deflexión negativa). Dicha porción del registro se encuentra ampliada debajo.

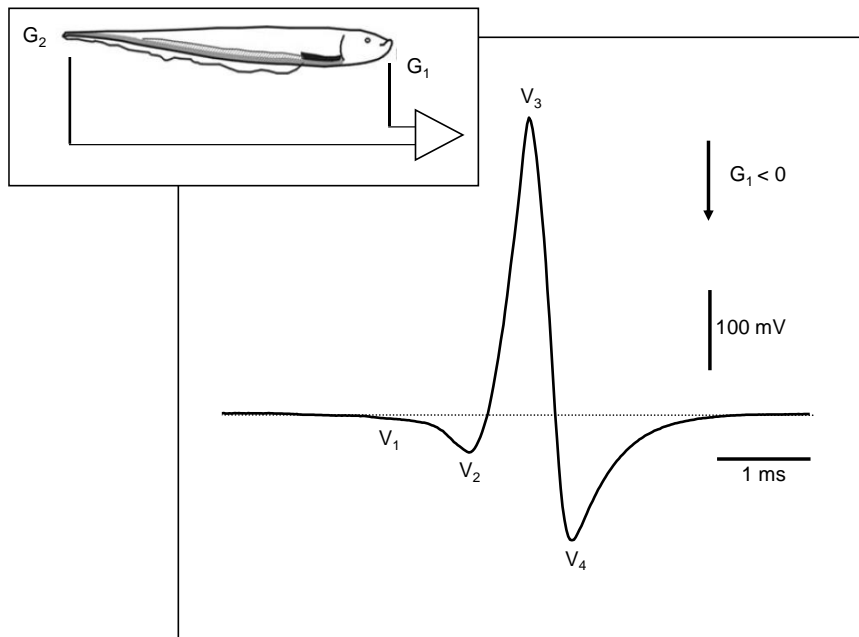


Figura 2. Descarga del OE en *Gymnotus omarorum*. Registro diferencial bitópico cabeza – cola (G1-G2 izquierda, arriba) donde se indican las cuatro fases estereotipadas características de esta especie: V1, V2, V3, V4. Asimismo, la duración de la DOE es también estereotipada (~3ms), poniendo de manifiesto la sincronización en la actividad de cientos de células efectoras implicadas en el desarrollo de esta respuesta eléctrica de secuencia temporal compleja. La negatividad de G1 respecto de G2 se representa como deflexiones del registro hacia abajo (calibración arriba, derecha). Modificado de Borde et al., 2004.

En los Gymnotiformes de pulso los electrocitos ubicados en distintas zonas del órgano eléctrico difieren en su densidad, tamaño, patrón de innervación y propiedades electrofisiológicas (Macadar et al., 1989). Dichos electrocitos se encuentran contenidos dentro de vainas conectivas (Tubos dobles, T1 a T4 con simetría bilateral), y dispuestos dentro de estas vainas con la misma orientación de manera de promover la suma de las diferencias de potencial generadas por las corrientes que resultan de la estimulación de las caras (rostrales y/o caudales) de estas células (Caputi, 1999b) (fig. 3).

Asimismo, el patrón de innervación de los electrocitos es complejo y determina la secuencia temporal y espacial del reclutamiento de poblaciones de células efectoras para la organización de la DOE. Se distinguen tres regiones funcionales del OE: i.e. las porciones anterior, central y posterior. Los electrocitos de las porciones central y posterior son innervados en su cara caudal por axones de los nervios electromotores posteriores (PEN), en tanto que las caras caudales de los electrocitos en la porción anterior son innervadas por axones que proceden de los nervios electromotores anteriores (AEN). Las caras anteriores de los electrocitos doblemente innervados (ubicados en la porción anterior y central de T1) reciben innervación de los nervios segmentarios 5 al 7 (Trujillo-Cenóz & Echagüe, 1989; Caputi, 1999b). (Fig. 3).

Cabe destacar que para comprender cabalmente la complejidad del patrón de innervación que reciben los electrocitos del OE resulta necesario hacer referencia a las particularidades de la organización funcional de las EMNs a nivel espinal. A este nivel

de organización existe una serie de características anátomo-funcionales decisivas para la organización de la respuesta eléctrica.

El OE cuenta con una representación espacial medular acortada. Además, las motoneuronas de sectores medulares relativamente pequeños (5% del largo total del animal) son responsables de la inervación de porciones extensas del OE (aprox. 20% del largo del animal). Las EMNs en dichas porciones medulares se encuentran organizadas formando arreglos funcionales de activación secuencial rostro-caudal, reclutando ordenadamente a los electrocitos inervados por éstas (Caputi & Trujillo-Cenóz, 1994). El alto nivel de solapamiento de las regiones espinales que controlan los distintos sectores del OE podría ser de importancia para la secuencia temporal de reclutamiento de regiones funcionales del OE.

Para agregar complejidad al sistema, en la médula espinal fueron identificados dos tipos morfológicamente diferentes de EMNs. En tanto que las EMNs pequeñas son responsables de la inervación de las caras anteriores de los electrocitos, las EMNs grandes son responsables de la inervación de las caras caudales (fig. 3). Este arreglo resulta particularmente interesante, puesto que permitió postular un mecanismo para la activación temporalmente ordenada de las caras rostral y caudal de los electrocitos doblemente inervados, como resultado del reclutamiento de EMNs pequeñas previo al reclutamiento de EMNs grandes, en consonancia con el principio de reclutamiento de Hennemann para las unidades motoras. (Caputi & Trujillo-Cenóz, 1994).

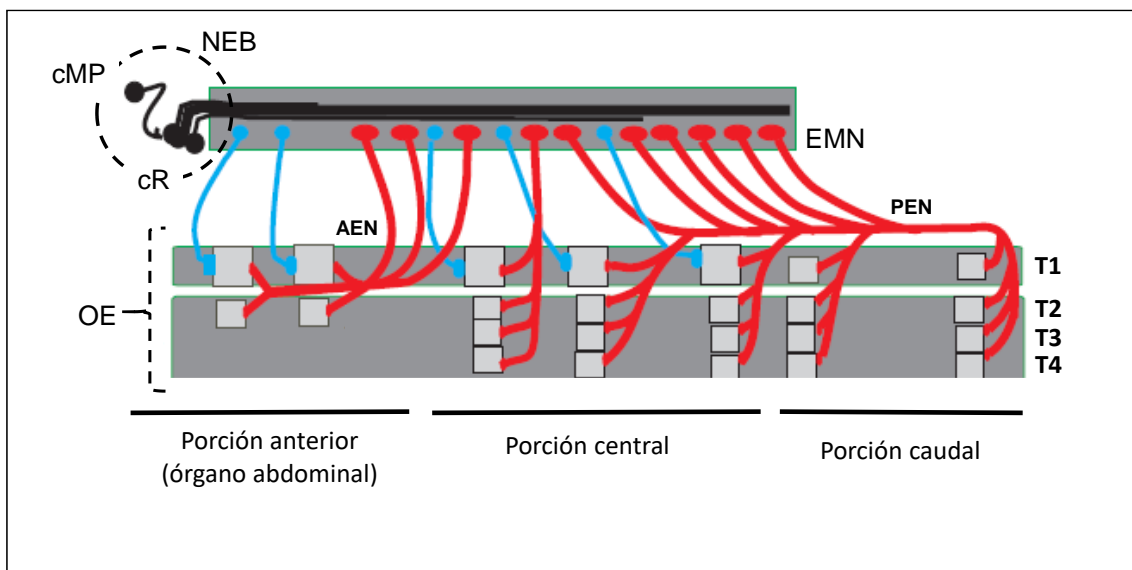


Figura 3. Representación esquemática de la estructura y la inervación del OE en *Gymnotus omarorum*. El órgano eléctrico se compone de cuatro pares de tubos con simetría bilateral: T1, T2, T3 y T4. Mientras que T1 y T2 ocupan la porción anterior, central y caudal del órgano eléctrico y se ubican en una posición dorsal del mismo, T3 y T4 se originan a nivel del extremo anterior de la aleta anal y se extienden caudalmente ocupando las porciones central y caudal del OE, donde se ubican ventrales respecto de T1 y T2. Algunos electrocitos se encuentran inervados exclusivamente en su cara caudal (monoinervados por los nervios electromotores anteriores -AEN- o posteriores -PEN-) y otros son inervados tanto en su cara caudal (AEN o PEN) como en la rostral (por los nervios segmentarios 5 a 7), i.e. doblemente inervados. Así, los electrocitos de T1 se encuentran doblemente inervados en las porciones anterior y central del OE, pero son monoinervados en la porción caudal. Los electrocitos de T2, T3 y T4 se encuentran solamente monoinervados. Modificado de Caputi, 1999.

De lo expuesto más arriba se destaca la complejidad circuital que subyace a la generación de la DOE en respuesta al comando sincrónico emergido del NEB. En el contexto de la generación de una señal como la DOE, que emerge de la articulación de la respuesta a niveles de organización sucesivos altamente complejos resulta sorprendente que su secuencia temporal sea estereotipada, y su frecuencia igual a la de la descarga del oscilador neural que la comanda. En el presente trabajo nos propusimos indagar en qué medida esta sofisticada línea de transmisión podría aportar variabilidad a la inherente del propio oscilador.

Cabe destacar que caracterizar la variabilidad del comportamiento rítmico del NEB, indispensable para la caracterización de su desempeño como oscilador, permitirá comprender cómo su eferencia rítmica puede ser modulada en distintos contextos fisiológicos. Sin embargo, a los efectos de evaluar su desempeño mediante técnicas de registro no invasivas (i.e. registro bitópico de la DOE) y en los más variados contextos conductuales, es imprescindible evaluar en primera instancia que tan fiel es la línea de transmisión entre el NEB y el OE. Esto es, dilucidar en qué medida la secuencia temporal de la DOE reproduce fielmente la del comando que la origina (dNEB).

Objetivos

- Poner a punto la utilización de herramientas estadísticas que permitan analizar cuantitativa y cualitativamente la variabilidad de la frecuencia de la eferencia rítmica del sistema electrogenerador, i.e. la DOE.
- Aplicar estas herramientas para explorar la fidelidad de línea de transmisión entre el NEB y el OE evaluando su eventual aporte a la variabilidad del intervalo de la DOE.

Materiales y Métodos

La colecta y manipulación experimental de los animales, así como la obtención de los datos experimentales se realizó en función de lo descrito por otros autores (Comas & Borde, 2010). Todos los protocolos experimentales mencionados cuentan con la aprobación de la CHEA, UDELAR, para su realización (Exp. 071140-000105-13; Exp. 071140-000092-13).

Los peces fueron colectados en la Laguna del Sauce (Departamento de Maldonado, Uruguay), y alojados en jaulas individuales dentro de peceras con capacidad 500L, durante al menos 10 días previamente a su utilización.

Obtención de datos:

1. Registro cabeza-cola de la DOE en el animal en reposo.

En relación al objetivo 1, se realizaron experimentos de registro de la DOE del animal

en reposo. En total fueron reunidos datos de 25 animales para ésta etapa.

Los animales fueron ingresados al laboratorio en peceras individuales al menos 24hs antes del registro de la DOE, para promover su familiarización con el ambiente de registro. Se los registró durante el día (período de reposo ya que se trata de animales con hábitos nocturnos). Los registros fueron obtenidos en momentos en que los animales permanecían en reposo aparente (no se constataban movimientos del animal en la inspección visual). En estas condiciones se registró la DOE durante un período de tiempo de aproximadamente un minuto. Se procedió entonces a obtener un registro bitópico de la DOE con el electrodo G1 próximo a la cabeza y el electrodo G2 próximo a la cola del animal, ambos electrodos alineados con el eje longitudinal del animal (Fig. 2).

2. Registros simultáneos de la DOE y dNEB *in vivo*.

Para el análisis del eventual aporte de la línea de transmisión a la variabilidad del intervalo de la DOE (objetivo 2) se procedió al registro simultáneo de la dNEB y de la DOE en experimentos terminales. La eutanasia se realizó mediante enfriamiento brusco del animal o una sobredosis de MS222 (protocolo Exp. 071140-000092-13). Los animales debidamente preparados (ver más adelante) fueron colocados en una caja de registro sobre una esponja húmeda y cubiertos por una lámina húmeda de algodón, donde se perfundió agua a través de las branquias y fueron sujetos por la cabeza mediante puntas de fijación. Las zonas de sujeción y las áreas quirúrgicas fueron infiltradas con anestésico local (Lidocaína, 2%).

Se realizaron experimentos de registro simultáneo de la DOE y dNEB. Para ello los animales fueron curarizados (d-Tubocurarina, 1-3 $\mu\text{g/g}$; im) con dosis capaces de provocar la parálisis del animal sin abolir completamente la DOE. En algunos casos (n=2) los animales fueron anestesiados con pentobarbital (30 $\mu\text{g/g}$). Fueron incluidos en el análisis los datos obtenidos de un total de 22 animales.

Registro de DOE: En estas condiciones la DOE fue monitorizada continuamente mediante el registro cabeza-cola utilizando dos electrodos de metal con la configuración detallada más arriba.

Registro de dNEB: A través de una craneotomía se expuso la superficie dorsal del tronco encefálico y el sector más caudal del cerebelo y del lóbulo eléctrico, permitiendo el acceso de micropipetas al NEB ($\sim 3 \text{ M}\Omega$). La solución contenida en las micropipetas fue NaCl (154 mM; 0.9%). Se bajó el microelectrodo verticalmente en sentido dorsoventral para encontrar el NEB a través de la identificación del perfil de actividad eléctrica característica de la actividad de campo en distintas regiones (Curti et al., 1999; 2006) (fig. 4), y se registró en la región marcapaso a nivel de las cMP, localización definida como 0μ que se utilizó como referencia para estimar la distancia a lo largo del eje dorso-ventral a nivel de la línea media en la que es posible obtener registros de la dNEB (Fig. 4). Para bajar las pipetas de registro utilizamos un micromanipulador (Sutter Instruments Corp, EEUU), que permite movimientos con precisión en el orden del micrómetro en los tres ejes del espacio.

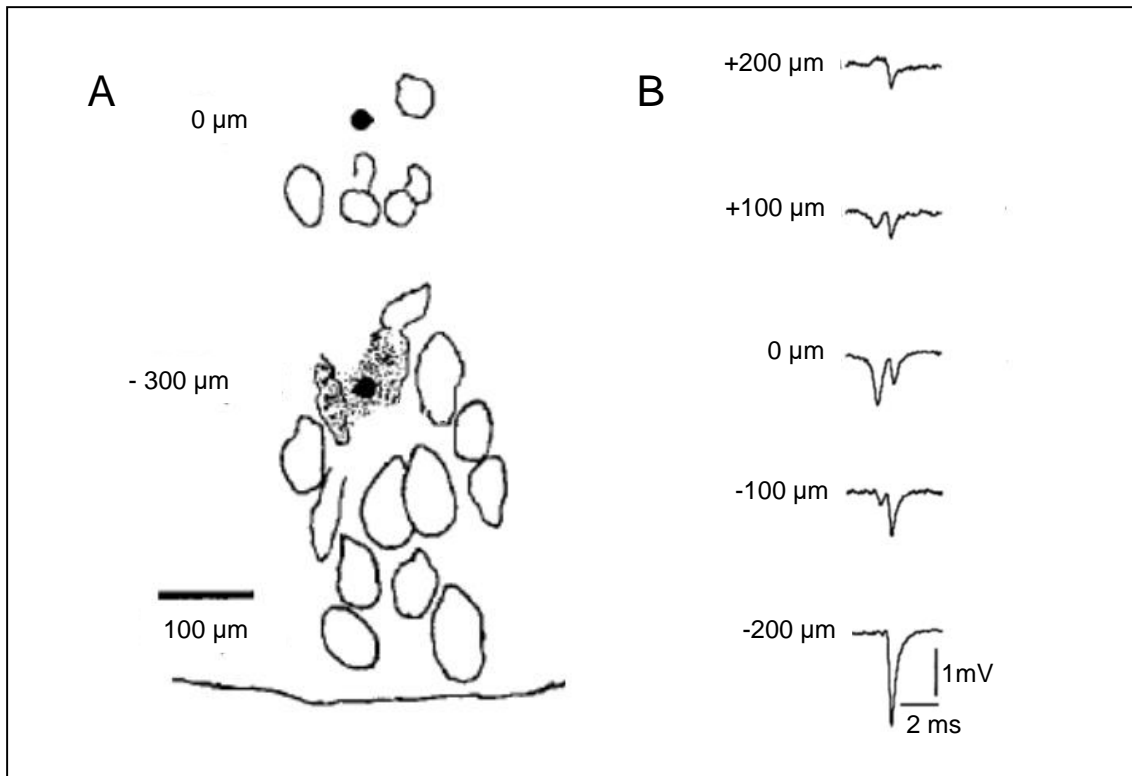


Figura 4. Perfil electrofisiológico de la actividad de campo del NEB. **A,** Dibujo en cámara lúcida de una sección transversal representativa del NEB. Los somas más pequeños de las células marcapaso se ubican en una posición más dorsal, en tanto que los somas de las células relé presentan un tamaño mayor y se ubican en la región ventral del núcleo. Se indican con círculos negros dos sitios del NEB en los que se obtuvieron registros de campo en la vecindad de las cMP (0 μm) y próximo al soma de las cR (-300 μm). En el experimento ilustrado, el sitio de registro obtenido a nivel del soma de las cR fue marcado por depósito extracelular del colorante "pontamine sky blue (PSB), para referencia. **B,** Registros del potencial de campo a distintas profundidades del NEB a lo largo del eje dorso – ventral a nivel de la línea media. Note que la forma de onda del potencial de campo del NEB permite identificar el sitio de registro y distinguir si fue obtenido a nivel del soma de las cMP (0 μm) o a distancias conocidas respecto de este sitio en dirección ventral (-100 μm , -200 μm , etc) o dorsal (+100 μm , +200 μm , etc) a lo largo de un recorrido vertical del electrodo a nivel de la línea media. Modificado de Curti et al., 1999.

3. Acondicionamiento, adquisición y procesamiento de las señales.

Las señales obtenidas fueron amplificadas con el objetivo de optimizar su resolución al momento de la conversión análogo-digital. En el caso de la DOE, tanto para el animal en reposo como durante los experimentos de registro simultáneo, las señales fueron amplificadas (x100) por un preamplificador AC (P15, Grass Instruments, EEUU) y filtradas entre 0.1Hz y 3KHz. Para el registro de la dNEB se utilizó un amplificador Axoclamp 2A (Molecular Devices, EEUU), y se amplificó (x100 o x1000) la salida con un acondicionador de señales. Concomitantemente, las señales eléctricas fueron filtradas (filtro pasa-bajo a 3.0 kHz) y muestreadas a 20 kHz utilizando una tarjeta conversora Digidata 1200 (12 bits; Molecular Devices, San José, CA, USA).

La visualización de dichas señales se realizó a través de un osciloscopio y de un computador por medio del paquete pClamp (Molecular Devices, EEUU), que permite su adquisición (Clampex) y su posterior procesamiento primario (Clampfit). Este procesamiento consistió en la detección de eventos (DOE o dNEB), la obtención de listados de intervalos de primer orden (que fueron analizados posteriormente) y a la construcción de los tacogramas.

Análisis de datos:

Para el análisis de la variabilidad de la frecuencia se utilizaron distintos programas incluyendo: pClamp, SigmaPlot (Systat Software), Excel (Microsoft), Kubios (Kubios HRV Standard 3.1), PAST3 (PAleontological STatistics 3.25, Hammer et al., 2001).

En todos los casos se analizó 1 minuto de registro lo que corresponde a una media de 1580 intervalos. Se llevó a cabo un análisis cuantitativo de la variabilidad de los intervalos de primer orden de éstas señales mediante el cálculo del coeficiente de variación que permitió la evaluación global de la variabilidad, la RMSSD y el CAF de los histogramas de intervalos de primer orden.

La caracterización cualitativa de dicha variabilidad se llevó a cabo mediante el análisis espectral de los tacogramas y los diagramas de Poincaré de intervalo n vs intervalo $n+1$. Los diagramas de Poincaré fueron elaborados en SigmaPlot. SD1 y SD2 fueron calculados según Brennan et al., 2001: $SD2 = \sqrt{2 \cdot DE^2 - 1/2 \cdot RMSSD^2}$; $SD1 = \sqrt{2 \cdot DE^2 - SD2^2}$ y la elipse fue dibujada en base a cálculos trigonométricos utilizando como referencia el trabajo de Piskorski & Guzik (2007).

Para realizar las FFT utilizamos el programa PAST-3. Cabe destacar que la construcción del diagrama de Fourier a partir de un gráfico como el tacograma, requiere que los puntos de dicho gráfico sean equidistantes. Por esta razón el programa debe realizar una interpolación de los datos para satisfacer dicha condición (Luczak & Laurig, 1973).

Representación gráfica:

Periodogramas: A partir de los datos de potencia y frecuencia proporcionados por el programa PAST 3 se elaboraron histogramas de porcentaje de potencia para rangos discretos de frecuencia en SigmaPlot. El porcentaje de potencia abarcada por los distintos rangos de frecuencia fue promediado para generar un histograma representativo de toda la población de datos para las distintas condiciones experimentales.

Diagramas de caja (“Box plots”): Los parámetros cuantitativos para el análisis de la variabilidad de la frecuencia (media, DE, CV, CAF, RMSSD, SD1 y SD2) para las poblaciones de datos correspondientes a cada condición experimental estudiada fueron representados a través de diagramas de cajas. En estos diagramas la línea horizontal inferior corresponde al percentil 25, la superior al percentil 75 y la intermedia a la mediana. La barra de error superior corresponde al percentil 90 y la inferior al percentil 10. Se muestran asimismo puntos por encima y debajo de las barras de error para aquellos datos excepcionales que se ubiquen alejados del percentil 90 y 10.

Test estadísticos.

Para comparar parámetros descriptivos de la variabilidad entre DOE y dNEB de experimentos simultáneos se utilizó el test de t para muestras emparejadas. Consideramos una diferencia entre dos grupos de datos estadísticamente significativa cuando $p \leq 0.05$.

Resultados

I- Caracterización de la variabilidad de la frecuencia de la DOE en el animal en reposo.

Se realizaron registros cabeza-cola de la DOE de animales en reposo (n=25). Los listados de intervalos inter-DOE constituyeron el espacio muestral al que fueron aplicadas las herramientas estadísticas utilizadas.

Análisis de la variabilidad en el dominio del tiempo.

En primer lugar se llevó a cabo una caracterización primaria de la variabilidad de las series temporales mencionadas (fig. 5 y 6). El tacograma de la DOE (fig. 5) ilustra el régimen de descarga del OE en un período de tiempo acotado (~1 minuto).

Una inspección inicial del tacograma permite reconocer a la DOE como una señal rítmica altamente periódica, donde puede apreciarse sin embargo un cierto nivel de variabilidad de los intervalos característica del desempeño del sistema electromotor en estas condiciones experimentales (Fig. 5A). Esta variabilidad resulta de cambios rápidos entre intervalos sucesivos (nos referiremos a este fenómeno como variabilidad de alta frecuencia), y cambios lentos en los que la duración del intervalo se modifica progresivamente siguiendo un curso temporal más lento (que llamaremos variabilidad de baja frecuencia). La dispersión del histograma de intervalos de primer orden (Fig. 5B) refleja en parte la variabilidad observada en el tacograma. De manera característica el histograma de intervalos para la DOE se ajustó a una distribución normal de reducida dispersión en torno al valor medio. El intervalo medio de la DOE difirió para cada individuo. En las condiciones en que fueron llevados a cabo los registros en esta etapa el valor medio del intervalo fue de 38.218 ± 8.391 ms (para un n=25, i.e. la totalidad de los animales registrados en condiciones de reposo), (fig. 5C1) y el DE, asumió valores de 1.057 ± 0.623 ms (fig. 5C2). La distribución presentó un sesgo hacia la izquierda compatible con una tendencia al acortamiento de los intervalos (fig.5C3). En efecto el CAF asumió sistemáticamente valores negativos (-0.414 ± 0.618).

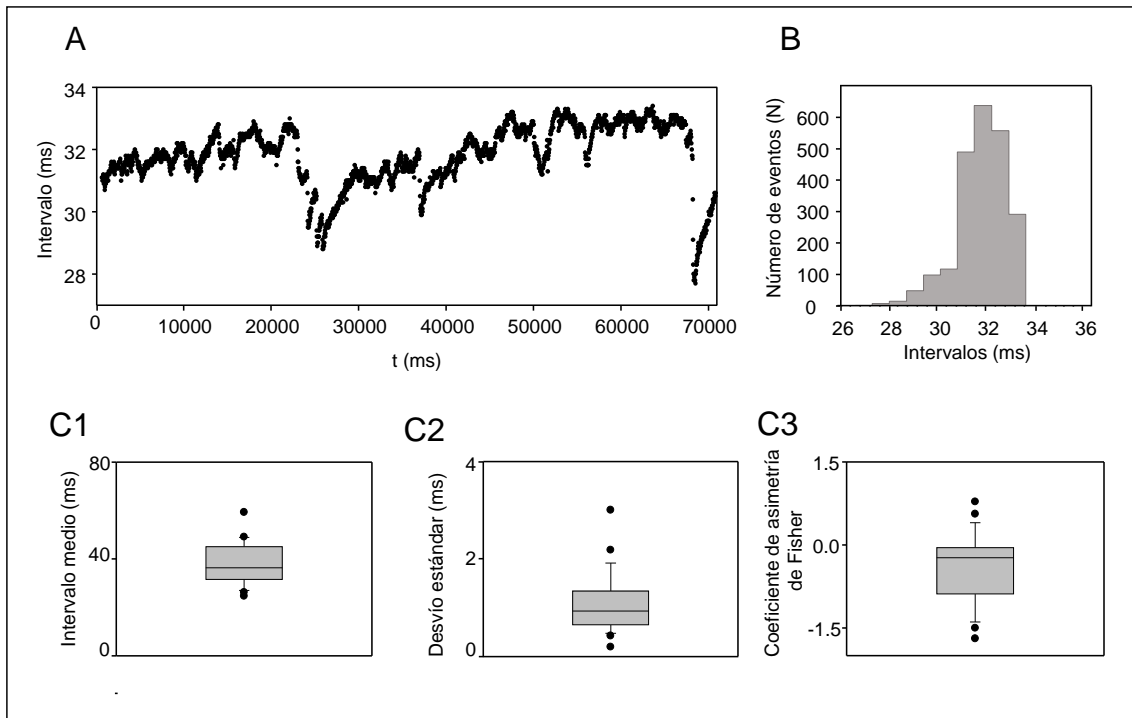


Figura 5. Cuantificación de la variabilidad de la DOE a través de parámetros de dispersión. **A**, Ejemplo representativo de un tacograma: intervalos de primer orden en función del tiempo, obtenido en condiciones de reposo. **B**, Ejemplo representativo de un histograma de intervalos de primer orden. **C**, diagramas de caja (*Box plot*) de algunos parámetros descriptivos de la distribución de los intervalos de primer orden y de su variabilidad: la media (C1), el desvío estándar (C2) y el coeficiente de asimetría de Fisher (CAF) (C3). Nótese que la DOE presenta característicamente histogramas sesgados hacia la izquierda, lo cual se corresponde con valores del CAF negativos. Dicho sesgo se corresponde con una fuente de variabilidad particularmente generada por acortamientos de los intervalos. Para C se analizaron 25 individuos en condiciones de reposo ($n = 25$).

El CV del intervalo para la DOE de los animales en reposo fue de 0.028 ± 0.014 (fig. 6A). Por su parte, la variabilidad de alta frecuencia cuantificada mediante el parámetro RMSSD (fig. 6B) fue de 0.233 ± 0.086 ms, que normalizado al valor del intervalo medio (RMSSD/Im) fue de $0.006 \pm 3.3 \times 10^{-4}$ (correspondiendo a un 0.6% del intervalo natural medio).

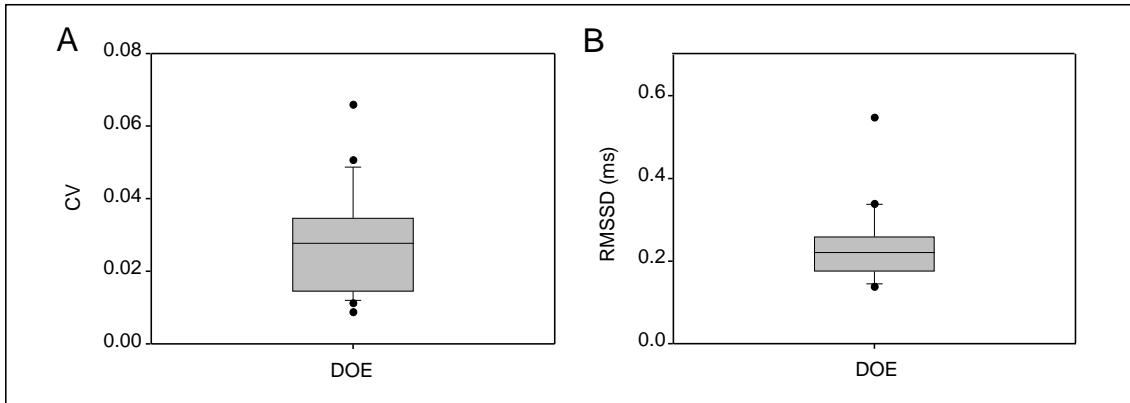


Figura 6. Cuantificación de la variabilidad total y de alta frecuencia para la DOE de animales en reposo. **A**, Diagrama de caja del coeficiente de variación, indicador de la variabilidad de los intervalos de primer orden en el dominio del tiempo. **B**, Diagrama de caja de la RMSSD, indicador de la variabilidad de alta frecuencia para la serie temporal analizada. Para A como para B se analizaron 25 individuos en condiciones de reposo ($n = 25$).

Análisis no lineal de la variabilidad: Diagrama de Poincaré

Para avanzar en la cuantificación de la variabilidad en rangos precisos de frecuencia, las series temporales de intervalos fueron estudiadas utilizando el diagrama de Poincaré y el análisis espectral del tacograma. Para la DOE el análisis reveló una distribución característica de la nube de puntos a lo largo de la línea de identidad, muy superior a la dispersión en sentido perpendicular a la misma (fig. 7A). Los parámetros SD1, asociado con la variabilidad de alta frecuencia y SD2 asociado a la variabilidad de baja frecuencia alcanzaron valores de 0.165 ± 0.061 ms y 1.484 ± 0.881 ms, respectivamente (fig. 7A).

Análisis de la variabilidad en el dominio de la frecuencia.

En línea con los resultados anteriores, el análisis espectral de los tacogramas mostró una variabilidad para la DOE dentro de un rango de frecuencia entre 0 y 20 hz cuyo principal componente se encontró concentrado en el intervalo de 0 a 2 hz ($P\% = 34.646 \pm 16.520$) (Fig. 7). La diferencia entre la potencia % concentrada en dicho intervalo en comparación con la potencia acumulada por cada uno de los siguientes intervalos considerados fue estadísticamente significativa ($p \leq 5.24 \times 10^{-6}$).

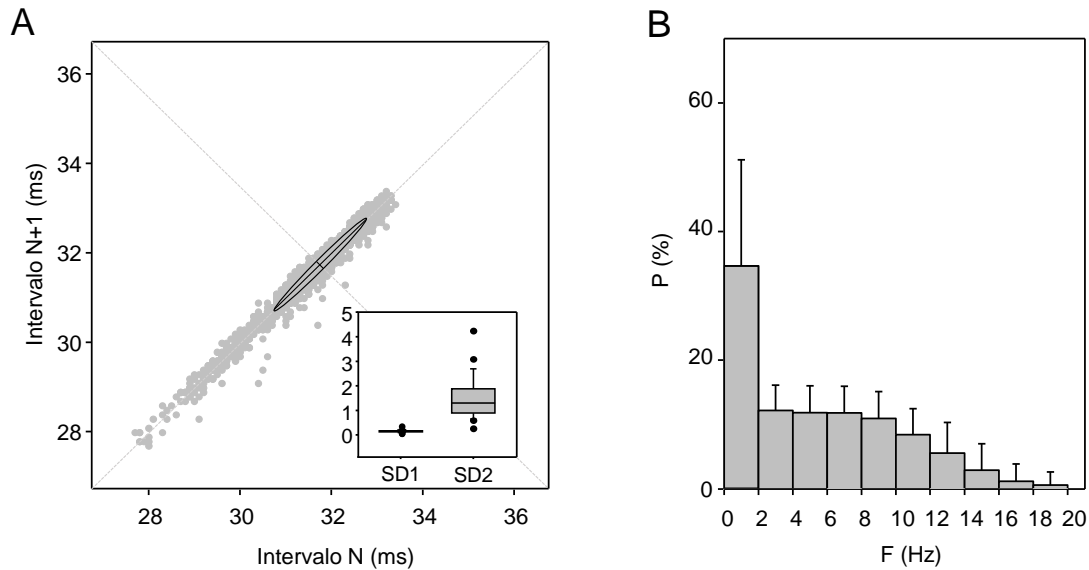


Figura 7. Caracterización cualitativa de la variabilidad de la DOE. **A**, Análisis no lineal de la variabilidad: diagrama de Poincaré. Abajo a la derecha, diagrama de caja representando los parámetros descriptivos del diagrama de Poincaré: SD1 (refleja variabilidad de alta frecuencia) y SD2 (refleja la variabilidad de baja frecuencia) para un $n = 25$. Se constatan valores de SD2 (1.48 ± 0.88) superiores a SD1 (0.17 ± 0.06), test de t para datos emparejados - $p = 3.7 \times 10^{-8}$, indicando una variabilidad concentrada principalmente en las altas frecuencias. **B**, Análisis en el dominio de la frecuencia: Promedio del porcentaje de potencia concentrada en intervalos discretos de frecuencia, para un $n = 25$. En concordancia con lo antedicho para A, el intervalo que acumula una mayor proporción de la potencia es de 0 a 2 Hz ($34.6 \pm 16.5\%$), existiendo diferencias significativas entre éste y todos los demás rangos ($p \leq 5.24 \times 10^{-6}$). En suma, la variabilidad de la DOE parece concentrarse mayoritariamente en las bajas frecuencias.

En suma, a través de herramientas estadísticas sencillas realizamos una caracterización cuantitativa y cualitativa de la variabilidad de la DOE en animales en situación de reposo. De estos resultados la DOE emerge como una señal periódica robusta. Asimismo aplicando métodos gráficos como el diagrama de Poincaré y el periodograma, logramos poner en evidencia características distintivas de la variabilidad de la DOE. Tanto el análisis en el dominio de la frecuencia como el análisis no lineal de la variabilidad revelaron una componente predominante en el dominio de las bajas frecuencias ($\sim 34\%$ de la variabilidad acumulada en el intervalo de 0 a 2 Hz; **$SD2 > SD1$**).

II. Exploración del eventual aporte de la línea de transmisión a la variabilidad del sistema electrogenerador

Los parámetros utilizados para la cuantificación de la variabilidad en el dominio del tiempo no mostraron diferencias significativas entre la DOE y la dNEB registradas simultáneamente. En la figura 8A se esquematiza la estrategia experimental utilizada. Los tacogramas de dichas señales presentaron una secuencia temporal prácticamente

idéntica como se ilustra en el ejemplo de la figura 8B. La resta punto a punto de los tacogramas de la DOE y la dNEB resulta prácticamente en una línea recta en $Y=0$ asumiendo un valor promedio de -5.6×10^{-6} (± 0.03).

El intervalo medio (65.44 ± 18.96 ms para la DOE y 65.44 ± 18.96 ms para dNEB, Fig. 8C) y el desvío estándar (1.10 ± 1.44 ms para la DOE y 1.10 ± 1.45 ms para dNEB, Fig. 8D) no presentaron diferencias significativas ($p=0.45$ y $p=0.23$, respectivamente, test de t para muestras emparejadas). Asimismo los valores de CAF para ambas señales fueron negativos y tampoco mostraron diferencias significativas (-0.62 ± 0.84 para la DOE y -0.63 ± 0.84 para dNEB) ($p=0.15$, test de t para muestras emparejadas).

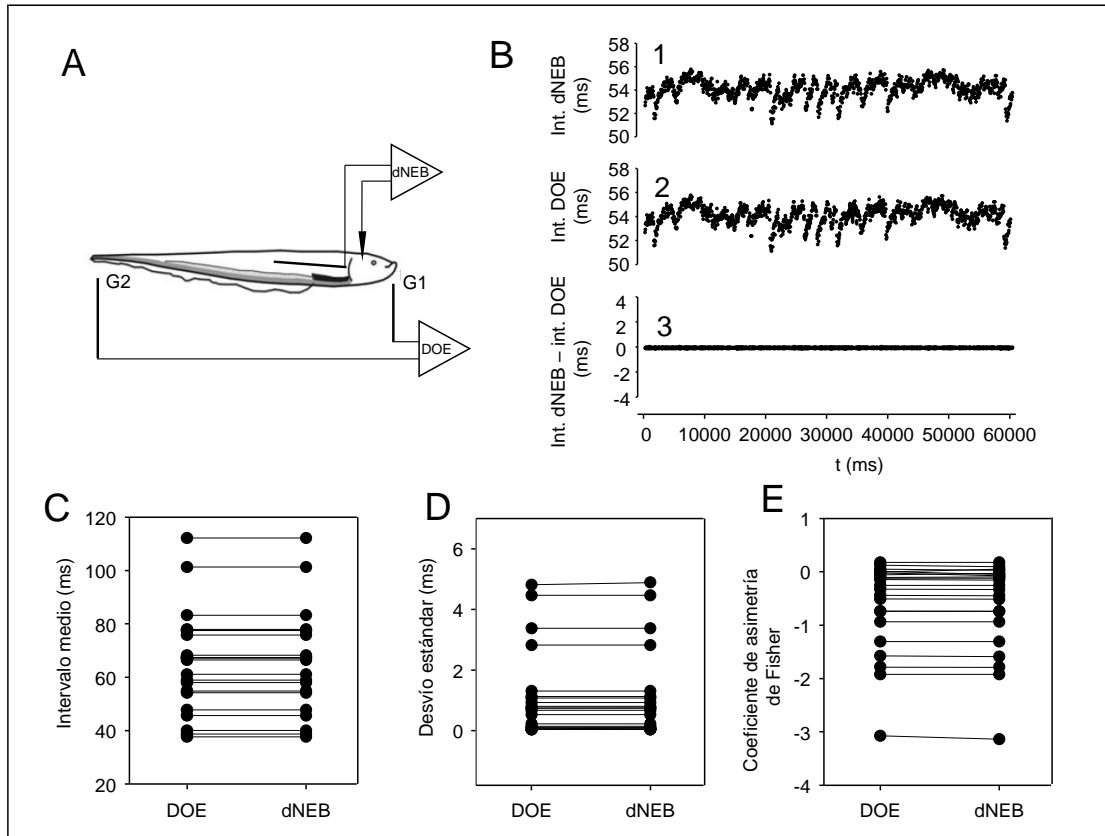


Figura 8. Los parámetros descriptivos de la dispersión en la distribución de intervalos de primer orden son prácticamente idénticos en los registros simultáneos para DOE y dNEB. **A**, Representación esquemática de la adquisición simultánea de DOE (electrodos cabeza – cola) y dNEB (electrodo de referencia sub cutáneo y microelectrodo en NEB). (Adaptado de Caputi et al. 2005). **B**, Ejemplo representativo de tacogramas obtenidos de registros simultáneos de DOE y dNEB donde se muestra que la secuencia temporal de los intervalos es igual para ambos registros. **B1**, Tacograma para dNEB. **B2**, Tacograma para DOE (registro simultáneo a A.1). **B3**, La resta punto a punto de los intervalos en B1 y B2 es una línea recta por $y=0$. En los diagramas **C**, **D** y **E** se grafican los valores de Intervalo medio, desvío estándar y CAF respectivamente, para DOE y dNEB ($n = 22$).

Mostrando la misma tendencia que los restantes parámetros de variabilidad, el CV (0.01 ± 0.02 para la DOE y 0.01 ± 0.02 para dNEB) y la RMSSD (0.46 ± 0.55 para la DOE y 0.47 ± 0.55 para dNEB) tampoco mostraron diferencias significativas ($p=0.23$ para ambos, test de t para muestras emparejadas) (fig. 9).

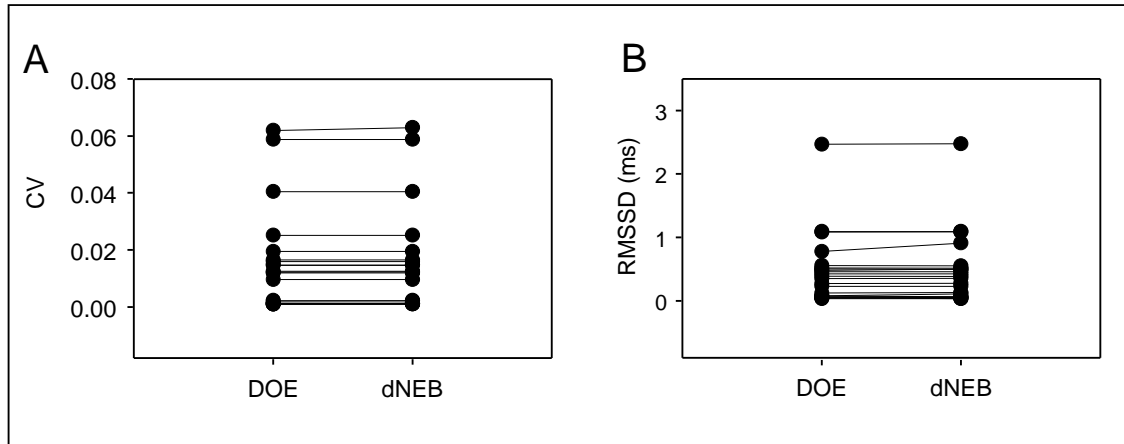


Figura 9. Los parámetros primarios para la cuantificación de la variabilidad total y de alta frecuencia son prácticamente idénticos para los registros simultáneos de DOE y dNEB. **A,** Coeficiente de variación: no se encontraron diferencias significativas entre registros simultáneos – test de t para muestras emparejadas, $p = 0.23$ - . **B,** RMSSD: no se encontraron diferencias significativas entre registros simultáneos – test de t para muestras emparejadas, $p = 0.23$.

En relación a los parámetros que emergen del análisis no lineal de la variabilidad del intervalo, tampoco encontramos diferencias significativas entre la DOE y la dNEB (Fig. 10). En efecto, la distribución de los puntos en los diagramas de Poincaré resultaron prácticamente superponibles como se ilustra en el ejemplo representativo de las Fig. 10A y 10B. Similares hallazgos se obtuvieron en los 22 experimentos. Tanto la SD1 (Fig. 10C) como la SD2 (Fig. 10D) fueron similares para la DOE y la dNEB (0.33 ± 0.39 vs 0.33 ± 0.39 para SD1 y 1.51 ± 2.01 vs 1.51 ± 2.02 para SD2, $p=0.23$ y $p=0.28$ para SD1 y SD2 respectivamente, test de t para muestras emparejadas).

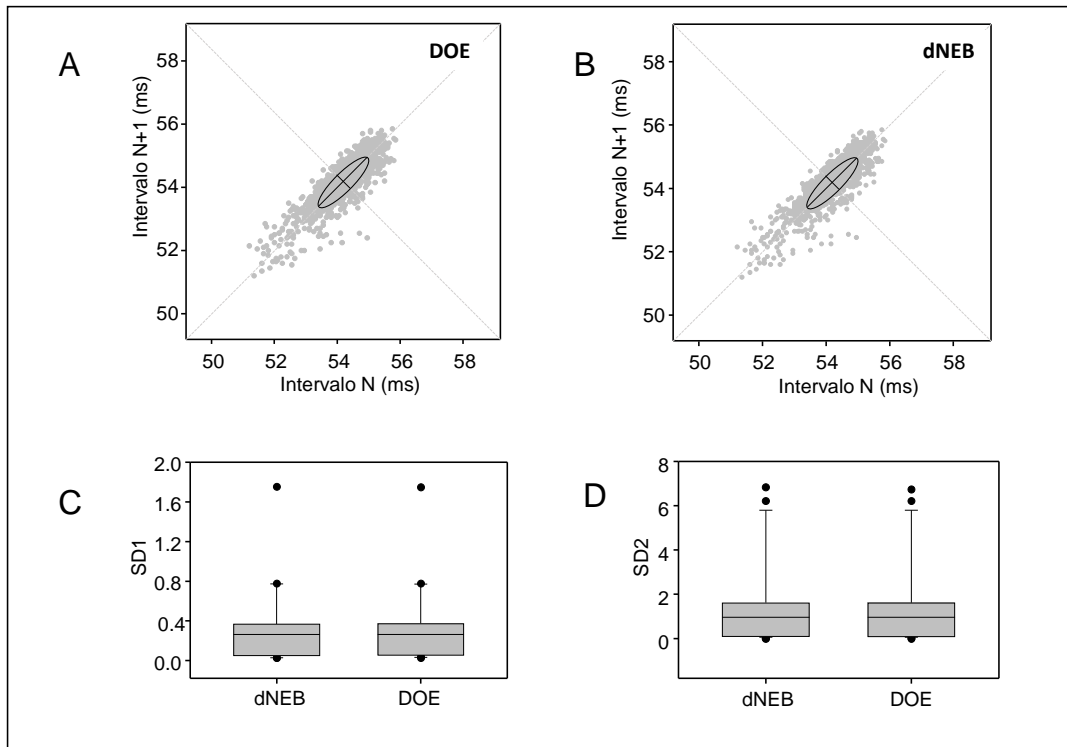


Figura 10. No se hallaron diferencias entre registros simultáneos para el análisis no lineal de la variabilidad. **A**, diagrama de Poincaré para registro de DOE. **B**, diagrama de Poincaré para registro de dNEB simultáneo al registro en A. Notar que los diagramas en A y B son indiferenciables en la inspección visual. **C**, box plot de SD1 para dNEB vs DOE. No se hallaron diferencias significativas (test de t para muestras emparejadas: $p = 0.23$). **D**, box plot de SD2 para dNEB vs DOE. No se hallaron diferencias significativas (test de t para muestras emparejadas: $p = 0.28$).

Finalmente, el análisis de la variabilidad en el dominio de la frecuencia tampoco mostró diferencias significativas entre DOE y dNEB (Fig. 11). Al comparar la potencia acumulada por cada intervalo de frecuencia considerado entre DOE y dNEB constatamos en todos los casos que no existió una diferencia significativa ($p \geq 0.21$).

En consonancia con los resultados presentados para la DOE de los animales en reposo, para las señales detectadas simultáneamente la variabilidad parece concentrarse preferentemente en las bajas frecuencias. En éstas condiciones experimentales esta característica se acentuó de manera que la potencia total se encontró distribuida en el rango de 0 a 14 Hz. El intervalo de 0 a 2hz acumuló la mayor proporción de la potencia total tanto para la DOE (70.71 ± 26.72 %) y dNEB (72.26 ± 24.50 %) no existiendo entre ambos valores diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.205$).

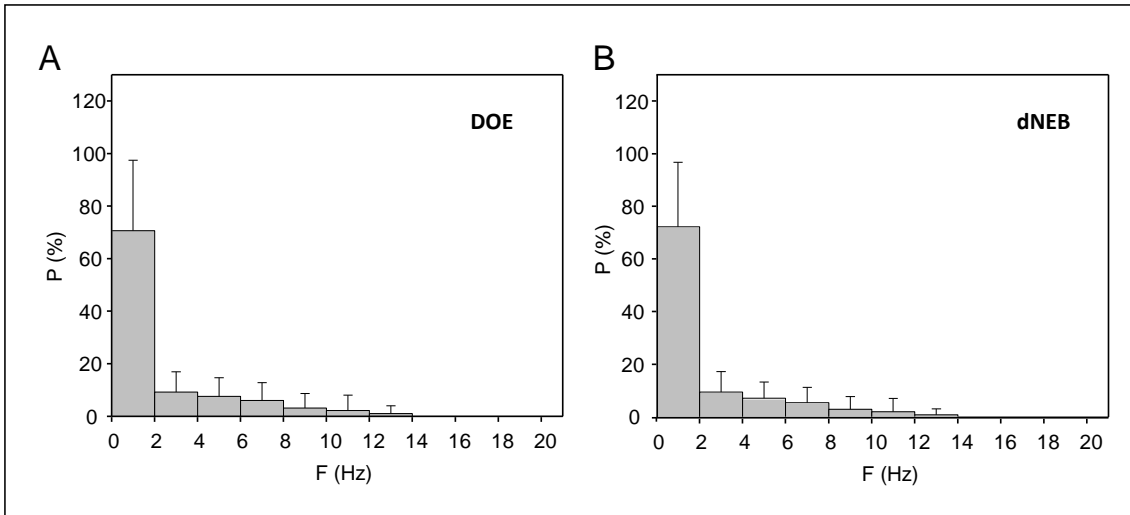


Figura 11. No se hallaron diferencias significativas para los registros simultáneos de DOE y dNEB en el análisis de la variabilidad en el dominio de la frecuencia. **A**, Perfil de potencia % en función de rangos de frecuencia en Hz para la DOE. **B**, Perfil de potencia % en función de rangos de frecuencia en Hz para la dNEB. Para ninguno de los rangos de frecuencia considerados se encontraron diferencias significativas entre DOE y dNEB ($p \geq 0.206$).

Discusión

En este trabajo se seleccionaron herramientas estadísticas ampliamente utilizadas en el análisis de la variabilidad de osciladores -tomando como referencia el abordaje utilizado para el estudio de la VFC- con el objetivo de caracterizar la variabilidad del sistema electrogenerador en *G. omarorum* y determinar la magnitud de la contribución de la línea de transmisión DOE-dNEB a dicha variabilidad. Dicho abordaje permitió caracterizar aspectos cuantitativos y cualitativos de las series temporales derivadas del registro de la actividad del sistema electrogenerador a dos niveles: el NEB y el OE. Nuestros resultados indican que la DOE constituye una señal periódica de gran precisión a través de la cual es posible evaluar el desempeño funcional del NEB puesto que la línea de transmisión no aporta variabilidad a la DOE respecto del comando rítmico que la desencadena.

Consideraciones metodológicas.

Las herramientas seleccionadas cuentan con una serie de ventajas. En primer lugar, se trata de herramientas sólidas, bien caracterizadas, cuyo alcance y utilidad han sido validados a lo largo de una extensa experiencia clínica y de investigación en el área de la VFC. Asimismo, al aportar información cuantitativa y cualitativa permiten un análisis exhaustivo de la variabilidad de la referencia rítmica.

Sin embargo, para nuestro estudio algunas de éstas herramientas analíticas debieron ser adaptadas, merced a las diferencias en cuanto al desempeño de ambos osciladores (nodo sinoauricular y NEB). En primer lugar la duración de los registros realizados no coincide con aquella considerada adecuada para la VCF. La frecuencia de descarga para el sistema electrogenerador en *G. omarorum* (DOE de animales en reposo en las condiciones de registro del presente trabajo fue de 26.31 ± 4.7 hz) es muy superior a la frecuencia cardíaca (que en adultos sanos se encuentra en el entorno de $1,08 \pm 0.1$ Hz; Nunan et al. 2010). En el análisis de la variabilidad en el dominio del tiempo se considera para el corazón que para el cálculo de los parámetros estadísticos un registro (ECG) de 5 minutos constituye una ventana temporal adecuada (Malik et al., 1996). A la frecuencia cardíaca normal 5 minutos dan lugar a una serie temporal de aproximadamente 300 intervalos. En nuestro análisis, sistemáticamente se estudiaron períodos de 1 minuto de registro, que a la frecuencia media de la DOE constituye un incremento del tamaño muestral, asegurando la solidez del abordaje estadístico de la variabilidad. Asimismo, el análisis espectral de la VFC toma en consideración un rango de frecuencias adecuado para la misma (entre 0 y 0.4hz). En función de dicho rango y de un criterio de valor para el análisis clínico, es que se definen los intervalos de frecuencia que constituyen tres categorías: variabilidad de muy baja frecuencia (VLF) - entre 0 y 0.04hz -, de baja frecuencia (LF) - de 0.04 a 0.15hz -, y de alta frecuencia (HF) - entre 0.15 y 0.4 hz - (Malik et al., 1996) rangos que entendimos de escaso valor en la caracterización del desempeño del sistema electrogenerador. En cambio, optamos por explorar el rango de frecuencias en que podían descomponerse los tacogramas de nuestras series temporales (entre 0 y 20hz). Elegimos arbitrariamente subdividir dicho rango en intervalos de clase discretos (2 Hz) con el objetivo de evaluar qué proporción de la variabilidad (Potencia %) se acumula en intervalos de frecuencia más alta o más baja dentro del rango detectado.

Desempeño del NEB en relación con otros osciladores biológicos.

En el presente trabajo, el CV del intervalo de la DOE de animales en reposo fue de 0.028 ± 0.014 . Este valor es inferior que el valor medio estimado para el marcapaso cardíaco en las condiciones de realización de electrocardiograma estándar para la clínica -i.e. en reposo- ($\sim 0,054$) (Nunan et al., 2010). Asimismo, tomando en consideración el intervalo RR normal para el corazón (926 ± 90 ms) y su RMSSD (42 ± 15 ms) (Nunan et al., 2010) podríamos comparar el RMSSD normalizándolo al intervalo medio (RMSSD/Im) entre el oscilador cardíaco y el NEB. Calculamos que la magnitud de este parámetro para el marcapaso cardíaco sería del 4% del intervalo natural medio siendo un orden de magnitud superior al estimado para el NEB ($0.04 \pm 2.7 \times 10^{-3}$ vs $0.006 \pm 3.3 \times 10^{-4}$). Si bien dichos datos son ilustrativos de la elevada periodicidad de la DOE respecto de la del marcapaso cardíaco, cabe destacar que dicha comparación no toma en cuenta posibles diferencias en las condiciones de registro entre ambas referencias rítmicas. La comparación rigurosa del desempeño de los correspondientes osciladores (nodo sinoauricular y NEB) podría realizarse en preparaciones *in vitro*, aislados de la mayoría de las influencias moduladoras extrínsecas.

Con relación a la variabilidad estimada para el sistema electrogenerador en otras especies de peces eléctricos, el CV de la DOE de *G. omarorum* es de magnitud comparable con el reportado para peces eléctricos de pulso en reposo: *Steatogenys elegans* (CV entre 0.001 y 0.0035), *Hypopygus cf. leptus* (CV entre 0.001 y 0.0035), *Microsternarchus bilineatus* (CV entre 0.001 y 0.0035), *Brachyhypopomus sp.* (CV entre 0.02 y 0.12) (Field, 2016). Para peces eléctricos de onda en reposo el CV es característicamente más reducido que el hallado para peces de pulso, un ejemplo de esto es el CV medio de *Apteronotus leptorhynchus* ($\sim 2.2 \times 10^{-4}$, Moortgat, 1999).

De la comparación con otros osciladores podemos presentar al sistema electrogenerador de *G. omarorum* como un oscilador robusto, generador de una descarga periódica de gran precisión. Las diferencias entre los osciladores aquí mencionados podrían obedecer a diferencias en las características intrínsecas de los osciladores, como a las características de los sistemas que introducen perturbaciones en su desempeño (ver perspectivas).

Origen de la variabilidad para la DOE

El sistema electrogenerador en *G. omarorum* está implicado en funciones de electrorrecepción y electrocomunicación (Caputi, 1999a). Para cumplir con la demanda que esto supone, el NEB en tanto generador del comando neural para la DOE debe contar con una referencia robusta y confiable, al tiempo que versátil para admitir rápidas modulaciones de su desempeño cuando el contexto comportamental lo requiera. Los mecanismos que habilitan al NEB a saldar este compromiso funcional son objeto de estudio en la actualidad.

La variabilidad de la DOE en tanto referencia del sistema electrogenerador podría a priori ser el resultado de eventos que ocurran a nivel del NEB y/o de las características de la línea de transmisión que media el comando para la DOE. En el presente trabajo hemos descartado el aporte de la segunda alternativa.

Fidelidad de la línea de transmisión

Muy frecuentemente el estudio del sistema electrogenerador en esta especie implica el registro de la DOE durante la realización de múltiples maniobras experimentales. En esos estudios se deducen los mecanismos que operan a nivel del NEB para provocar las modulaciones de la DOE introducidas por las maniobras experimentales (Capurro et al., 2001; Comas et al., 2019; Curti et al., 1999; 2006; Quintana et al., 2011). Sin embargo tal deducción sólo es válida asumiendo la fidelidad de la línea de transmisión interpuesta entre el NEB y el OE. Si esto no fuera así cabe preguntarse además cuánto de la variabilidad de la DOE depende del circuito responsable de la proyección descendente del comando para la DOE.

Ninguna de las herramientas utilizadas en el presente trabajo para caracterizar la variabilidad fueron capaces de detectar diferencias significativas entre la DOE y la dNEB. A la luz de estas evidencias podemos concluir que a pesar de la gran complejidad que caracteriza al sistema electrogenerador en esta especie, la línea de transmisión entre el origen del comando neural generado en el NEB, y el OE, efector de la DOE, no aporta variabilidad a la descarga periódica del OE. En consecuencia es posible obtener información respecto del desempeño funcional del NEB a través del análisis de la DOE. En esta especie, similar conclusión ha sido reportada previamente (Capurro et al., 1999) aún cuando no ha sido posible acceder a las evidencias que sustentan tal conclusión ni al abordaje experimental utilizado por estos autores para cotejar adecuadamente nuestros hallazgos.

Variabilidad generada a nivel del NEB

Puesto que la línea de transmisión entre el NEB y el OE no aporta variabilidad a la DOE, esta obedece exclusivamente a la variabilidad del intervalo del comando que emerge del NEB. Dicha variabilidad podría resultar tanto de las características propias del oscilador (variabilidad intrínseca): las características electrofisiológicas de las células que componen el oscilador y de su conectividad así como del efecto de las entradas al NEB procedentes de las estructuras premarcapaso y otras aferencias (variabilidad extrínseca).

El NEB recibe variadas aferencias capaces de modular su actividad en diversos contextos comportamentales. En efecto, son múltiples los factores ambientales, fisiológicos y sociales que determinan las características de la DOE como salida de un sistema electrogenerador complejo, de cuyo adecuado desempeño depende la adaptación de los peces eléctricos a su entorno. Estímulos acústico-vibratorios (Barrio et al., 1991), auditivos (Kramer et al., 1981), eléctricos (Caputi et al., 2005) y lumínicos (Post & von der Emde, 1999) son capaces de generar modulaciones en la frecuencia de la DOE, llamadas respuestas a novedad (“novelty responses”). La magnitud de dichas respuestas varía con la modalidad, intensidad y duración del estímulo, y es dependiente de la experiencia previa (Post & von der Emde, 1999). Asimismo, en *G. omarorum* la frecuencia de descarga de la DOE presenta oscilaciones circadianas, se incrementa durante la navegación (Migliaro et al., 2018) y se modifica proporcionalmente con cambios en la temperatura del agua (Ardanaz et al., 2001). Se han evidenciado importantes modulaciones de la DOE en el contexto de respuestas

motoras como la respuesta de escape (Falconi et al., 1995; Comas & Borde, 2010;), así como incrementos en la frecuencia de la DOE que preceden al inicio de la navegación (Jun et al., 2014). Aferencias moduladoras mediadas por neuropéptidos y hormonas son capaces de generar cambios en el desempeño del NEB responsables de la emisión de señales sociales.

Aún cuando hayamos demostrado que la variabilidad observada en nuestro trabajo tiene su origen en el NEB, carecemos de evidencias directas que orienten hacia los mecanismos responsables. Sin embargo, la existencia de múltiples estructuras premarcapaso y de otras vías de proyección descendente que modulan la actividad del NEB sugieren un papel relevante del origen extrínseco de la variabilidad. La reducción del CV de la DOE obtenida en el animal inmovilizado en relación al calculado en condiciones de reposo aparente (0.028 vs 0.016, reposo aparente y curarizados, respectivamente), sugiere que este es efectivamente el caso. Si bien para los animales registrados en reposo no es posible asegurar la ausencia de movimientos detectables durante la adquisición es razonable postular que en estas condiciones el animal está sujeto a un conjunto de estímulos sensoriales que están ausentes en las condiciones de inmovilización fuera del agua.

Asimismo, cualquiera sea la condición experimental, el hecho de que el CAF de los histogramas de intervalo de la DOE haya sido sistemáticamente negativo sugiere un bombardeo sináptico aleatorio del NEB mediado presumiblemente por la actividad de aferentes excitadoras glutamatérgicas (ver Curti et al., 1999; 2006; Caputi et al., 2005; Comas y Borde, 2010; Quintana et al., 2014)..

Conclusiones y Perspectivas.

En el presente trabajo fueron aplicadas herramientas estadísticas comunes para el estudio de la eferencia rítmica en osciladores para caracterizar la variabilidad del intervalo de la DOE en *G. omarorum*. El abordaje utilizado permitió un análisis razonablemente completo de la variabilidad de esta señal puesto que permitió evaluar aspectos tanto cuantitativos como cualitativos de la misma. De dicho análisis extraemos como conclusión que la DOE constituye una señal rítmica de gran regularidad. Aplicando las mismas herramientas para el análisis de registros simultáneos DOE – dNEB obtuvimos evidencias que sugieren que la línea de transmisión entre el NEB y el OE no aporta variabilidad a la eferencia del sistema electrogenerador. En consecuencia, futuras investigaciones respecto de la génesis de la variabilidad observada en las señales estudiadas deberán centrarse en el estudio de los mecanismos responsables de la generación de variabilidad a nivel del NEB.

Si bien por lo dicho anteriormente el glutamato podría ser uno de los neurotransmisores implicados en la generación de variabilidad a nivel del NEB, no es éste el único candidato posible. La aplicación de GABA a nivel de las cMP produce apagados transitorios de la descarga del NEB (Comas et al., 2019), por lo que la transmisión GABAérgica también podría estar implicada en la generación de variabilidad. La aplicación *in vivo* a nivel del NEB en animales inmovilizados de antagonistas para receptores glutamatérgicos y GABAérgicos de las cMP podría aportar evidencia relevante acerca del papel de la inervación del núcleo en la variabilidad de su actividad rítmica. Aún cuando se trata de experimentos técnicamente más demandantes, el análisis *in vitro* del desempeño del NEB en rodajas de tronco encefálico podrá aportar evidencia

adicional. En estas condiciones la actividad espontánea y rítmica del NEB se conserva (Perrone et al., 2014, Comas et al., 2019) y la variabilidad extrínseca se espera se encuentre notablemente disminuida al aislar el NEB de sus aferencias descendentes más importantes. Herramientas farmacológicas y electrofisiológicas podrán combinarse para evaluar el aporte de la conectividad (acople electrotónico entre neuronas) y de las propiedades intrínsecas neuronales a la variabilidad de la actividad rítmica del NEB. El grado de conectividad electrotónica, incluso en redes conformadas por células marcapaso con automatismo intrínseco, constituye un determinante de la frecuencia preferente de la descarga de población (Buzsaki, 2006) y se encuentra directamente vinculada con la variabilidad intrínseca así como con la perturbabilidad de la eferencia rítmica (variabilidad extrínseca) (Mohawk & Takahashi; 2011). No se descarta, en un futuro, el estudio de las propiedades intrínsecas neuronales responsables de la actividad marcapaso en cMP en cultivo obtenidas por disociación (mecánica o enzimática) de áreas reducidas del tronco encefálico del pez. La existencia de actividad marcapaso en células aisladas contribuiría sustancialmente a determinar el diseño neural de este oscilador.

Bibliografía

Ardanaz, J. L., Silva, A., & Macadar, O. (2001). Temperature sensitivity of the electric organ discharge waveform in *Gymnotus carapo*. *Journal of Comparative Physiology A*, 187(11), 853-864.

Barrio, L. C., Caputi, A., Crispino, L., & Buño, W. (1991). Electric organ discharge frequency modulation evoked by water vibration in *Gymnotus carapo*.

Bennett, M. V., Pappas, G. D., Gimenez, M., & Nakajima, Y. (1967). Physiology and ultrastructure of electrotonic junctions. IV. Medullary electromotor nuclei in gymnotid fish. *Journal of Neurophysiology*, 30(2), 236-300.

Bennett, M. V. L. (1971). Electric organs. In *Fish physiology* (Vol. 5, pp. 347-491). Academic Press.

Berntson, G. G., Lozano, D. L., & Chen, Y. J. (2005). Filter properties of root mean square successive difference (RMSSD) for heart rate. *Psychophysiology*, 42(2), 246-252.

Black-Cleworth, P. (1970). The role of electrical discharges in the non-reproductive social behaviour of *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Pisces). *Animal Behaviour Monographs*, 3, 1-IN1.

Borde, M., Curti, S., Comas, V., & Rivero, C. (2004). Modulación central de un sistema sensorial por un comando motor. Una intención con dos resultados. *Rev Neurol*, 38, 253-260.

Boron, W. F., & Boulpaep, E. L. (2012). *Medical Physiology*, 2e Updated Edition. Elsevier Health Sciences.

Brennan, M., Palaniswami, M., & Kamen, P. (2001). Do existing measures of Poincare plot geometry reflect nonlinear features of heart rate variability?. *IEEE transactions on biomedical engineering*, 48(11), 1342-1347.

Brennan, M., Palaniswami, M., & Kamen, P. (2002). Poincare plot interpretation using a physiological model of HRV based on a network of oscillators. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 283(5), H1873-H1886.

Buzsaki, G. (2006). *Rhythms of the Brain*. Oxford University Press. ch.6, Synchronization by oscillation, pg 136-174; pg 250.

Canfield, J. G., & Rose, G. J. (1993). Electrosensory modulation of escape responses. *Journal of Comparative Physiology A*, 173(4), 463-474.

Calabrese, R. L. (1998). Cellular, synaptic, network, and modulatory mechanisms involved in rhythm generation. *Current opinion in neurobiology*, 8(6), 710-717.

Capurro, A., Longtin, A., Bagarinao, E., Sato, S., Macadar, O., & Pakdaman, K. (2001).

Variability of the electric organ discharge interval duration in resting *Gymnotus carapo*. *Biological cybernetics*, 84(4), 309-321.

Caputi, A. A., Carlson, B. A., & Macadar, O. (2005). Electric organs and their control. In *Electroreception* (pp. 410-451). Springer, New York, NY.

Caputi, A. A. (1999-a). Aprendiendo neurobiología con los peces eléctricos. *Actas de Fisiología*, 5, 109-157.

Caputi, A. A. (1999-b). 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(10), 1229-1241.

Caputi, A., Macadar, O., & Trujillo-Cenóz, O. (1989). Waveform generation of the electric organ discharge in *Gymnotus carapo*. *Journal of Comparative Physiology A*, 165(3), 361-370.

Caputi, A., & Trujillo-Cenóz, O. (1994). The Spiral Cord of *Gymnotus carapo*: The Electromotoneurons and Their Projection Patterns. *Brain, behavior and evolution*, 44(3), 166-174.

Carpenter, D. O. (1982). *Cellular Pacemakers, Vol. 2: Function in Normal and Disease States*. JOHN WILEY & SONS, INC., 605 THIRD AVE., NEW YORK, NY 10158, 1982, 352 pp.221.

Comas, V., & Borde, M. (2010). Neural substrate of an increase in sensory sampling triggered by a motor command in a gymnotid fish. *Journal of neurophysiology*, 104(4), 2147-2157.

Comas, V. (2010); Estudio de las bases neurales de un proceso de integración sensorio-motriz en vertebrados: modulación central de un sistema sensorial por un comando motor. Tesis de maestría PEDECIBA; Facultad de Medicina, UDELAR

Comas, V., Langevin, K., Silva, A., & Borde, M. (2019). Distinctive mechanisms underlie the emission of social electric signals of submission in *Gymnotus omarorum*. *Journal of Experimental Biology*, 222(11), jeb195354.

Comas, V., Borde, M., (2016). Cellular determinants of the repertoire of electromotor behaviors in *Gymnotus omarorum*. Analysis of the innervation pattern and intranuclear connectivity of the medullary pacemaker nucleus. Poster presented at Fish Electrosensory and Electromotor Systems, Satellite Meeting; XII International Congress for Neuroethology, Montevideo, Uruguay.

Comas, V., Borde, M., (2012). Estrategia neural para la modulación de la actividad de un núcleo marcapaso del sistema nervioso central. Poster presented at XIV Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias, Montevideo, Uruguay.

Curti, S., Falconi, A., Morales, F. R., & Borde, M. (1999). Mauthner cell-initiated electromotor behavior is mediated via NMDA and metabotropic glutamatergic receptors

on medullary pacemaker neurons in a gymnotid fish. *Journal of Neuroscience*, 19(20), 9133-9140.

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(2), 491-504.

Thomas Jessell, Siegelbaum, S., & Hudspeth, A. J. (2013). *Principles of neural science* (Vol. 5, ch: 6, pp. 126 - 147). E. R. Kandel, J. H. Schwartz, & T. M. Jessell (Eds.). Department of Biochemistry and Molecular Biophysics New York: McGraw-hill.

Drumm, B. T., & Baker, S. A. (2016). Teaching a changing paradigm in physiology: a historical perspective on gut interstitial cells. *Advances in physiology education*, 41(1), 100-109.

Falconi, A., Borde, M., Hernández-Cruz, A., & 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(5), 679-689.

Field, C. E. (2016). Status Signaling and the Characterization of a Chirp-Like Signal in the Weakly Electric Fish *Steatogenys elegans*.

García-Austt, E., & Buño, W. (1980). *Libros de investigación y ciencia: El Cerebro*. Ch 13: Ritmos eléctricos del cerebro e integración sensoriomotriz. pg 179. Editorial Labor S.A., Barcelona

Godwin, J., & Thompson, R. (2012). Nonapeptides and social behavior in fishes. *Hormones and Behavior*, 61(3), 230-238.

Hammer, Ø., Harper, D. A., & Ryan, P. D. (2001). PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4(1), 9.

Harris-Warrick, R. M. (2010). General principles of rhythmogenesis in central pattern generator networks. In *Progress in brain research* (Vol. 187, pp. 213-222). Elsevier.

Hutcheon, B., & Yarom, Y. (2000). Resonance, oscillation and the intrinsic frequency preferences of neurons. *Trends in neurosciences*, 23(5), 216-222.

Jun, J. J., Longtin, A., & Maler, L. (2014). Enhanced sensory sampling precedes self-initiated locomotion in an electric fish. *Journal of Experimental Biology*, 217(20), 3615-3628.

Kramer, B., Tautz, J., & Markl, H. (1981). The EOD sound response in weakly electric fish. *Journal of comparative physiology*, 143(4), 435-441.

Ledrer, W.J. (2012). Cardiac Electrophysiology and the electrocardiogram. En Boron, W.F (Updated second edition), *Medical physiology* (pp. 510-514). Philadelphia, US: Elsevier Health Sciences.

Lissmann, H. W., & Machin, K. E. (1958). The mechanism of object location in

- Gymnarchus niloticus and similar fish. *Journal of Experimental Biology*, 35(2), 451-486.
- Lissmann, H. W. (1958). On the function and evolution of electric organs in fish. *Journal of Experimental Biology*, 35(1), 156-191.
- Lissmann, H. W. (1951). Continuous Electrical Signals from the Tail of a Fish, *Gymnarchus niloticus* Cuv. *Nature*, 167(4240), 201.
- Luczak, H., & Laurig, W. (1973). An analysis of heart rate variability. *Ergonomics*, 16(1), 85-97.
- Macadar, O., Lorenzo, D., & Velluti, J. C. (1989). Waveform generation of the electric organ discharge in *Gymnotus carapo*. *Journal of Comparative Physiology A*, 165(3), 353-360.
- Malik, M., Bigger, J. T., Camm, A. J., Kleiger, R. E., Malliani, A., Moss, A. J., & Schwartz, P. J. (1996). Heart rate variability: Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *European heart journal*, 17(3), 354-381.
- Mansier, P., Clairambault, J., Charlotte, N., Médigue, C., Vermeiren, C., LePape, G. & Swynghedauw, B. (1996). Linear and non-linear analyses of heart rate variability: a minireview. *Cardiovascular Research*, 31(3), 371-379.
- Migliaro, A., Moreno, V., Marchal, P., & Silva, A. (2018). Daily changes in the electric behavior of weakly electric fish naturally persist in constant darkness and are socially synchronized. *Biology open*, 7(12), bio036319.
- Mohawk, J. A., & Takahashi, J. S. (2011). Cell autonomy and synchrony of suprachiasmatic nucleus circadian oscillators. *Trends in neurosciences*, 34(7), 349-358.
- Moortgat, K. T., Keller, C. H., Bullock, T. H., & Sejnowski, T. J. (1998). Submicrosecond pacemaker precision is behaviorally modulated: the gymnotiform electromotor pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(8), 4684-4689.
- Moortgat, K. T. (1999). Precision of Pacemaking in a Weakly Electric Fish: Behavior, Physiology, and Modeling (Doctoral dissertation, University of California, San Diego).
- Nathan, R. D. (1986). Two electrophysiologically distinct types of cultured pacemaker cells from rabbit sinoatrial node. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 250(2), H325-H329.
- Nunan, D., Sandercock, G. R., & Brodie, D. A. (2010). A quantitative systematic review of normal values for short-term heart rate variability in healthy adults. *Pacing and clinical electrophysiology*, 33(11), 1407-1417.
- 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. *Journal of Physiology-Paris*, 108(2-3), 203-212.

- Piskorski, J., & Guzik, P. (2007). Geometry of the Poincaré plot of RR intervals and its asymmetry in healthy adults. *Physiological measurement*, 28(3), 287.
- Post, N., & von der Emde, G. (1999). The “novelty response” in an electric fish: response properties and habituation. *Physiology & Behavior*, 68(1-2), 115-128.
- Quintana, L., Sierra, F., Silva, A., & Macadar, O. (2011). A central pacemaker that underlies the production of seasonal and sexually dimorphic social signals: functional aspects revealed by glutamate stimulation. *Journal of Comparative Physiology A*, 197(2), 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. *Journal of Physiology-Paris*, 108(2-3), 155-166.
- 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. *Journal of Experimental Biology*, 216(13), 2412-2420.
- Sokal, R. R., & Rohlf, F. J. (1981). *Biometry* 2nd edition Freeman WH & Co. San Francisco.
- Tarvainen, M. P., & Niskanen, J. P. (2012). *Kubios HRV*. Finland: Biosignal Analysis and Medical Imaging Group (BSAMIG), Department of Applied Physics, University of Eastern Finland.
- Thuneberg, L., Johansen, V., Rumessen, J. J., & Andersen, B. G. (1984). Interstitial cells of Cajal: selective uptake of methylene blue inhibits slow wave activity. In *Gastrointestinal motility* (pp. 495-502). Springer, Dordrecht.
- Trujillo-Cenóz, O., Echague, J. A., Bertolotto, C., & Lorenzo, D. (1986). Some aspects of the structural organization of the spinal cord of *Gymnotus carapo* (teleostei, gymnotiformes): I. The electromotor neurons. *Journal of ultrastructure and molecular structure research*, 97(1-3), 130-143.
- Trujillo-Cenóz, O., & Echagüe, J. A. (1989). Waveform generation of the electric organ discharge in *Gymnotus carapo*. *Journal of Comparative Physiology A*, 165(3), 343-351.
- Warner, R. (1998). *Periodogram Analysis*. David A. Kenny, editor. *Spectral Analysis of Time – Series Data*. The Guilford Press: New York; p. 65-77
- Winfree, A. T. (1967). Biological rhythms and the behavior of populations of coupled oscillators. *Journal of theoretical biology*, 16(1), 15-42.
- Winfree, A. T. (2001). *The geometry of biological time* (Vol. 12). Springer Science & Business Media.