



Tesina de Grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas

**ACCIÓN DE LA MELATONINA EN EL COMPORTAMIENTO
ELÉCTRICO DEL PEZ ELÉCTRICO DE DESCARGA DÉBIL
*BRACHYHYPOPOMUS GAUDERIO***

Br. Juan Ignacio Vázquez

Orientadora: Dra. Adriana Migliaro

Co-orientadora: Dra. Laura Quintana

INDICE:

1.	Resumen	1
2.	Introducción	2
2.1.	Sistemas Circadianos	2
2.2.	La Melatonina como Regulador Circadiano	6
2.3.	Introducción al Modelo: Peces Eléctricos de Descarga Débil	8
2.4.	FB-DOE como salida conductual	10
2.5.	Antecedentes específicos del modelo y planteo de hipótesis	12
3.	Objetivos	14
4.	Estrategia experimental	16
5.	Materiales y Métodos	16
5.1.	Animales	16
5.2.	Experimentos comportamentales	16
5.3.	Experimentos <i>in vitro</i>	18
5.4.	Preparación farmacológica	21
5.5.	Análisis estadístico	21
6.	Resultados	22
6.1.	Cambios sistémicos: Efecto de la melatonina sobre la frecuencia basal de la DOE.	22
6.2.	Cambios en el SNC: Efecto de la melatonina sobre la frecuencia basal del NEB.	24
6.3.	Cambios en los cambios: Efecto de la melatonina sobre la variabilidad	27
7.	Discusión	31
7.1.	Efecto de la melatonina sobre el NEB y la conducta eléctrica	31
7.2.	Efecto de la Melatonina sobre la variabilidad en las frecuencias de descarga	34
7.3.	Perspectivas	37
8.	Referencias	38
9.	Anexo	47

1. RESUMEN

Los ritmos circadianos son ritmos biológicos endógenos con un período cercano a las 24hs. Estos permiten a los individuos anticiparse a los cambios ambientales cíclicos para así poder tener una respuesta a tiempo y eficiente. En los vertebrados el principal señalizador hormonal de estos ritmos es la hormona melatonina. Esta es sintetizada y liberada durante la noche, y su acción promueve la preparación de los animales a esta fase de oscuridad.

Brachyhyopomus gauderio pertenece al orden de los gymnotiformes. Esta especie pertenece a una familia de peces eléctricos de descarga débil, caracterizados por la emisión constante de una descarga eléctrica por parte de un órgano eléctrico especializado (descarga del órgano eléctrico, DOE), generando un campo eléctrico alrededor de su cuerpo. Este campo es tanto utilizado para la electrolocalización, como para la comunicación intra-específica. La frecuencia de descarga de esta DOE (FB-DOE) es modulada tanto por factores ambientales como sociales. La FB-DOE es comandada por un núcleo cerebral central, el Núcleo Electromotor Bulbar (NEB).

B. gauderio es un animal nocturno, y el aumento en actividad nocturna es acompañado por un aumento en su FB-DOE. Este aumento está sometido a una modulación social y es dependiente de la melatonina. En esta tesis se analizó el efecto de la melatonina sobre la FB-DOE y sobre la actividad espontánea del NEB. Hipotetizamos que el aumento nocturno en FB-DOE se debe a un efecto de la melatonina directamente sobre el NEB.

El tratamiento con melatonina durante el día llevó a una disminución en la FB-DOE y también en la frecuencia de descarga del NEB (FB-NEB). Esto sugiere que la melatonina regula la conducta eléctrica de forma central actuando directamente sobre este núcleo. Por otro lado, el tratamiento con melatonina generó un aumento en la variabilidad de la FB-DOE, que es naturalmente muy estable. Estos resultados sugieren un sistema de regulación del comportamiento complejo e interconectado, y resaltan al contexto social como una importante presión evolutiva en el desarrollo de los sistemas comunicativos y de las estructuras cerebrales que lo comandan.

2. INTRODUCCIÓN:

2.1. Los Sistemas Circadianos

La ritmicidad circadiana es ubicua en la naturaleza. Vivir en este planeta implica enfrentarse a condiciones ambientales que ciclan drásticamente del día a la noche: el sol sale por la mañana y se pone en la noche, y a esto le siguen cambios en la temperatura ambiental, la disponibilidad de comida, la presencia de predadores y, por supuesto, la cantidad de luz en el ambiente. Para desarrollarse con éxito, los individuos han de ser capaces de adaptar su fisiología, metabolismo y comportamiento a estos cambios de forma eficiente.

La ritmicidad de estos cambios, que ocurren con un período constante en fase con la rotación de la tierra sobre su eje, abre la posibilidad a los animales de no simplemente responder a los estímulos externos, sino a anticiparlos. Utilizar un mecanismo intrínseco para sincronizarse con los ciclos ambientales tiene ciertas ventajas sobre un sistema meramente reactivo. En primer lugar le permite al individuo prepararse para los cambios de una forma óptima antes de que estos ocurran. (Paranjpe y Sharma 2005; Golombek y Rosenstein 2010; Krittika 2020). Los mecanismos implicados en las adaptaciones a estos cambios ambientales no son inmediatos, y esta anticipación permite que el animal los active antes de que la necesidad de ellos emerja (Moore-Ede 1986). Por otro lado, el carácter endógeno de este mecanismo le confiere una mayor robustez a las respuestas del individuo, asegurando que los ritmos del animal no se vean afectados cada vez que las condiciones externas fluctúan de forma acíclica por factores climáticos o incluso efectos de la propia actividad del individuo (Sharma 2003).

Los **ritmos circadianos** son, como su nombre lo indica, ritmos biológicos con un período cercano a las 24hs. Para que un ritmo sea considerado un ritmo circadiano este debe en primer lugar ser generado por mecanismos intrínsecos al individuo. Este ritmo es luego sincronizado por una o varias variables ambientales cíclicas, pero persiste aún en la ausencia de estas (condiciones *free-running*). Asimismo, deben contar con un mecanismo de compensación de período que permita que este se

mantenga estable a diferentes temperaturas, ya que esta variable cambia la velocidad de las reacciones bioquímicas que generan el ritmo (Bell-Pedersen et al. 2005).

Vemos la existencia de **sistemas circadianos** a lo largo de toda la escala evolutiva; desde las cianobacterias (Johnson y Golden 1999), a las plantas (McClung 2001), a los humanos (Mills 1966). Estos sistemas existen en varios niveles de complejidad, pero siempre con una organización general muy similar. En primer lugar cuentan con un oscilador interno encargado de generar el ritmo endógeno y de acompasar los ritmos internos del individuo al ciclo ambiental. El mecanismo molecular de estos osciladores implica loops de retroalimentación de transcripción/traducción de distintos genes reloj (Krittika 2020). Este oscilador recibe aferencias de sensores que captan la información ambiental relevante para acompasar los ritmos internos a los externos. El ritmo generado por este es luego transmitido al resto del organismo, coordinando la expresión de diferentes ritmos (Golombek y Rosenstein 2010).

Las variables ambientales encargadas de acoplar los ritmos internos a los ciclos externos se conocen como *zeitgebers*. Aunque el *zeitgeber* más evidente es el fotoperíodo muchos animales pueden también acompasar sus ciclos utilizando otras variables. En algunos casos donde la luz no presenta ciclos constantes (por ejemplo cuevas o las profundidades del océano) estos ciclos alternativos pueden ser más importantes que la luz. Estas variables pueden ser la temperatura (Herzog 2003; Refinetti 2010; Farsi 2020), la disponibilidad de alimento (Stephan 2002), o incluso la presencia de predadores o la competencia por recursos (Kronfeld-Schor 2017). Además, en especies cuyos individuos se organizan en estructuras sociales el contexto social puede cumplir un rol sincronizador (Bloch et al. 2013; Siehler, Wang, and Bloch 2021).

Los enfoques clásicos del estudio de los sistemas circadianos definen la existencia de un “eje circadiano” general para todos los vertebrados compuesto por tres estructuras interconectadas: la retina, el núcleo supraquiasmático y la glándula pineal. Esto es cierto para los mamíferos, donde el núcleo supraquiasmático funciona como una especie de oscilador “maestro” que integra la información del ambiente y coordina la

actividad de todo el resto de los osciladores del cuerpo (Menaker 1997). En otros vertebrados el sistema carece de esta jerarquía lineal y se encuentra distribuido en varias estructuras. En peces teleósteos el sistema circadiano consiste de una serie de osciladores interconectados pero parcialmente independientes, encontrados en muchos tejidos diferentes (Falcón et al. 2007, 2010). A diferencia de los mamíferos, cuya retina es su única estructura fotorreceptora, el resto de los vertebrados expresan una variedad de opsinas en diferentes áreas del cerebro, particularmente el complejo pineal y el hipotálamo (Perez 2019). Más aún, en peces los osciladores periféricos pueden ser sincronizados por la luz de forma independiente (Whitmore, Foulkes, y Sassone-Corsi 2000; Kumar 2017).

Podría pensarse en el sistema circadiano de los teleósteos más como una red que como un eje, con estructuras que dialogan entre sí pero con una jerarquía menos asimétrica a lo observado en mamíferos. El complejo pineal, sin embargo, tiene un enorme papel regulatorio en el sistema circadiano a través de la síntesis y liberación de la hormona melatonina.

2.2. La Melatonina como Regulador Circadiano

Para que un animal pueda sincronizarse correctamente con su ambiente no basta con la presencia de relojes capaces de generar un ritmo endógeno. Este reloj debe ser capaz de transmitir sus señales al resto del organismo. En los vertebrados esto es posible gracias a la secreción de melatonina.

La melatonina es el principal mensajero circadiano en los vertebrados. Es, de alguna forma, la hormona que le avisa al animal que “*es de noche*”. La respuesta fisiológica conductual será diferente para cada especie según su historia de vida/nicho temporal: ejemplos extremos son individuos nocturnos y diurnos, y esta condición está dada por el circuito neural encargado de interpretar la señal hormonal (Idda et al. 2012)

La melatonina se encuentra presente en todos los vertebrados, es secretada de forma rítmica y está implicada en la regulación de ciclos circadianos (Pevet 2003; Hardeland, Pandi-Perumal y Cardinali 2006) y estacionales (Pevet 2003; Lincoln 2006). En todos

los vertebrados la melatonina es secretada durante toda la fase de oscuridad, lo que resulta en niveles altos de melatonina circulante durante la noche y bajos durante el día. A través de la regulación de la síntesis y liberación de esta hormona se regulan una gran variedad de funciones fisiológicas y comportamentales del animal relacionadas con la reproducción (Falcon 2018), la alimentación (Pinillos et al. 2001), y la interacción social (Feng y Bass 2016). Estas incluyen, entre otros, la actividad locomotora, la ingesta de alimentos, el sueño, la preferencia térmica y la pigmentación de la piel (Falcón 2011).

Los peces tienen dos sitios de síntesis y liberación de melatonina establecidos: la glándula pineal y la retina. La melatonina retiniana se encarga de las adaptaciones circadianas de la propia retina (función paracrina) al ciclo luz/oscuridad (Huang, Lee, y Yang 2005; Ribelayga, Wang, y Mangel 2004), mientras que la melatonina secretada por la glándula pineal es liberada a la sangre y al líquido cefalorraquídeo (Falcón et al. 2010). La melatonina pineal es sintetizada en las células fotorreceptoras de esta durante la noche, y es rápidamente inhibida en presencia de luz (Falcón 1999).

En peces se conocen tres tipos de receptores de melatonina: MT1 (Mel1a) y MT2 (Mel1b), que comparten con los mamíferos, y Mel1c encontrado en peces, reptiles y aves. Los tres receptores pertenecen a la superfamilia de receptores transmembrana asociados a la proteína G (Li 2013). Estos receptores se encuentran distribuidos en el cerebro y los tejidos periféricos, aunque la distribución y abundancia relativa de cada uno varía ampliamente (Falcón et al. 2007; Isorna 2017).

El ritmo de síntesis melatonina depende principalmente de la actividad rítmica de la enzima serotonina N-acetiltransferasa (ANNAT) (Falcón et al. 2001; Klein 2007; Gandhi et al. 2015), que cataliza la conversión de serotonina en *N*-acetilserotonina, que luego será convertida en melatonina. La ANNAT es sensible a la luz: la exposición a la luz inhibe su actividad y, por lo tanto, disminuye la cantidad de melatonina sintetizada y liberada (Ekström y Meissl 1997; Ziv et al. 2007). Además, en peces, en cada pinealocito tanto la actividad de ANNAT como su expresión oscila con un período cercano a 24hs aún en oscuridad constante (Falcón et al. 2009). Recientemente se ha

detectado la expresión de genes de la familia *Annat1* en varias estructuras cerebrales extra-pineales, cómo el telencéfalo y el tectum óptico, proponiendolos como un posible punto de síntesis de melatonina (Falcón et al. 2011). También se han propuesto a los ovarios como punto de producción de melatonina en peces (Takahashi y Ogiwara 2021). En teleósteos la ANNAT funciona como un termosensor, permitiendo que los niveles de melatonina reflejen los valores de temperatura ambiental, a su vez influenciados por la hora del día, la profundidad a la que se encuentra el animal y otros factores ambientales que puedan influir sobre este parámetro (Falcón et al. 2009).

La ritmicidad de la actividad de la melatonina se ve influenciada no solamente por su síntesis y liberación, sino también por los ritmos en la expresión y distribución de sus receptores. En *Solea senegalensis*, un pleuronectiforme nativo del Atlántico este, se observan diferencias en la densidad de distintos receptores de melatonina en la retina y el tectum óptico dependiendo de la hora del día (Oliveira et al. 2008; Confente et al. 2010). En otras especies también se han observado cambios en la expresión (Shin et al. 2011; Choi et al. 2016) y afinidad (Iigo et al. 1995; Bayarri et al. 2004) de los receptores de melatonina.

2.3. Introducción al Modelo: Peces Eléctricos de Descarga Débil

Los peces eléctricos de descarga débil pertenecen a dos familias: Mormyriiformes, nativa de África, y Gymnotiformes, encontrada en América del Sur (Moller 1995). Ambos grupos se caracterizan por la emisión constante de una descarga eléctrica de baja amplitud en el rango de los mV, producto de la descarga de un órgano eléctrico (OE) formado a partir de células musculares modificadas, llamadas electrocitos (Bennet 1970). Estas **descargas del órgano eléctrico (DOEs)** cumplen dos funciones principales: la electrorrecepción activa, con la cual el animal puede distinguir elementos de distinta conductividad en el agua y así hacerse un “mapa eléctrico” del espacio (Caputi et al. 1998), y la comunicación con coespecíficos (Hopkins 1974; Crampton 2019).

Las DOEs de diferentes especies tienen formas de onda y frecuencias basales características. La forma de onda se encuentra determinada por el patrón de inervación

y la secuencia de activación de los electrocitos mientras que la frecuencia depende del comando generado por el sistema nervioso central. A grandes rasgos se los puede clasificar como peces de pulso, cuyas DOEs comprenden un tren de pulsos discretos separados por intervalos sin emisión, o peces de onda, con DOEs continuas con variación de amplitud de forma sinusoidal (Hopkins 1974).

El ritmo de emisión de la DOE, también denominada **frecuencia basal del órgano eléctrico (FB-DOE)** se encuentra bajo el control directo de un núcleo del tronco encefálico compuesto por un centenar de neuronas, llamado núcleo marcapaso o **Núcleo Electromotor Bulbar (NEB)**. Este núcleo cuenta con dos poblaciones celulares: las células marcapasos y las células bulbo espinales de relevo (o células relé) (Bennett et al. 1967; Quintana et al. 2011) (fig. 1). Las células marcapasos presentan una despolarización espontánea y rítmica y se encuentran acopladas eléctricamente entre sí, asegurando que disparen en sincronidad (Moortgat, Bullock, y Sejnowski 2000). Las células marcapasos excitan a las células relé a través de sinapsis mixtas y estas proyectan sus axones hacia las electro-motoneuronas que inervan los electrocitos del OE (Caputi y Trujillo-Cenóz 1994). La actividad espontánea del NEB tiene una relación 1:1 con la descarga del OE volviéndolo un blanco obvio en los estudios de la regulación de la conducta eléctrica, así como volviendo a la DOE una excelente ventana a la actividad neuronal.

El NEB se encuentra bajo la influencia de distintas estructuras pre-marcapasos (Heiligenberg et al. 1981; Kawasaki y Heiligenberg 1989; Keller et al. 1991), que regulan su frecuencia de descarga (y por lo tanto la FB-DOE) a través de distintos moduladores entre los que se cuentan factores ambientales, el estado fisiológico del animal, procesos perceptuales e incluso el contexto social. El NEB, entonces, funciona como un centro integrador, recibiendo proyecciones de distintos centros cerebrales que responden a distintos estímulos, integrándolos y generando una modulación acorde sobre la FB-DOE (Borde et al. 2020).

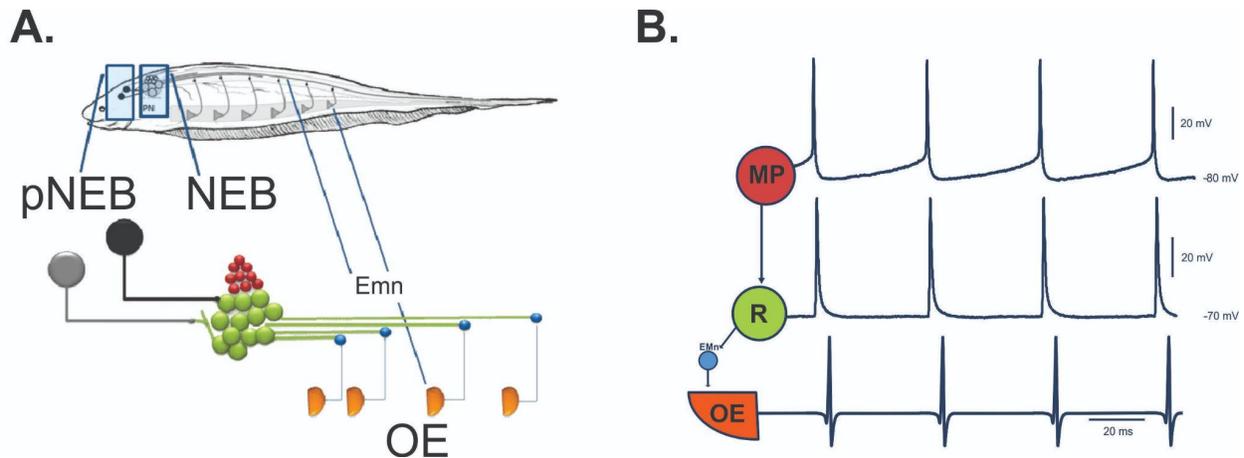


Figura 1: **A.** Esquema del circuito electrogénico en gymnotiformes. pNEB: núcleos pre-marcapasos NEB: Núcleo electromotor bulbar. Emn: Electro Motoneuronas. OE: Órgano Eléctrico. Tomado de Quintana 2010. **B.** Esquema de la sincronicidad entre el NEB y las DOEs. MP: Neuronas marcapasos. R: Neuronas relé. EMn: Electro Motoneuronas. OE: Órgano eléctrico. Modificado de Comas, 2010.

2.4. FB-DOE como Salida Conductual

La DOE codifica información acerca de la especie del animal, su sexo y su estado fisiológico. Los individuos de una especie son capaces de reconocer las señales eléctricas de sus coespecíficos, sea por utilización de diferentes bandas de frecuencia, diferencias en la formas de onda, o una combinación de ambas (Zupanc y Bullock 2006). Muchas especies presentan señales sexualmente dimórficas utilizadas en el reconocimiento y selección de pareja (Hopkins 1974; Curtis y Stoddard 2003; Stoddard y Zakon 2006; Silva, Perrone, y Macadar 2007; Feulner 2009; Gavassa et al. 2013).

Aunque las DOEs son despliegues considerablemente estables en el tiempo (Moortgat et al., 1998) los animales son capaces de modular estas emisiones según su contexto social y ambiental. La FB-DOE en particular es modulada tanto por factores ambientales como sociales (Ardanaz, Silva, y Macadar 2001).

Los peces eléctricos sudamericanos son considerados peces nocturnos, lo que significa que desarrollan la mayor parte de sus actividades (forrajeo, exploración, cortejo, etc.) en las horas de la noche. Este pico de actividad nocturna se ve acompañada por un aumento en la FB-DOE (Silva, Perrone, y Macadar 2007; Stoddard

et al. 2007; Migliaro et al. 2018a,b). Una mayor frecuencia de descarga implica costos energéticos más altos pero confiere una mejor resolución sensorial, por lo que esta ritmicidad en el comportamiento eléctrico resulta ventajosa; los animales mantienen frecuencias más altas cuando necesitan de ellas en la noche, y disminuyen los costos energéticos durante el día. El ritmo diario de FB-DOE se mantiene aún en condiciones experimentales donde el animal es sometido a oscuridad o luz constante, y cumple todas las características para ser considerado un ritmo circadiano (Stoddard 2007, Migliaro 2018a,b).

Este aumento en la FB-DOE por necesidades perceptuales también se observa en respuesta a estímulos novedosos (Caputi et al., 2005), y en situaciones asociadas a la toma de decisión previo a un movimiento (Jun, Longtin, y Maler 2014) o a la búsqueda de alimento en un espacio desconocido (Jun, Longtin, y Maler 2016).

Como fue mencionado antes las DOEs cumplen también una función comunicativa. La FB-DOE puede cambiar de acuerdo a variaciones en la jerarquía social (Perrone 2009) así como experimentar modulaciones de corta duración como *chirps* (aumentos pronunciados con variaciones en la forma de onda) o silencios eléctricos (interrupciones en la emisión), utilizados en el cortejo, el desove y las contiendas agonísticas (Hagedorn 1988; Zupanc 2002; Pappas y Dunlap 2011, Perrone 2009).

La FB-DOE es modulada por el individuo aumentando el flujo de información sensorial y/o adaptando su conducta eléctrica al contexto social en el que se encuentra. Así, la DOE es considerada una salida conductual: la conducta eléctrica, modulada por distintos tipos de estímulos. En este marco, la FB-DOE puede ser tomada como un parámetro de esta conducta, y uno extremadamente útil a la hora de estudiar la regulación neuronal del comportamiento social de este animal.

2.5. Antecedentes específicos del modelo y planteo de hipótesis

Brachyhypopomus gauderio (Giora 2009), previamente *Brachyhypopomus pinnicaudatus*, es una de las cuatro especies de Gymnotiformes encontradas en nuestro país. Se distribuyen de 30-35° S, y se los encuentra en cuerpos de agua dulce, usualmente bajo vegetación espesa, estando más protegidos de la depredación aérea pero recibiendo muy poca luz solar (Silva et al. 2003; Migliaro 2018a,b). Llevan vidas gregarias, integrando grupos donde las hembras superan a los machos en número 4 a 1 (Miranda, Silva, y Stoddard 2008). La especie presenta dimorfismo sexual (Silva et al. 1999; 2002; 2003), y durante la estación reproductiva (verano, Silva et al. 2003) los machos presentan comportamiento agonístico, compitiendo por el acceso a las hembras formando una estructura de lek explotado (Miranda, Silva, & Stoddard, 2008).

A.



B.



Figura 2: **A.** Dos individuos de *B. gauderio* **B.** Fotografía de Laguna Lavalle en Tacuarembó, Uruguay, con los camalotales que forman el hábitat de la especie..

B. gauderio es un pez de pulso con una DOE característica: presenta una FB-DOE promedio de entre 15 y 20 Hz (reposo, 20°C), y una forma de onda bifásica (Stoddard et al. 2006). Como muchos otros gymnotiformes nocturnos *B. gauderio* presenta un aumento gradual y sostenido en la FB-DOE durante la noche (Silva et al 2007, Stoddard et al 2007). Este aumento es dependiente de melatonina y es eliminado al administrar Luzindol, un antagonista de los receptores MT1/MT2 de melatonina (Migliaro y Silva 2016). Este aumento nocturno en la FB-DOE se ve potenciado cuando

el animal se encuentra en contexto social (Silva 2007). En *Gymnotus omarorum*, una especie simpátrida, también se ha demostrado que la inyección intraperitoneal (IP) de melatonina durante el día es capaz de reproducir el aumento nocturno en la FB-DOE (Migliaro, 2018).

Al ser especies con un alto grado de gregariedad, el contexto social es especialmente importante en la regulación de la conducta eléctrica. Se ha estudiado en particular su modulación en el cortejo y el comportamiento agonístico: Los machos de *B. gauderio* aumentan la amplitud y la duración de sus descargas en la noche, y las hembras se ven atraídas hacia machos con descargas más largas y de mayor amplitud (Curtis y Stoddard 2003).

Tras una contienda agonística, los machos dominantes tienden a subir su FB-DOE como señal de dominancia. En cambio, en *G. omarorum*, que presenta una dinámica social diferente, son los individuos subordinados quienes modulan su FB-DOE. (Perrone, 2012). Para ambas especies se sabe que esta regulación de la FB-DOE se encuentra mediada por el neuropéptido hipotalámico arginina vasotocina (AVT), el modulador social por excelencia en vertebrados (Goodson y Bass 2001). En *G. omarorum*, la inyección de AVT intraperitoneal (IP) bloquea la señal de sumisión (una disminución en la FB-DOE), mientras que en *B. gauderio* la administración de un antagonista de receptores de AVT (Manning Compound) previene el aumento de FB-DOE característico de la dominancia. (Perrone 2010). Esto es interesante ya que evidencia que el contexto social modula la FB-DOE en ambas especies, a través del mismo mediador hormonal, pero sin embargo la dinámica de la modulación difiere entre especies con socialidades distintas.

Varios trabajos han abordado el estudio de la regulación central del comportamiento eléctrico con un foco en el NEB en esta especie. La inyección de glutamato, por ejemplo, presenta diferentes efectos dependiendo de en qué área del NEB se administre (Quintana et al. 2011, 2014). También el AVT actúa de forma directa sobre el NEB: su administración provoca un aumento gradual y sostenido en la **frecuencia de descarga del NEB (FB-NEB)** de cerebros de *B. gauderio*, similar al efecto sobre la

FB-DOE tras una inyección de intraperitoneal (IP) de AVT. Como un último ejemplo la secretoneurina, otro neuropéptido asociado a sistemas moduladores de la conducta social, también produce un efecto sobre FB-NEB de *B. gauderio* dependiendo de la FB-NEB inicial (Pouso et al. 2015).

B. gauderio es, entonces, un gymnotiforme nocturno con una estructura social gregaria, cuya actividad nocturna se ve acompañada por un aumento en su FB-DOE (Silva et al. 2007, Migliaro 2018a,b). Este aumento es comandado por el NEB, la estructura central en la modulación de las DOEs, y puede ser inhibido utilizando un antagonista de melatonina (Migliaro y Silva 2016). Visto que se ha comprobado que en otros peces que presentan ritmos circadianos dependientes de melatonina en su comportamiento social (Feng y Bass 2016) las áreas encargadas del control motor de las señales comunicativas expresan receptores de esta hormona (Feng, Marchaterre, y Bass 2019), sería parsimonioso que la melatonina modulara el comportamiento eléctrico de estos peces actuando directamente sobre el NEB.

Así nos planteamos analizar el rol de la melatonina en la regulación de la FB-DOE y su influencia sobre el NEB, aportando a comprender más profundamente las bases neurofisiológicas del comportamiento animal. Hipotetizamos que la melatonina genera un aumento en la FB-DOE, similar al aumento nocturno característico de la especie, mediante una acción directa sobre el NEB.

3. OBJETIVOS:

Objetivo General: Analizar el efecto de la melatonina sobre la conducta eléctrica de *Brachyhyopomus gauderio* y sobre la estructura neural que la controla.

Objetivos específicos:

- 1) Analizar el efecto de la administración de melatonina sobre la FB-DOE de *B. gauderio*.
- 2) Analizar el efecto de la administración de melatonina sobre la actividad eléctrica del núcleo electromotor bulbar del cerebro de *B. gauderio*.

4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL:

Para abordar las hipótesis del trabajo se plantean dos abordajes experimentales diferentes:

- 1) En primer lugar se intenta dilucidar el efecto de la melatonina de forma sistémica, para determinar si su acción es suficiente para generar el aumento en la frecuencia de descarga del órgano eléctrico (FB-DOE) característico de la noche. Para esto se realizaron experimentos conductuales registrando las DOEs en animales tratados con inyecciones intraperitoneales (IP) de melatonina en el día.
- 2) En segundo lugar se plantea comprobar si la modulación melatoninérgica del comportamiento eléctrico del individuo ocurre a través de la actividad de esta sobre el núcleo electromotor bulbar (NEB). Para esto se planteó un abordaje *in vitro* trabajando directamente con una sección de tronco encefálico que contiene el núcleo, y viendo los efectos de la melatonina sobre la actividad espontánea de este.

5. MATERIALES Y MÉTODOS:

5.1. Animales:

Los especímenes de *B. gauderio* (n=31) fueron colectados en la Laguna Lavelle (31°480S, 55°130W), en el departamento de Tacuarembó, Uruguay, utilizando un detector de corriente eléctrica formado por un amplificador de audio conectado a un par de electrodos y capturados usando un calderín. (Silva, Quintana, Galeano, & Errandonea 2003) Los peces fueron luego trasladados al Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable donde fueron mantenidos en condiciones semi-naturales en el bioterio de poiquilothermos institucional. Brevemente, los animales se alojaron en piscinas exteriores de 500L acondicionadas para amortiguar las influencias ambientales extremas del invierno y verano. La conductividad del agua se mantuvo por debajo de los 150 μ S/cm, y la superficie de las piscinas se cubrió con vegetación extraída del hábitat natural para asemejarse lo más posible a las condiciones naturales. Los grupos de peces se mantuvieron en las proporciones sexuales observables en la naturaleza de

3 hembras por macho (Miranda, Silva, & Stoddard, 2008), y se alimentaron con *Tubifex tubifex*. Todas las manipulaciones se encuentran aprobadas por la CEUA del IIBCE:

Protocolo aprobado N°009/05/2012

Protocolo aprobado N°004/05/2016

Protocolo aprobado N°001/02/2018

5.2. Experimentos comportamentales:

Los experimentos tuvieron lugar en la estación de registro del Grupo de Bases Neurales de la Conducta, (Dpto Neurofisiología Celular y Molecular, IIBCE). Esta consiste de 4 peceras individuales de 40l (55cm × 40cm × 25cm). Las DOEs fueron registradas utilizando 2 pares de electrodos ortogonales, ubicados en las paredes de los tanques, conectados a amplificadores (FLA-01, Cygnus Technologies Inc.). Las señales eléctricas son capturadas por la tarjeta de sonido de la computadora de la estación utilizando el software Goldwave (v.6.52). La estación se mantuvo bajo un protocolo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad (luz de 7am a 7pm) utilizando un temporizador automático, a temperatura ambiente constante (20°C) y con agua declorada (conductividad≈100µS), asimilando las condiciones experimentales a las naturales (Silva et al. 2003).

El día previo al experimento los peces fueron retirados de las piscinas, pesados, sexados por dimorfismo anatómico, y depositados en las peceras individuales, permitiendo su aclimatación. Los registros comenzaron a las 10 hs de la mañana siguiente. Se registró durante una hora, y luego los peces recibieron una inyección intraperitoneal de 100µL de:

(a) Solución control (Salino + etanol) n = 9

(b) Solución Mel. 1 (5µg/g) n = 7

(c) Solución Mel. 2 (50µg/g) n = 7

Se registró durante dos horas, tras las cuales el experimento se dió por finalizado y los animales fueron puestos en observación, para luego ser devueltos a las piscinas comunales del bioterio. El agua de las piscinas fue cambiada entre experimentos para evitar la influencia de agentes externos.

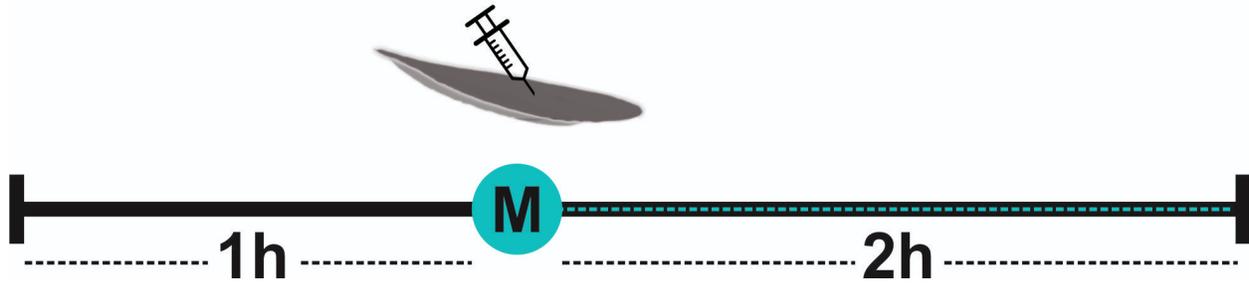


Figura 3: **A.** Esquema de protocolo experimental de los experimentos comportamentales. M: melatonina.

Análisis de datos:

Los registros fueron procesados utilizando el software Clampfit (v.10.2). En la figura 4 se muestra un tren de descargas de DOEs, así como la forma de onda de una DOE de un animal en las peceras de registro.

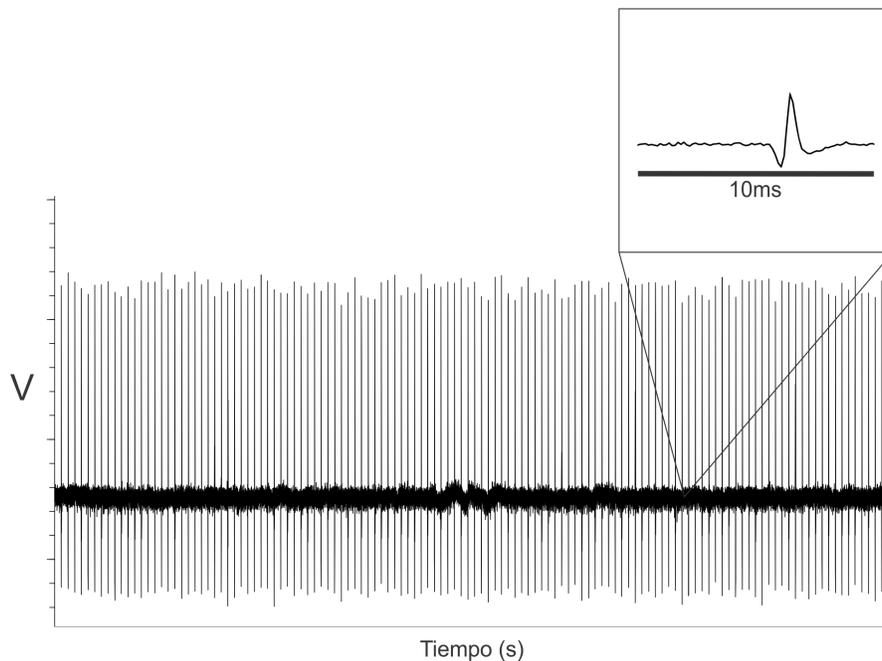


Figura 4: Ejemplo de registro de tren de DOEs de un animal representativo. El recuadro muestra la forma de onda de una descarga.

Se tomó un minuto de datos cada 10 minutos de registro y se utilizó un protocolo de umbral para calcular el intervalo entre las DOEs, obteniéndose la frecuencia instantánea entre cada DOE. Se calculó la frecuencia media, la varianza y desvío estándar para cada sección analizada. Los valores de FB-DOE fueron normalizados

(FB-DOEin) contra los valores en los 10 minutos previos a la inyección (t=-10) mediante el siguiente índice:

$$FB-DOEin(x) = \frac{FB_{DOE}(x) - FB_{DOE}(-10)}{FB_{DOE}(-10)}$$

Los datos de frecuencias instantáneas fueron agrupados en 3 grupos: pre inyección, frecuencias de la primera hora posterior a la inyección, frecuencias de la segunda hora posterior a la inyección. Para cada grupo se determinó la frecuencia media, desvío estándar y coeficiente de variación.

Se optó por realizar un segundo análisis para determinar la variabilidad de la frecuencia de descarga de la DOE. Se volvieron a analizar los registros de DOEs utilizando el software MatLab, aplicando un programa de detección de picos. Se obtuvo la frecuencia instantánea entre cada DOE durante las 3 horas del experimento. Los datos fueron agrupados en pre-inyección y pos-inyección, y se realizó un análisis de Poincaré. Se ajustaron elipses a la nube de puntos de cada individuo y se calcularon los ejes para ser utilizados como medida de variabilidad. También se determinó el coeficiente de variación de las frecuencias de estos dos momentos para cada grupo experimental. Este análisis utiliza todos los datos de frecuencia instantánea durante todo el período de registro, eliminando sesgos posibles al momento de seleccionar los registros para el análisis. Esto también significa que aumentos transitorios y de corto plazo (como por ejemplo chirps o respuestas de novedad) son tomados en cuenta a la hora de calcular las frecuencias y coeficientes de variación (CV) medios.

5.3. Experimentos *in vitro*:

Los animales (n=8) se anestesiaron con pentobarbital (5µl/g del animal) y frío. Una vez anestesiados se ubicaron en un soporte adecuado para la cirugía que permite la fijación de la cabeza y la ventilación constante con agua filtrada a baja temperatura. Se quitó la parte superior del cráneo exponiendo al cerebro que fue extraído junto con parte de la médula y colocados en una solución fría de Ringer-sacarosa (en mM: 213 sacarosa, 3 KCl, 0.75 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 24 NaHCO₃, 10 D-glucosa, 1.6 CaCl₂, pH 7.2–7.4 luego de saturada con carbógeno). El cerebro fue luego adherido a un cubo de

agar utilizando adhesivo y agarosa de bajo punto de fusión al 3%. El material se colocó en un vibratomo y se tomó una sección del tronco encefálico de 600µm de espesor que contiene el NEB. Para aclimatar al núcleo a la solución Ringer-fisiológica (en mM 124 NaCl, 3 KCl, 0.75 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 1.6 CaCl₂, 24 NaH₂CO₃, and 10 D-glucosa, pH = 7.4 luego de saturada con carbógeno) utilizada durante el registro, la solución Ringer-sacarosa fue progresivamente suplantada por la solución de registro, sustituyendo el 50% media hora después de la extracción y repitiendo este procedimiento hasta completar 2 horas de aclimatación en presencia de gas carbógeno (95%O₂ y 5%N). La sección fue luego transferida al set-up electrofisiológico, dispuesta en una cámara de registro de 4ml y asegurada en el lugar utilizando una pequeña pesa metálica. La cámara recibe un flujo de solución Ringer-fisiológica carbogenada y es mantenida a temperatura ambiente. En estas condiciones, el NEB mantiene su actividad normal por varias horas.

Para registrar la actividad espontánea del NEB una micropipeta de vidrio (3-5MΩ) llena con solución ringer se colocó en el área cercana del NEB. Las micropipetas de vidrio fueron confeccionadas específicamente utilizando un estirador automático (Sutter Instrument P-97) La señal fue amplificada (AM Systems, M3000, filters 150–3000 Hz) y el potencial de campo fue monitoreado utilizando un osciloscopio. Se comprobó que el núcleo estuviese estable y la señal clara y se registró la frecuencia basal por al menos media hora. Se tomó 1 minuto de registro cada 10 minutos utilizando el software AxoScope (v10.2).

Se realizaron tratamientos con melatonina y con vehículo a modo de control. En ambos casos el tratamiento se realizó perfundiendo 500 µL de la solución objetivo. En los tratamientos con melatonina se emplearon dos dosis: [Mel]=0.25mg/ml, y [Mel]=1.25mg/ml. Se decidió no separar los resultados entre dosis al no observarse diferencias entre ellas. Los experimentos comenzaron con administración de tratamiento o vehículo alternativamente. El protocolo completo se describe a continuación. i) se administraron 500µL de la solución vehículo y se registró la FB-NEB durante al menos 1 hora; ii) luego se administraron 500µL de una solución de melatonina ([Mel]=1.25mg/mL) y se tomaron registros durante al menos 40 minutos

cada 5 minutos; iii) pasado ese período se abrió el flujo de solución Ringer para lavar la rodaja y se tomaron registros durante 1 hora.

Por cuestiones metodológicas no todos los experimentos completaron las tres etapas. De los 8 experimentos realizados en 2 se completó el protocolo propuesto, mientras que en los demás se realizó, con los tiempos y manipulaciones apropiados, sólo uno de los tratamientos. Todos los experimentos se comenzaron en la mañana (entre 10 y 12am).

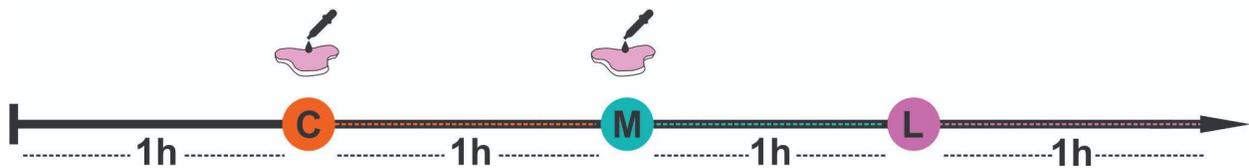


Figura 5: Esquema de protocolo final experimental de los experimentos *in vitro*. C: control con vehículo, M: melatonina, L: Lavado.

Análisis de datos:

Los registros fueron procesados utilizando el software Clampfit (v.10.2). La figura 6 muestra un registro de tren de descargas del NEB, así como la forma de onda del campo eléctrico registrado.

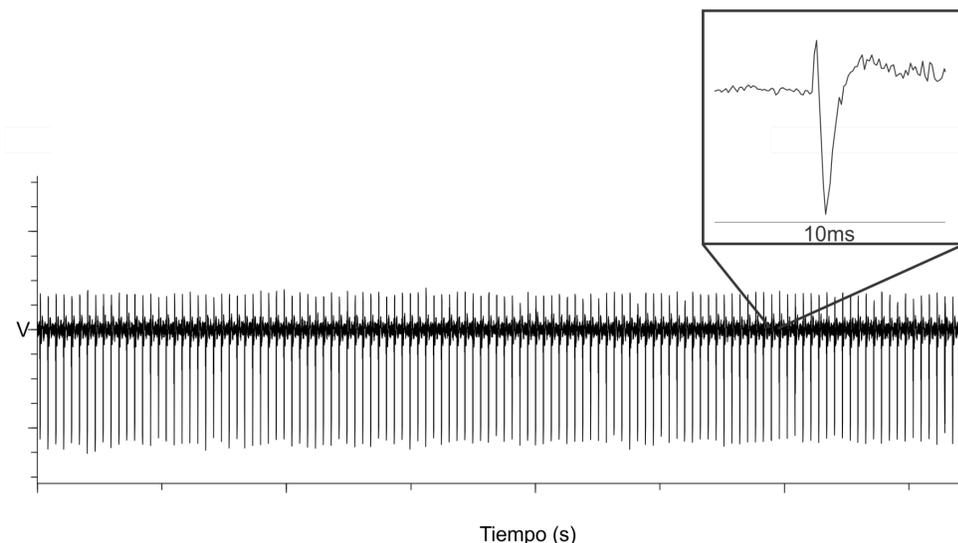


Figura 6: Ejemplo de registro de tren de descargas del NEB. El recuadro muestra la forma de onda del campo eléctrico de una descarga.

Se obtuvo la frecuencia media, varianza y desvío estándar para cada momento, y se generaron índices de FB-NEB (FB-NEBin), normalizando cada valor contra el t=0 de ambos tratamientos:

$$FB-NEBin(x) = \frac{FB_{NEB}(x) - FB_{NEB}(0)}{FB_{NEB}(0)}$$

En segundo lugar, los datos de frecuencia instantánea se agruparon en dos grupos: la hora pre-tratamiento (PRE) y la hora pos-tratamiento (POST), y se analizó los cambios en frecuencia media y la variabilidad. En el análisis de variabilidad, se optó por utilizar únicamente 4 de los 6 núcleos debido a una variabilidad inusualmente alta en 2 de ellos.

5.4 Preparación farmacológica:

La melatonina debe ser disuelta utilizando un solvente orgánico, y para este trabajo se utilizó etanol 100% como solvente. En ambos grupos experimentales se preparó una solución madre de melatonina disolviendo 5mg de Mel. (SIGMA) en 100µL de etanol y agregando 400µL de solución salina (exp. comportamentales) o ringer (exp. In vitro) ([Mel]=10mg/mL). A lo largo del proceso se utilizaron tres lotes independientes de melatonina, con resultados consistentes entre ellos.

Las soluciones vehículo entonces fueron preparadas utilizando también 100µL de etanol y agregando 400µL de salino/ringer, para sí poder determinar si el efecto observado no se ve influenciado por la presencia del etanol.

5.5. Análisis estadístico:

Dada la naturaleza de los datos, se utilizaron tests no paramétricos. Para el análisis de la variación en la FB-DOE y FB-NEB se utilizaron pruebas no pareadas (test U de Mann-Whitney, prueba de Kruskal-Wallis, test de comparaciones múltiples de Dunn). Se utilizaron pruebas pareadas (test de Wilcoxon) para el segundo método de análisis de variabilidad de FB-DOE.

6. RESULTADOS:

Este capítulo se encuentra subdividido en tres secciones: **1)** El efecto de la melatonina sobre la conducta eléctrica del animal en libre movimiento, **2)** el efecto de la melatonina en un preparado *in vitro* del núcleo marcapasos (NEB), y, por último, **3)** el efecto de la melatonina sobre la variabilidad tanto de la conducta eléctrica del animal en libre movimiento, como de la actividad del NEB.

6.1. Cambios sistémicos: Efecto de la Melatonina sobre la frecuencia basal de la DOE

La inyección intraperitoneal de melatonina provocó una disminución en la FB-DOE. En individuos tratados con la dosis de 50µg/g de melatonina se observa una disminución de la FB-DOE en todos los animales (n=7). Se observó una disminución gradual de la FB-DOE llegando a un mínimo alrededor de los 20-30 minutos, y un retorno lento a los valores originales. En un único individuo la inyección intraperitoneal de melatonina fue seguida por un aumento en la FB-DOE de casi dos veces los valores iniciales seguido de una gran disminución de estos valores. Los efectos observados en los individuos tratados con la dosis de 5µg/g de melatonina (n=7) fueron menos claros: en varios de los individuos se observó una disminución de la FB-DOE a los 10 minutos de la inyección, seguido de un rápido retorno a valores cercanos a los registrados previo a la inyección. Los individuos tratados con la solución control (n=9) no presentaron cambio en su FB-DOE tras la inyección del vehículo.

La figura 7 muestra ejemplos de la FB-DOE de un animal de cada uno de los grupos experimentales, y la respuesta de cada uno de los individuos se puede encontrar en el anexo 1.

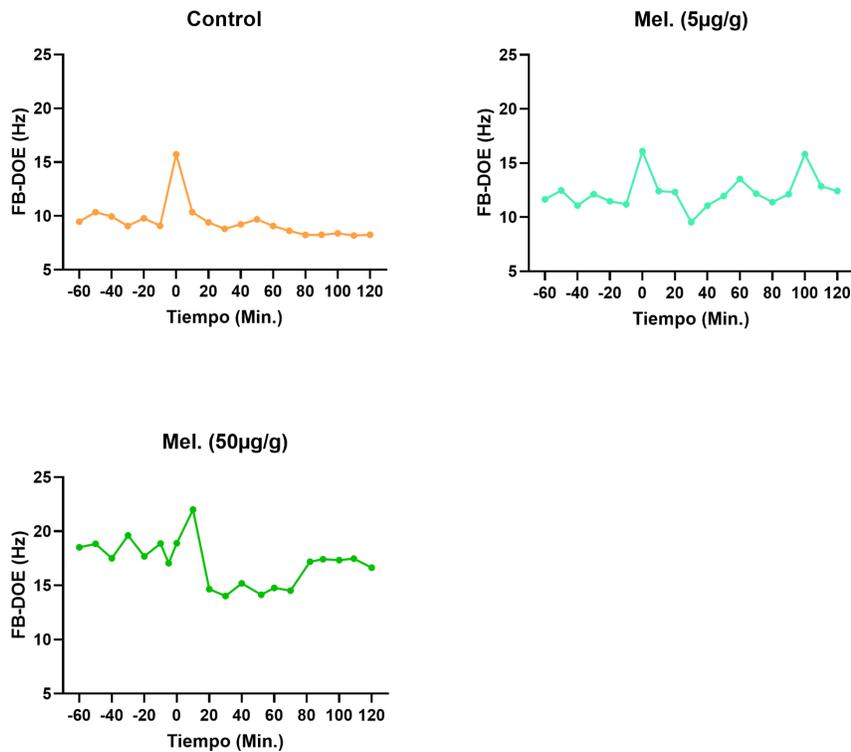


Figura 7: Variación de la FB-DOE en el tiempo en un animal de cada grupo experimental. Cada punto marca la media de las frecuencias instantáneas tomadas durante 1 minuto. t=0 marca el momento de la inyección intraperitoneal.

En la figura 8 se muestran los valores normalizados de FB-DOE para todos los grupos experimentales dentro de la primera y segunda hora post-tratamiento. El valor de FB-DOE en los animales tratados con la dosis de 50µg/g (n=7) disminuyó al 84% en la primera hora y al 74% en la segunda hora. Estas diferencias en relación al grupo control fueron estadísticamente significativas ($p=0.0003$, $p=0.0001$ respectivamente, test de Dunn). No se obtuvieron diferencias entre el grupo control y los animales tratados con la dosis de 5µg/g, pero sí se observaron diferencias entre los grupos tratados con diferentes dosis en la 1er ($p=0.0381$, test de Dunn) y 2da ($p=0.0002$, test de Dunn) hora pos-inyección. Curiosamente, se observó un aumento en los valores de la primera hora del grupo control ($p=0.0223$). Este aumento desaparece si excluimos los valores de los 10 minutos luego de la inyección, lo que sugiere que se debe a un efecto de la manipulación experimental.

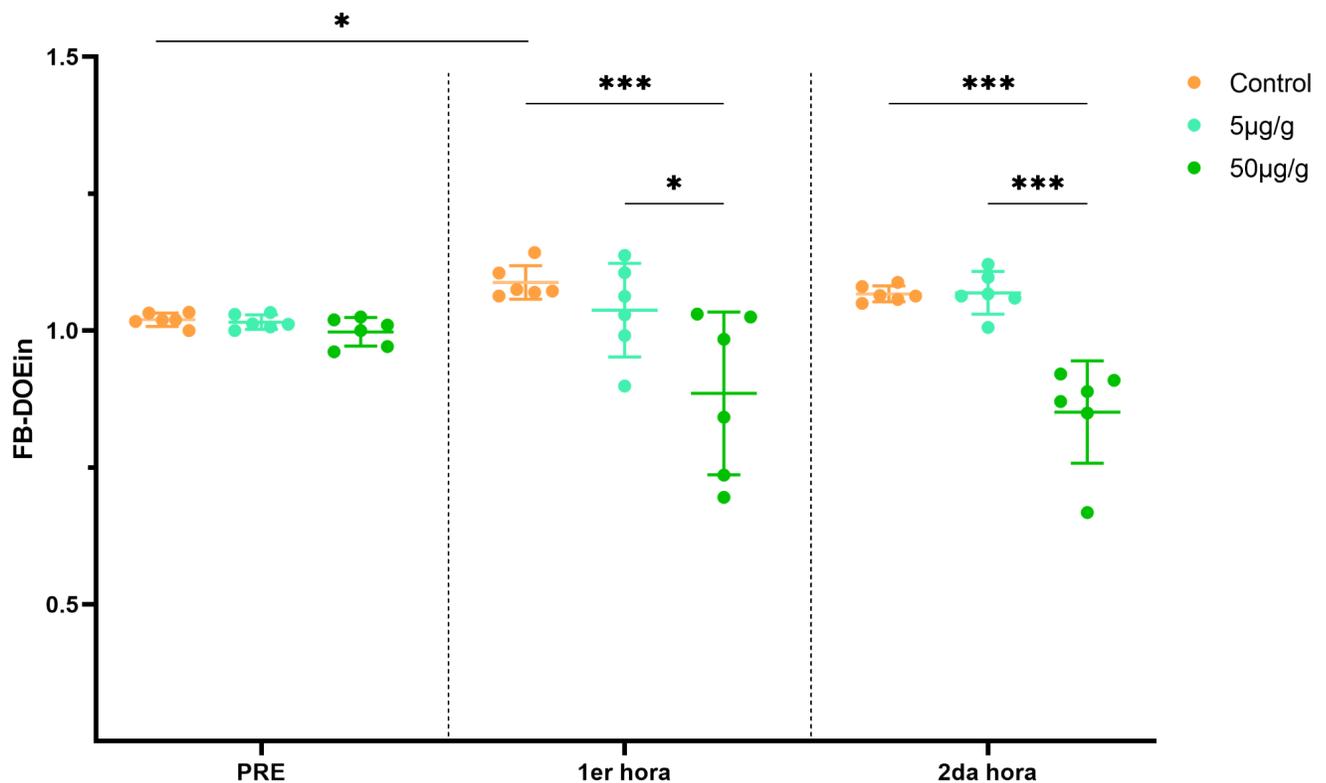


Figura 8: Valores medios de FB-DOE (normalizada) en la hora pre inyección (PRE), la 1er hora luego de la inyección (1er hora), y la 2da hora luego de esta (2da hora), para los 3 grupos experimentales (control, n=9; Mel. 5g/g n=7; Mel. 50g/g, n=7) . Los valores se muestran como media \pm DE. Se realizó un test de comparaciones múltiples de Dunn, *p \leq 0.05, **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001.

6.2. Cambios en el SNC: Efecto de la Melatonina sobre la frecuencia basal del NEB

En la preparación de núcleo aislado *in vitro*, al ubicar las pipetas en cercanía al NEB se observa un potencial campo bifásico característico de este núcleo. La forma de onda del campo depende de la ubicación de la pipeta relativa a las células del núcleo. En este trabajo sólo se analizan los cambios en frecuencia de descarga, no en forma de onda. En los registros *in vitro* se observa una descarga espontánea del núcleo marcapasos de frecuencia constante a lo largo del tiempo, observándose pequeñas oscilaciones (Fig. 9). Esta estabilidad ha sido observada previamente en otros trabajos

de este grupo (Perrone, Migliaro y Comas 2014; Migliaro & Silva 2016). La FB-NEB presenta, sin embargo, una alta variabilidad interindividual, en un rango de 7.99-23.2Hz (Fig. 9), por lo que para el análisis cuantitativo se optó por trabajar con índices.

En las pruebas *in vitro*, luego de la administración de melatonina por perfusión se constató una disminución en la FB-NEB (fig. 9). Este efecto siguió un curso temporal similar en todos los núcleos registrados: se observó una disminución progresiva de la FB-NEB, que fue revertida al incrementar el flujo de solución fisiológica de perfusión (lavado), tendiendo a volver a los valores iniciales.

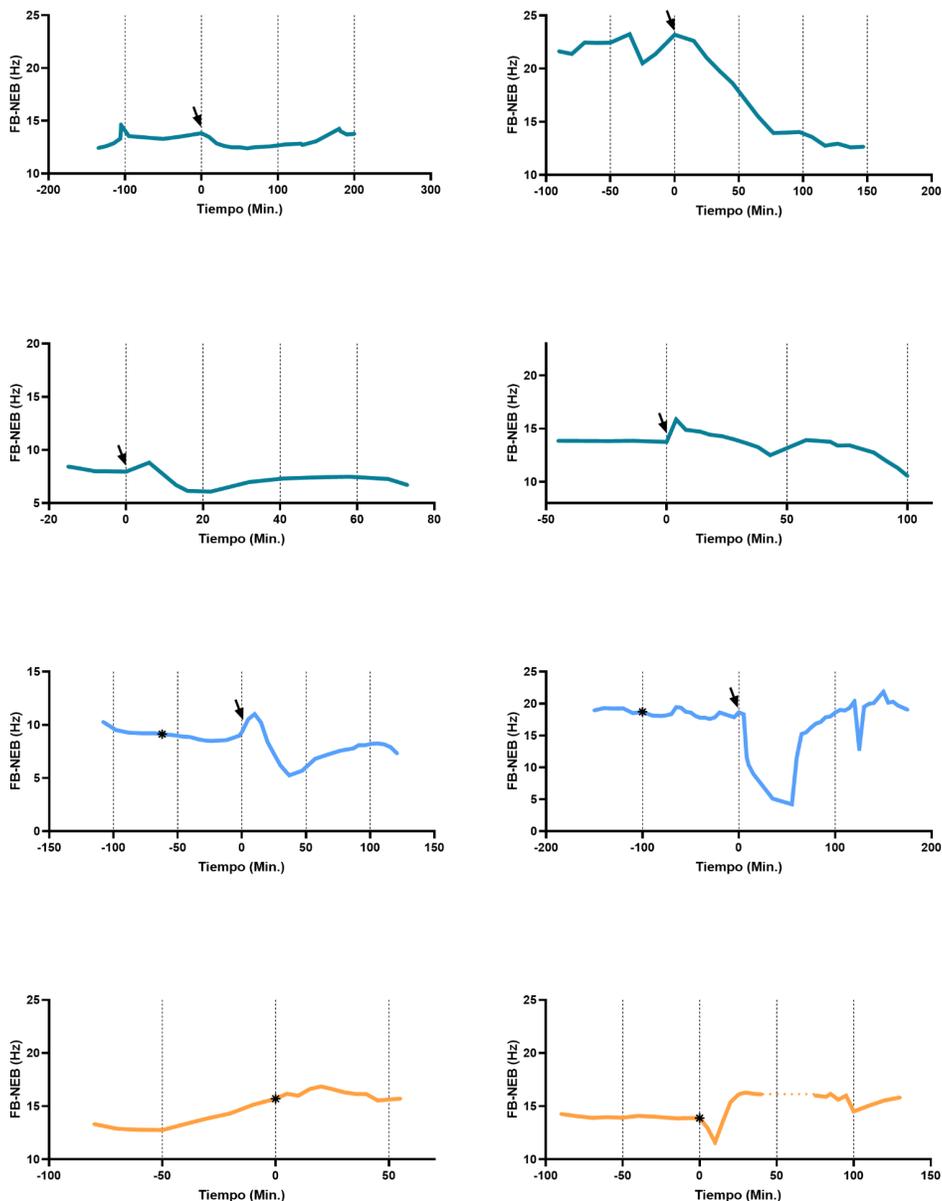


Figura 9: Frecuencia de la actividad espontánea del NEB en todos los núcleos. Las figuras azul oscuro representan los casos donde solo se aplicó melatonina en el protocolo, las celeste aquellos casos donde se aplicó el vehículo seguido por el fármaco, y las naranjas los casos donde solo se aplicó el vehículo. La flecha negra marca el momento de aplicación de melatonina. En los casos donde se aplicó una solución control, el momento de aplicación se marca con un asterisco. Las líneas punteadas representan momentos donde no se logró obtener datos debido a una baja relación señal/ruido.

La figura 10A muestra los valores de FB-NEBin en diferentes momentos con respecto a la administración con melatonina. El valor medio de la FB-NEBin a los 40 minutos de aplicada la melatonina fue un 0.737 del valor previo al tratamiento farmacológico (PRE vs T40, $n=6$, $p=0.0492$, test de Dunn). Este valor fue aún menor en el momento de lavado, llegando a un mínimo de 0.6283 (PRE vs LAVADO, $n=6$, $p=0.0067$, test de Dunn). En contraste, no se encontró diferencia entre el valor medio de FB-NEBin previo al tratamiento y en los 10 minutos posteriores a este ($p>0.9999$), ni a los 10 o 20 minutos de realizado el lavado del núcleo ($p=0.0666$ y $p=0.4725$ respectivamente). El valor medio de FB-NEBin a los 40 minutos también fue significativamente menor al valor tomado en ese mismo momento del grupo control ($p=0.0317$, Mann Whitney); en este grupo no se observó ninguna diferencia luego de administrada la solución ($p=0.3595$, Kruskal-Wallis) (fig. 10B).

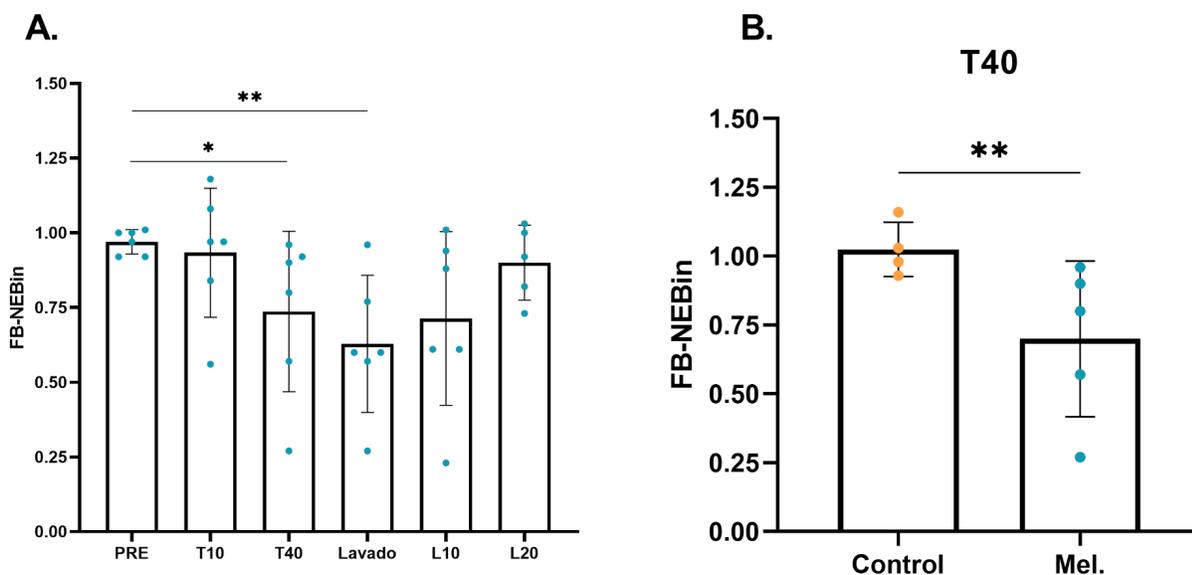


Figura 10: **A.** Valores de FB-NEB normalizados (FB-NEBin) a distintos puntos del experimento. PRE: 10 minutos antes de la administración de mel. (T10: 10 minutos desde T0. T40: 40 minutos pasado T0. L:

Lavado. L10: 10 minutos pasado el lavado. L20: 20 minutos pasado el lavado). **B.** Valores medios de FB-NEBin a los 40 min. administrada la solución control o de melatonina. Los valores se muestran como media \pm DE. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

6.3. Cambios en los cambios: Efecto de la melatonina sobre la variabilidad

Al observar las gráficas de frecuencia de descarga del órgano eléctrico en función del tiempo, algo que llama la atención es la variabilidad inter e intra individual en la FB-DOE tras inyectar melatonina, más considerando la estabilidad usual del comportamiento eléctrico. Teniendo estas observaciones en cuenta se propuso estudiar el efecto de la melatonina sobre la variabilidad de la FB-DOE. Para no perder la variabilidad a corto plazo entre descarga y descarga se tomaron todos los datos de frecuencia instantánea muestreados cada 10 minutos, a diferencia de los casos anteriores, donde se tomaba el promedio de estos datos.

La fig. 11A muestra los coeficientes de variación (CV) media de los diferentes grupos experimentales antes y después de la inyección intraperitoneal de melatonina o vehículo. Al tratar a los animales con melatonina se observa un aumento en la variabilidad de la FB-DOE. En los animales tratados con la dosis de $5\mu\text{g/g}$ ($n=7$) el valor de CV medio aumenta de 0.072 a 0.191 ($p=0.0016$, Dunn's pos hoc) y en los tratados con la dosis de $50\mu\text{g/g}$ ($n=7$) aumenta de 0.086 a 0.238 ($p=0.0305$, test de Dunn). Estos cambios son también significativos con respecto a los controles ($n=9$) ($p=0.0008$ y $p=0.0012$ respectivamente). El tratamiento control no produjo efecto ($n=9, p=0.9070$, test de Dunn). No se encontró un efecto dosis dependiente en la variabilidad de la FB-DOE.

Al segmentar los datos post-inyección en períodos de media hora (fig. 11B) se observa que este aumento es mayor en la primera media hora en ambos grupos experimentales, y este luego disminuye paulatinamente hasta retornar a los valores más cercanos a los iniciales.

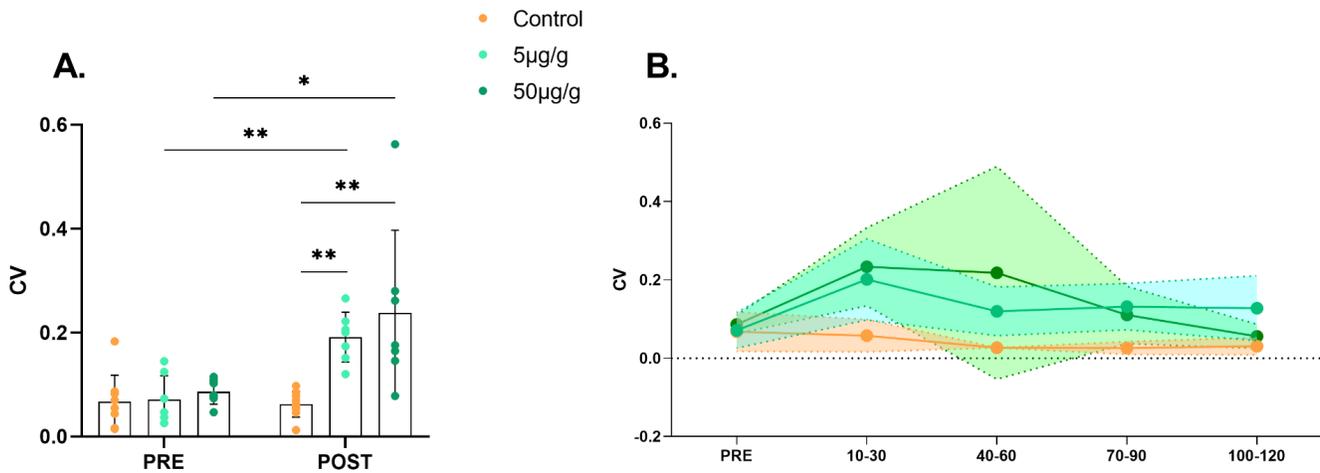


Figura 11: **A.** Coeficiente de variación entre los valores de frecuencia instantánea de las DOEs previo (PRE) y posterior (POST) al tratamiento de los animales tratados con solución control (n=9), mel. 5µg/g (n=7) y mel. 50µg/g (n=7). Los valores se muestran como media ± DE *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001, ****p≤0.0001. **B.** Coeficiente de variación entre los valores de frecuencia instantánea de las DOEs agrupados en períodos de 30 minutos. Los valores se muestran como media ± DE.

Se realizó un gráfico de poincaré para cada animal, y se ajustó una elipse a la nube de puntos, utilizando los ejes de esta elipse como parámetros de variabilidad. En la fig. 12 se muestra un ejemplo de una gráfica de poincaré para un animal tratado con melatonina en la dosis más alta.

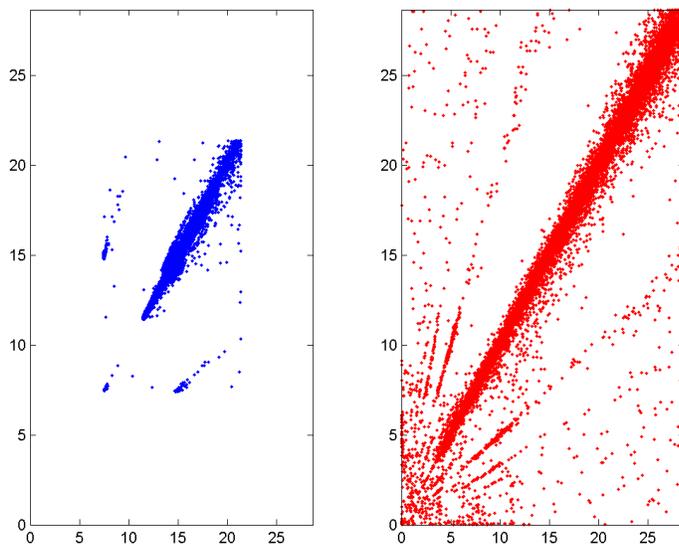


Figura 12: Análisis de poincaré de un pez tratado con una dosis de 50g/g de melatonina. En azul los valores de frecuencia de la DOE previo a la inyección, en rojo los valores luego de esta.

En los animales tratados con la dosis de 50µg/g, el valor medio del eje corto (variabilidad ciclo a ciclo) aumentó en un 111% (de 11,95 a 25,22) ($p=0,0469$; $n=7$; Wilcoxon) y el eje largo (variabilidad a largo plazo) aumentó en un 88,8% (16,09 a 30,38) ($p=0,0313$; $n=7$, Wilcoxon). No se observó efecto en los individuos tratados con la solución control ni en los individuos tratados con la dosis de 5µg/g (fig. 13A).

Al calcular los coeficientes de variación se observaron resultados similares (fig. 13B). El valor medio de CV de los animales tratados con la dosis de 50µg/g aumentó casi diez veces luego del tratamiento con melatonina, aumentando de 0,293 a 2 ($p=0,0313$; $n=7$, Wilcoxon). No se observó efecto en los individuos tratados con la dosis más baja, ni en los individuos tratados con la solución control.

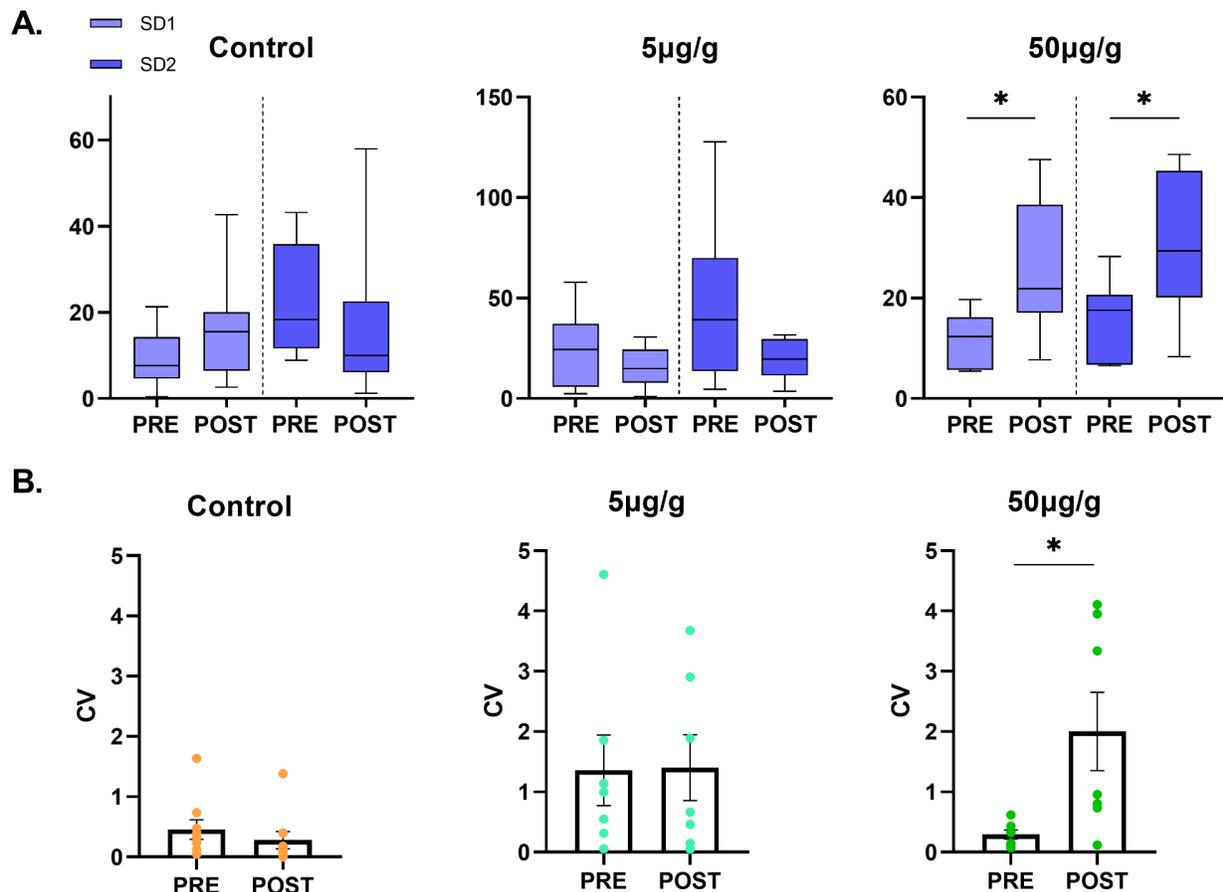


Figura 13: **A.** Valor medio de los ejes de las elipses ajustadas según un análisis de poincaré de los valores de frecuencia de las DOEs de los animales antes y luego de la inyección de melatonina, para

todos los grupos experimentales. SD1 representa el eje menor (variabilidad a corto plazo) y SD2 representa el eje mayor (variabilidad a largo plazo) (* $p \leq 0.05$) **B.** Valor de coeficiente de variación medio para todos los valores de frecuencia previo (1 hora) y luego (2 horas) de la inyección de melatonina de todos los animales, para todos los grupos experimentales (* $p \leq 0.05$). Los valores se muestran como media \pm S.E.M.

Para determinar si este aumento en la variabilidad de la FB-DOE partía de un aumento en la variabilidad en el NEB, se agruparon los datos de frecuencia instantánea de las descargas del NEB según si fueron tomados antes (PRE) o luego (POST) del tratamiento con la solución control o melatonina (fig. 14). Si bien dado el n obtenido (se excluyeron n=2 individuos del grupo tratamiento por inconsistencias en la variabilidad) no se pudo realizar un análisis estadístico, se observa una tendencia al aumento en la variabilidad media del núcleo tras administrar la melatonina (y no así en controles).

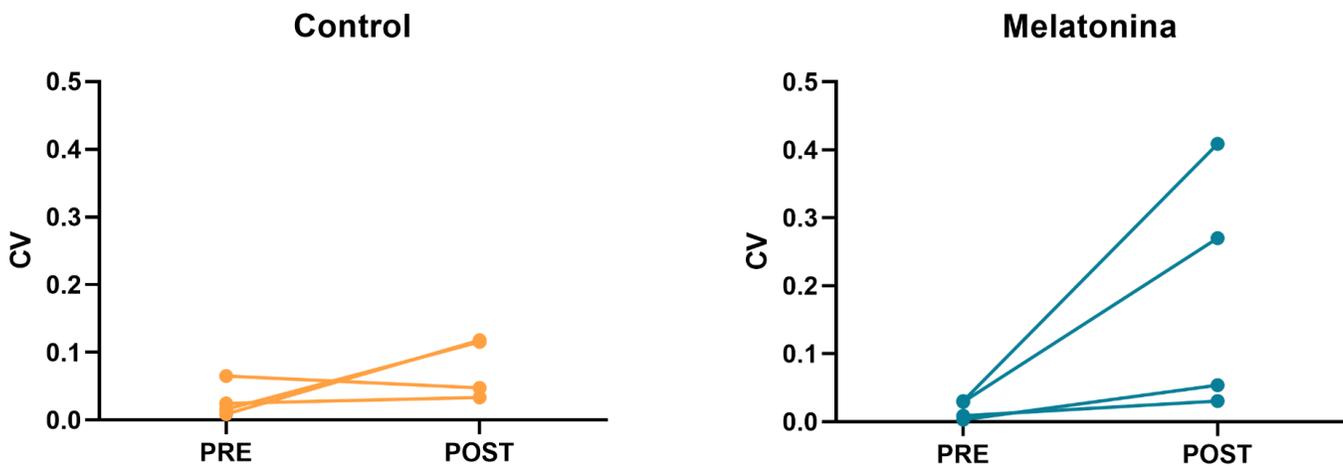


Figura 14: Coeficiente de variación de las frecuencias instantáneas de la actividad del antes (PRE) y después (POST) de los peces tratados con melatonina y con solución control.

7. DISCUSIÓN

7.1 Efecto de la melatonina sobre el NEB y la conducta eléctrica

Este trabajo demostró que la administración de melatonina tiene un efecto directo sobre el NEB, proponiéndolo como un blanco claro para la regulación diaria de la conducta eléctrica de estos peces. El efecto observado en el NEB fue consistente con lo observado en la FB-DOE tras una inyección IP de melatonina. En ambos casos tras la administración de melatonina se observó un descenso en la frecuencia de descarga.

Esto contradice nuestra hipótesis original. En una primera instancia planteamos que la administración de melatonina llevaría a un aumento, no una disminución, en la frecuencia de descarga tanto de la DOE como la actividad espontánea del NEB. Se ha demostrado que los animales tienen un aumento nocturno en su actividad eléctrica asociado a la nocturnidad, y que este aumento requiere de la acción de melatonina, ya que al bloquear su actividad este aumento desaparece (Migliaro y Silva 2016). Nuestra hipótesis plantea que dado el vínculo estrecho entre la actividad del NEB y la conducta eléctrica del animal, la melatonina estaría actuando directamente sobre este núcleo, aumentando su frecuencia de descarga. En este trabajo confirmamos que la melatonina tiene un efecto regulador sobre la FB-NEB, y que este efecto es consistente con los efectos observados en los experimentos comportamentales sobre la FB-DOE. Si bien el efecto sobre la FB-DOE y FB-NEB es de valencia opuesta a lo que esperábamos, varios factores nos habilitan a confiar en estos resultados.

En primer lugar se tomaron los controles metodológicos necesarios para asegurarnos de la validez de estos resultados. En segundo lugar, la melatonina tuvo un efecto robusto y fuertemente consistente en ambos tratamientos experimentales por separado. Por último este efecto fue también consistente entre los experimentos, confirmando que estamos observando un efecto de la melatonina sobre la vía electrogénica.

El efecto de la melatonina puede deberse al momento del día en el cual se realizaron los experimentos. Hay que considerar que estos tratamientos fueron realizados en el

día. Las inyecciones IP de melatonina en los experimentos comportamentales y las disecciones de NEB fueron realizadas en la mañana (ambos casos entre las 10am y 12pm). La presencia, abundancia y especificidad de los distintos receptores de melatonina están regidos por ritmos circadianos (Oliveira et al. 2008; Confente et al. 2010, Shin et al. 2011, Choi et al. 2016), por lo que es enteramente posible que la respuesta a esta también dependa de la hora del día en la que se administra.

Es muy probable que la melatonina esté disminuyendo la FB-NEB mediante una disminución en la excitabilidad de las neuronas marcapasos del núcleo, aumentando el tiempo necesario para desencadenar un nuevo potencial de acción. Este efecto de la melatonina sobre la excitabilidad neuronal ha sido demostrado en varios modelos de osciladores neurales (Mason y Brooks, 1988; Shibata, Cassone, y Moore 1989; Stehle, Vanecek, y Vollrath 1989; Jiang, Nelson, y Allen 1995; Inyushkin et al. 2007; Scott et al. 2010; Oliveira-Abreu et al. 2019). Lo que es más, se ha demostrado que este efecto varía según la etapa del ciclo circadiano en la que se encuentra el preparado, presentando un efecto más pronunciado en el comienzo de la noche subjetiva, momento que coincide con el comienzo de la liberación de melatonina por la glándula pineal. En mamíferos se ha demostrado que la melatonina inhibe la actividad de la corriente ih (una corriente catiónica dependiente de hiperpolarización implicada en la regulación de el patrón de actividad de distintos osciladores cerebrales (Pape 1996) mientras a su vez lleva a una activación de la conductancia de potasio (Jiang, Nelson, y Allen 1995). Interesantemente, en *Apteronotus leptorhynchus*, una especie de pez eléctrico de onda, se demostró que si bien las corrientes Ih no están involucradas en la generación del ritmo de descarga del NEB, al bloquear las corrientes de potasio las neuronas del núcleo tendían a aumentar sus frecuencias de descarga y luego cesar de descargar completamente (Smith y Zakon 2000). Existe la posibilidad de que los mecanismos celulares y las corrientes iónicas implicadas no sean exactamente las mismas pero compartan características similares.

La nocturnidad natural del aumento de la FB-DOE entonces es probable que no sea mediada únicamente por una respuesta del NEB a la melatonina. Si bien en este trabajo demostramos que la melatonina exógena es capaz de modificar la actividad

espontánea del NEB, es muy posible que la regulación diaria del ritmo en FB-NEB también se vea afectada por otros sistemas que no se encuentran en la rodaja de tronco encefálico que se utiliza en el preparado in vitro, por lo que solo estaríamos viendo una parte del circuito.

Otro aspecto a considerar es que las respuestas celulares del NEB no son homogéneas. Dentro del núcleo distintos grupos celulares reciben distintas aferencias de estructuras pre-marcapasos (Juraneck y Metzner 1998), y responden de forma diferente a los mismos estímulos, como por ejemplo a la administración de glutamato (Quintana et al. 2014). Esta segregación funcional no fue considerada en nuestro acercamiento experimental. Es posible que la melatonina tenga efectos diferentes en distintos grupos celulares, y tal vez el efecto observado sea uno que eclipsa lo observado en la naturaleza, donde la melatonina puede estar actuando de forma más localizada.

Esto sin embargo no explicaría por qué la administración de forma sistémica, donde todas las estructuras están presentes, no desencadena la respuesta esperada de un aumento en la FB-DOE. Lo que es más, en la especie simpátrida *Gymnotus omarorum*, se ha demostrado que una inyección IP de melatonina sí desencadena un aumento en la FB-DOE similar al aumento nocturno (Migliaro 2018a). Es importante aquí volver a destacar entonces las diferencias ya reportadas en estas especies. Estas dos especies, si bien similares, tienen requerimientos ecológicos y comportamentales diferentes, y los mecanismos neuronales de regulación de la conducta deben responder a estos requerimientos. Se ha demostrado que el contexto social cumple un rol regulatorio sobre el aumento nocturno de FB-DOE en ambas especies (Silva, Perrone y Macadar, 2007, Migliaro 2018a). La respuesta diferencial de cada especie al tratamiento diurno con melatonina puede estar ligada a una diferencia en el rol y la importancia de la melatonina como modulador del ritmo diario. En *G. omarorum*, un animal territorial cuyos individuos se distribuyen de forma espaciada (Zubizarreta et al. 2020), la administración de un antagonista de melatonina (luzindol) es suficiente para bloquear el aumento nocturno en FB-DOE únicamente en animales aislados. Cuando estos animales se encuentran en presencia de coespecíficos este aumento se mantiene aún

en presencia del antagonista, lo que sugiere vías diferenciales de regulación dependiendo del contexto social en el que se encuentra el individuo (Migliaro 2018a). *B. gauderio*, en cambio, es un animal gregario, con grupos sociales más grandes y dinámicos (Miranda, Silva y Stoddard 2008). Cabe la posibilidad que en esta especie la melatonina sea necesaria para generar el aumento nocturno en FB-DOE, pero no suficiente para desencadenar la fisiología nocturna completa.

Todo esto es evidencia de un sistema complejo. Algo único a este modelo es el grado de interconexión entre los sistemas comunicativos y sensoriales, ya que adaptan su conducta eléctrica a las demandas ambientales y sociales, preservando a su vez la capacidad de distinguir objetos de su alrededor. Ambos sistemas hacen uso de las emisiones eléctricas constantes del animal, y las estructuras encargadas de regular ambos sistemas han de ser capaces de dialogar de forma rápida y eficiente. Esto exige un sistema intrincado y con un alto grado de interconexión, con estructuras, moduladores y circuitos en común.

7.2. Efecto de la Melatonina sobre la variabilidad en las frecuencias de descarga

La melatonina desencadenó un aumento en la variabilidad de la FB-DOE, dependiente de la dosis administrada. Para el estudio de variabilidad se utilizaron dos procedimientos alternativos (ver materiales y métodos). Si bien ambos procedimientos muestran el aumento de la variabilidad generado por la melatonina, el método automatizado no evidencia el efecto dosis dependiente y solo muestra el aumento generado por el tratamiento con la dosis más alta. Esto es coherente, ya que el primer análisis realizado toma segmentos de registro donde no se observan modulaciones transitorias de FB-DOE, mientras que en el análisis automatizado se utilizan las frecuencias instantáneas de todo el registro. Estas modulaciones transitorias tienen un efecto homogeneizador al ser consideradas junto a la FB-DOE. El efecto de la dosis de 5mg/g de melatonina sobre la variabilidad no parece ser lo suficientemente marcado para contraponerse a otros efectos modulatorios también presentes en los animales control. Sin embargo, ambos análisis evidencian un aumento marcado en la variabilidad

(tanto en el CV como el análisis gráfico de poincaré) tras el tratamiento con una dosis de 50mg/g de melatonina.

En los experimentos in vitro se observó también una tendencia similar sobre la actividad espontánea del NEB. Dados los criterios de inclusión utilizados para los cálculos de variabilidad estos experimentos contaron un n experimental bajo (n=4 ambos grupos), por lo que para afirmar o descartar con certeza un efecto de la melatonina sobre la variabilidad en las descargas espontáneas del NEB se deberían realizar más réplicas del ensayo. Sin embargo el aumento observado apunta a que la melatonina modula la variabilidad de la actividad eléctrica del NEB.

El NEB es el núcleo integrador encargado de generar el ritmo de DOEs, recibiendo aferencias de diferentes núcleos pre-marcapasos cuya activación desencadena diferentes efectos en el NEB, y por lo tanto en la DOE. *B. gauderio* es un animal nocturno cuya vida social en el hábitat natural se desarrolla durante la noche, período donde requerirá ser capaz de regular su FB-DOE de forma rápida para poder generar las señales eléctricas necesarias en la interacción social con coespecíficos.

En *A. leptorhynchus*, se ha demostrado que los *chirps* son precedidos por un aumento drástico en la variabilidad de la FB-DOE (Moortgat et al. 1998). Perturbar un oscilador no es sencillo (Vitar 2019). Para lograr la estabilidad observada en la periodicidad de las DOEs y las descargas del NEB es necesario un sistema robusto, que salvaguarde su funcionamiento frente a elementos perturbadores externos. Esto, a su vez, dificulta la capacidad de una respuesta rápida a estímulos. El aumento en variabilidad observado previo a las modulaciones sociales de la actividad eléctrica como los *chirps* puede deberse a cambios a nivel circuital/neuronal que faciliten la modulación del NEB, pero que a su vez lleven a una disminución en su robustez. Es posible también que en *B. gauderio* este aumento se mantenga de forma prolongada en la noche (mediante la acción de la melatonina), dado el alto nivel de interacción que mantienen los individuos, aumentando sus capacidades comunicativas. Esta hipótesis también se ve apoyada por investigaciones actuales del grupo, que han demostrado que en el hábitat natural se observa un aumento en la variabilidad acoplado al aumento nocturno en

FB-DOE (Gascue 2022, manuscrito en preparación). La modulación de la variabilidad por contexto social ha sido demostrada en la especie simpátrida *G. omarorum* (Gascue 2020). En forma interesante y similar a los discutido en el apartado anterior, el contexto social promueve un efecto opuesto sobre esta variable en estas especies. Nuevamente las diferencias en los contextos sociales de las especies (una territorial, la otra gregaria) estarían ejerciendo presiones ecológicas que requieren de respuestas conductuales diferentes.

Este trabajo logra reproducir este aumento de la variabilidad de la FB-DOE en condiciones de laboratorio en animales diurnos con la inyección de melatonina IP, de forma independiente al aumento nocturno de la FB-DOE. Esto sugiere que los mecanismos implicados en el aumento de la variabilidad difieren en algún nivel de los encargados de desencadenar el aumento en FB-DOE, algo que también ha sido observado en *A. leptorhynchus*, donde los animales responden a estímulos con aumentos en su variabilidad, su FB-DOE, o ambas de forma diferencial (Moortgat et al. 1998).

A pesar de poder independizarlas en el laboratorio, variabilidad y FB-DOE deben aumentar juntas para asegurar el repertorio conductual natural de la especie, por lo que utilizar la melatonina como modulador gatillo para ambos es una estrategia eficiente para garantizar de que los aumentos ocurran de forma sincronizada. Este tipo de acople temporal, donde un único mediador se encarga de desencadenar mecanismos independientes es común en sistemas donde la sincronización de las varias piezas es crítica para el funcionamiento del sistema entero (Adkins-Regan 2013).

Tomados en conjunto estos resultados abonan el conocimiento acerca de las bases neurales del comportamiento de *B. gauderio* y de los peces eléctricos en general, aportando pistas e indicios acerca del grado de complejidad e interconexión entre los sistemas sensoriales, y comunicativos, así como con las áreas cerebrales implicadas en la regulación circadiana, el control motor-sensorial y el cerebro social.

7.3 Perspectivas

1. Sería interesante comprobar la presencia de receptores de melatonina en el NEB a través de técnicas transcriptómicas. Por otro lado, se sabe que varias áreas cerebrales expresan genes de la familia *Annat1* (Falcón et al. 2011) por lo que también sería interesante investigar la posibilidad que el NEB sintetizara su propia melatonina, tal vez comprobando la expresión de estos genes en el núcleo.
2. Se podría a su vez realizar estudios similares a los realizados por Smith y Zakon (Smith y Zakon 2002), y estudiar las corrientes iónicas involucradas en la generación y mantenimiento del ritmo de actividad espontánea de NEB, despejando el panorama de los resultados obtenidos en este trabajo y pistas invaluable de la evolución de los mecanismos celulares del comportamiento eléctrico.
3. Por último, tomando en cuenta que la modulación de las DOEs en general y la FB-DOE en particular es dependiente de la fase reproductiva en la que se encuentra el animal, sería interesante indagar si este patrón de aumento en la variabilidad se mantiene igual tanto en la fase reproductiva como la no-reproductiva, momento en el cual la interacción social disminuye, y donde tal vez la flexibilidad en la emisión eléctrica no es tan importante.

8. REFERENCIAS:

Adkins-Regan, Elizabeth. *Hormones and Animal Social Behavior*. Princeton: Princeton University Press, 2013. <https://doi.org/10.1515/9781400850778>

Ardanaz, José L., Ana C. Silva, and Omar Macadar. 2001. "Temperature Sensitivity of the Electric Organ Discharge Waveform in *Gymnotus Carapo*." *Journal of Comparative Physiology - A Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 187 (11): 853–64. <https://doi.org/10.1007/s00359-001-0256-8>.

Bayarri, M. J., M. Iigo, J. A. Muñoz-Cueto, E. Isorna, M. J. Delgado, J. A. Madrid, F. J. Sánchez-Vázquez, and A. L. Alonso-Gómez. 2004. "Binding Characteristics and Daily Rhythms of Melatonin Receptors Are Distinct in the Retina and the Brain Areas of the European Sea Bass Retina (*Dicentrarchus Labrax*)." *Brain Research* 1029 (2): 241–50. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.09.049>.

Bell-Pedersen, Deborah, Vincent M. Cassone, David J. Earnest, Susan S. Golden, Paul E. Hardin, Terry L. Thomas, and Mark J. Zoran. 2005. "Circadian Rhythms from Multiple Oscillators: Lessons from Diverse Organisms." *Nature Reviews. Genetics* 6 (7): 544–56. <https://doi.org/10.1038/NRG1633>.

Bennett, M. V. 1970. "Comparative Physiology: Electric Organs." *Annual Review of Physiology*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.32.030170.002351>.

Bennett, M. V., G. D. Pappas, M. Giménez, and Y. Nakajima. 1967. "Physiology and Ultrastructure of Electrotonic Junctions. IV. Medullary Electromotor Nuclei in Gymnotid Fish." *Journal of Neurophysiology* 30 (2): 236–300. <https://doi.org/10.1152/jn.1967.30.2.236>.

Bloch, Guy, Erik D. Herzog, Joel D. Levine, and William J. Schwartz. 2013. "Socially Synchronized Circadian Oscillators." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280 (1765). <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.0035>.

Borde, Michel, Laura Quintana, Virginia Comas, and Ana Silva. 2020. "Hormone-Mediated Modulation of the Electromotor CPG in Pulse-Type Weakly Electric Fish. Commonalities and Differences across Species." *Developmental Neurobiology* 80 (1–2): 70–80. <https://doi.org/10.1002/dneu.22732>.

Caputi, Angel A., Ana C. Silva, and Omar Macadar. 1998. "The Electric Organ Discharge of *Brachyhypopomus Pinnicaudatus*: The Effects of Environmental Variables on Waveform Generation." *Brain, Behavior and Evolution* 52 (3): 148–58. <https://doi.org/10.1159/000006559>.

Caputi, Angel Ariel, Bruce A. Carlson, and Omar Macadar. 2005. "Electric Organs and Their Control." *Electroreception*, no. Kalmijn 1974: 410–51. https://doi.org/10.1007/0-387-28275-0_14.

Caputi, Angel A., and O. Trujillo-Cenóz. 1994. "The Spiral Cord of *Gymnotus Carapo*: The Electromotoneurons and Their Projection Patterns." *Brain, Behavior and Evolution* 44 (3): 166–74. <https://doi.org/10.1159/000113588>.

Choi, Ji Yong, Na Na Kim, Young Jae Choi, Mi Seon Park, and Cheol Young Choi. 2016. "Differential Daily Rhythms of Melatonin in the Pineal Gland and Gut of Goldfish *Carassius Auratus* in Response to Light." *Biological Rhythm Research* 47 (1): 145–61. <https://doi.org/10.1080/09291016.2015.1094964>.

- Comas Ferreira, Virginia. 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. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias - PEDECIBA.
- Confente, Francesca, Ma Carmen Rendón, Laurence Besseau, Jack Falcón, and José A. Muñoz-Cueto. 2010. "Melatonin Receptors in a Pleuronectiform Species, *Solea Senegalensis*: Cloning, Tissue Expression, Day-Night and Seasonal Variations." *General and Comparative Endocrinology* 167 (2): 202–14. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.03.006>.
- Coon, Steven L., Valérie Bégay, Daphne Deurloo, Jack Falcón, and David C. Klein. 1999. "Two Arylalkylamine N-Acetyltransferase Genes Mediate Melatonin Synthesis in Fish." *Journal of Biological Chemistry* 274 (13): 9076–82. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.13.9076>.
- Crampton, William G.R. 2019. "Electroreception, Electrogenesis and Electric Signal Evolution." *Journal of Fish Biology* 95 (1): 92–134. <https://doi.org/10.1111/jfb.13922>.
- Curtis, Caroline C., and Philip K. Stoddard. 2003. "Mate Preference in Female Electric Fish, *Brachyhypopomus Pinnicaudatus*." *Animal Behaviour* 66 (2): 329–36. <https://doi.org/10.1006/anbe.2003.2216>.
- Ekström, Peter, and Hilmar Meissl. 1997. "The Pineal Organ of Teleost Fishes." *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7 (2): 199–284. <https://doi.org/10.1023/a:1018483627058>.
- Falcón, Jack, H. Migaud, J. A. Muñoz-Cueto, and M. Carrillo. 2010. "Current Knowledge on the Melatonin System in Teleost Fish." *General and Comparative Endocrinology* 165 (3): 469–82. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2009.04.026>.
- Falcón, Jack, Kristina M. Galarneau, Joan L. Weller, Benny Ron, Galit Chen, Steven L. Coon, and David C. Klein. 2001. "Regulation of Arylalkylamine N-Acetyltransferase-2 (AANAT2, EC 2.3.1.87) in the Fish Pineal Organ: Evidence for a Role of Proteasomal Proteolysis." *Endocrinology* 142 (5): 1804–13. <https://doi.org/10.1210/endo.142.5.8129>.
- Falcón, Jack, Laurence Besseau, Elodie Magnanou, Maria Jesus Herrero, Masanori Nagai, and Gilles Boeuf. 2011. "Melatonin, the Time Keeper: Biosynthesis and Effects in Fish." *Cybiurn* 35 (1): 3–18.
- Falcón, Jack, Laurence Besseau, Michael Fuentès, Sandrine Sauzet, Elodie Magnanou, and Gilles Boeuf. 2009. "Structural and Functional Evolution of the Pineal Melatonin System in Vertebrates." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1163 (ii): 101–11. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04435.x>.
- Falcón, Jack, Laurence Besseau, Sandrine Sauzet, Michael Fuentès, and Gilles Boeuf. 2007. "Mélatonine et Régulations Neuroendocrines Chez Le Poisson." *Journal de La Societe de Biologie* 201 (1): 21–29. <https://doi.org/10.1051/jbio:2007003>.
- Falcón, Jack. 1999. "Cellular Circadian Clocks in the Pineal." *Progress in Neurobiology* 58 (98): 121–62.
- Farsi, Hicham, Mohamed R. Achaâban, Mohammed Piro, Béatrice Bothorel, Mohammed Ouassat, Etienne Challet, Paul Pévet, and Khalid El Allali. 2020. "Entrainment of Circadian Rhythms of Locomotor

- Activity by Ambient Temperature Cycles in the Dromedary Camel.” *Scientific Reports* 10 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76535-y>.
- Feng, Ni Y., and Andrew H. Bass. 2016. “Singing’ Fish Rely on Circadian Rhythm and Melatonin for the Timing of Nocturnal Courtship Vocalization.” *Current Biology* 26 (19): 2681–89. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.07.079>.
- Feng, Ni Y., Margaret A. Marchaterre, and Andrew H. Bass. 2019. “Melatonin Receptor Expression in Vocal, Auditory, and Neuroendocrine Centers of a Highly Vocal Fish, the Plainfin Midshipman (*Porichthys Notatus*).” *Journal of Comparative Neurology* 527 (8): 1362–77. <https://doi.org/10.1002/cne.24629>.
- Feulner, Philine G.D., Martin Plath, Jacob Engelmann, Frank Kirschbaum, and Ralph Tiedemann. 2009. “Electrifying Love: Electric Fish Use Species-Specific Discharge for Mate Recognition.” *Biology Letters* 5 (2): 225–28. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0566>.
- Gandhi, Avni V., Eric A. Mosser, Grigorios Oikonomou, and David A. Prober. 2015. “Melatonin Is Required for the Circadian Regulation of Sleep.” *Neuron* 85 (6): 1193–99. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.016>.
- Gascue, Valentina & Silva, Ana & Migliaro, Adriana. 2020. “Social modulation on daily variability in electric behavior”. *Sleep Science*. 10.5935/1984-0063.20200012.
- Gavassa, Sat, James P. Roach, and Philip K. Stoddard. 2013. “Social Regulation of Electric Signal Plasticity in Male *Brachyhyppopomus Gauderio*.” *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 199 (5): 375–84. <https://doi.org/10.1007/s00359-013-0801-2>.
- Giora, Julia. 2009. “Zootaxa, *Brachyhyppopomus Gauderio*, New Species, a New Example of Underestimated.” *Zootaxa* 68 (May): 60–68. <https://doi.org/10.5281/zenodo.187560>.
- Golombek, Diego A., and Ruth E. Rosenstein. 2010. “Physiology of Circadian Entrainment.” *Physiological Reviews* 90 (3): 1063–1102. <https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2009>.
- Goodson, J. L., & Bass, A. H. 2001. “Social behavior functions and related anatomical characteristics of vasotocin/vasopressin systems in vertebrates”. *Brain research. Brain research reviews*, 35(3), 246–265. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(01\)00043-1](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(01)00043-1)
- Hagedorn, Mary. 1988. “Ecology and Behavior of a Pulse-Type Electric Fish, *Hypopomus Occidentalis* (Gymnotiformes, Hypopomidae), in a Fresh-Water Stream in Panama.” *Copeia* 1988 (2): 324. <https://doi.org/10.2307/1445872>.
- Hardeland, Rüdiger, S. R. Pandi-Perumal, and Daniel P. Cardinali. 2006. “Melatonin.” *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 38 (3): 313–16. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.08.020>.
- Heiligenberg, W., T. Finger, J. Matsubara, and C. Carr. 1981. “Input to the Medullary Pacemaker Nucleus in the Weakly Electric Fish, *Eigenmannia* (Sternopygidae, Gymnotiformes).” *Brain Research* 211 (2): 418–23. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)90966-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)90966-5).

Hopkins, Carl D, Curtis Bell, Carol Cobar, Walter Heiligenberg, Behavioral Biology, and James Ford Bell. 1974. "Electric Communication in Fish." *American Scientist* 62: 426–37.

Huang, Hai, Shu Chen Lee, and Xiong Li Yang. 2005. "Modulation by Melatonin of Glutamatergic Synaptic Transmission in the Carp Retina." *Journal of Physiology* 569 (3): 857–71. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.098798>.

Idda, M. Laura, Cristiano Bertolucci, Daniela Vallone, Yoav Gothilf, Francisco Javier Sánchez-Vázquez, and Nicholas S. Foulkes. 2012. "Circadian Clocks: Lessons from Fish." *Progress in Brain Research* 199: 41–57. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59427-3.00003-4>.

Iigo, Masayuki, Kiyoshi Furukawa, Atsuhiko Hattori, Masayuki Hara, Ritsuko Ohtani-Kaneko, Takuro Suzuki, Mitsuo Tabata, and Katsumi Aida. 1995. "Effects of Pinealectomy and Constant Light Exposure on Day-Night Changes of Melatonin Binding Sites in the Goldfish Brain." *Neuroscience Letters* 197 (1): 61–64. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)11903-A](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)11903-A).

Inyushkin, A. N., G. S. Bhumbra, J. A. Gonzalez, and R. E.J. Dyball. 2007. "Melatonin Modulates Spike Coding in the Rat Suprachiasmatic Nucleus." *Journal of Neuroendocrinology* 19 (9): 671–81. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2007.01574.x>.

Isorna, Esther, Nuria de Pedro, Ana I. Valenciano, Ángel L. Alonso-Gómez, and María J. Delgado. 2017. "Interplay between the Endocrine and Circadian Systems in Fishes." *Journal of Endocrinology* 232 (3): R141–59. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0330>.

Jiang, Zhi Gen, Cole Stanley Nelson, and Charles Norman Allen. 1995. "Melatonin Activates an Outward Current and Inhibits Ih in Rat Suprachiasmatic Nucleus Neurons." *Brain Research* 687 (1–2): 125–32. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00478-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00478-9).

Johnson, Carl Hirschie, and Susan S. Golden. 1999. "Circadian Programs in Cyanobacteria: Adaptiveness and Mechanism." *Annual Review of Microbiology*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.389>.

Jun, James J., André Longtin, and Leonard Maler. 2014. "Enhanced Sensory Sampling Precedes Self-Initiated Locomotion in an Electric Fish." *Journal of Experimental Biology* 217 (20): 3615–28. <https://doi.org/10.1242/jeb.105502>.

Jun, James J., André Longtin, and Leonard Maler. 2016. "Active Sensing Associated with Spatial Learning Reveals Memory-Based Attention in an Electric Fish." *Journal of Neurophysiology* 115 (5): 2577–92. <https://doi.org/10.1152/jn.00979.2015>.

Juranek, Jenifer, and Walter Metzner. 1998. "Segregation of Behavior-Specific Synaptic Inputs to a Vertebrate Neuronal Oscillator." *Journal of Neuroscience* 18 (21): 9010–19. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-21-09010.1998>.

Kawasaki, Masashi, and Walter Heiligenberg. 1989. "Distinct Mechanisms of Modulation in a Neuronal Oscillator Generate Different Social Signals in the Electric Fish *Hypopomus*." *Journal of Comparative Physiology A* 165 (6): 731–41. <https://doi.org/10.1007/BF00610872>.

- Klein, David C. 2007. "Arylalkylamine N-Acetyltransferase: 'The Timezyme.'" *Journal of Biological Chemistry* 282 (7): 4233–37. <https://doi.org/10.1074/jbc.R600036200>.
- Krittika, Sudhakar, and Pankaj Yadav. 2020. "Circadian Clocks: An Overview on Its Adaptive Significance." *Biological Rhythm Research* 51 (7): 1109–32. <https://doi.org/10.1080/09291016.2019.1581480>.
- Kronfeld-Schor, Noga, Marcel E. Visser, Lucia Salis, and Jan A. van Gils. 2017. "Chronobiology of Interspecific Interactions in a Changing World." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 372 (1734). <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0248>.
- Kumar, Vinod. 2017. *Biological Timekeeping: Clocks, Rhythms and Behaviour*. Biological Timekeeping: Clocks, Rhythms and Behaviour. Springer (India) Private Ltd. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-3688-7>.
- Sharma, Vijay K. 2003. "Adaptive Significance of Circadian Clocks." *Chronobiology International* 20 (6): 901–19. www.dekker.com.
- Malabarba, Luiz Roberto, and Maria Claudia Malabarba. 2019. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fish. Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815872-2.00001-4>.
- Mason, Robert, and Andrew Brooks. 1988. "The Electrophysiological Effects of Melatonin and a Putative Melatonin Antagonist (N-Acetyltryptamine) on Rat Suprachiasmatic Neurones in Vitro." *Neuroscience Letters* 95 (1–3): 296–301. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(88\)90674-X](https://doi.org/10.1016/0304-3940(88)90674-X).
- McArthur, Angela J., Martha U. Gillette, and Rebecca A. Prosser. 1991. "Melatonin Directly Resets the Rat Suprachiasmatic Circadian Clock in Vitro." *Brain Research* 565 (1): 158–61. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91748-P](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91748-P).
- McClung, C Robertson. 2001. "Circadian Rhythms in Plants." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52 (1): 139–62. <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.arplant.52.1.139>.
- Menaker, M., L. F. Moreira, and G. Tosini. 1997. "Evolution of Circadian Organization in Vertebrates." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30 (3): 305–13. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X1997000300003>.
- Migliaro González, Adriana. 2018a. "Modulación ambiental y hormonal del ritmo circadiano de la conducta eléctrica." Tesis de doctorado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias - PEDECIBA.
- Migliaro, Adriana, and Ana C. Silva. 2016. "Melatonin Regulates Daily Variations in Electric Behavior Arousal in Two Species of Weakly Electric Fish with Different Social Structures." *Brain, Behavior and Evolution* 87 (4): 232–41. <https://doi.org/10.1159/000445494>.
- Migliaro, Adriana, Victoria Moreno, Paul Marchal, and Ana C. Silva. 2018b. "Daily Changes in the Electric Behavior of Weakly Electric Fish Naturally Persist in Constant Darkness and Are Socially Synchronized." *Biology Open* 7 (12). <https://doi.org/10.1242/bio.036319>.

- Mills, J. N. 1966. "Human Circadian Rhythms." *Https://Doi.Org/10.1152/Physrev.1966.46.1.128* 46 (1): 128–71. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.1966.46.1.128>.
- Miranda, Manuela, Ana C. Silva, and Philip K. Stoddard. 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 (4): 379–89. <https://doi.org/10.1007/s10641-008-9358-2>.
- Moller, Peter. 1995. "Electric fishes: history and behavior" Chapman & Hall, London.
- Moore-Ede, Martin C. 1986. "Physiology of the Circadian Timing System: Predictive versus Reactive Homeostasis." *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 250 (5 (19/5)). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1986.250.5.r737>.
- Moortgat, Katherine T., Clifford H. Keller, Theodore H. Bullock, and Terrence J. Sejnowski. 1998. "Submicrosecond Pacemaker Precision Is Behaviorally Modulated: The Gymnotiform Electromotor Pathway." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (8): 4684–89. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4684>.
- Moortgat, Katherine T., Theodore H. Bullock, and Terrence J. Sejnowski. 2000. "Precision of the Pacemaker Nucleus in a Weakly Electric Fish: Network versus Cellular Influences." *Journal of Neurophysiology* 83 (2): 971–83. <https://doi.org/10.1152/jn.2000.83.2.971>.
- Oliveira, Catarina, José Fernando López-Olmeda, María Jesus Delgado, Angel Luis Alonso-Gómez, and Francisco Javier Sánchez-Vázquez. 2008. "Melatonin Binding Sites in Senegal Sole: Day/Night Changes in Density and Location in Different Regions of the Brain." *Chronobiology International* 25 (4): 645–52. <https://doi.org/10.1080/07420520802254437>.
- Oliveira-Abreu, Klausen, Nathalia Maria Silva-dos-Santos, Andreina Noronha Coelho-de-Souza, Francisco Walber Ferreira-da-Silva, Kerly Shamyra Da Silva-Alves, Ana Carolina Cardoso-Teixeira, José Cipolla-Neto, and José Henrique Leal-Cardoso. 2019. "Melatonin Reduces Excitability in Dorsal Root Ganglia Neurons with Inflection on the Repolarization Phase of the Action Potential." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (11). <https://doi.org/10.3390/ijms20112611>.
- Pape, Hans Christian. 1996. "Queer Current and Pacemaker: The Hyperpolarization-Activated Cation Current in Neurons." *Annual Review of Physiology* 58 (70): 299–327. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.58.030196.001503>.
- Pappas, K., and K. Dunlap. 2011. *Sensory Systems, Perception, and Learning | Shocking Comments: Electrocommunication in Teleost Fish. Encyclopedia of Fish Physiology*. Vol. 1. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00079-4>.
- Paranjpe, Dhanashree A., and Sharma, Vijay K. 2005. "Evolution of Temporal Order in Living Organisms." *Journal of Circadian Rhythms* 3 (i): 1–13. <https://doi.org/10.1186/1740-3391-3-7>.
- Pérez, Jonathan H., Elisabetta Tolla, Ian C. Dunn, Simone L. Meddle, and Tyler J. Stevenson. 2019. "A Comparative Perspective on Extra-Retinal Photoreception." *Trends in Endocrinology and Metabolism* 30 (1): 39–53. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.10.005>.

Perrone, Rossana. 2012. "La vasotocina modula el comportamiento social de dos especies de peces eléctricos con diferente socialidad" Tesis de doctorado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias - PEDECIBA.

Perrone, Rossana, Gervasio Batista, Daniel Lorenzo, Omar Macadar, and Ana C. Silva. 2010. "Vasotocin Actions on Electric Behavior: Interspecific, Seasonal, and Social Context-Dependent Differences." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 4 (AUG): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00052>.

Perrone, Rossana, Omar MacAdar, and Ana C. Silva. 2009. "Social Electric Signals in Freely Moving Dyads of *Brachyhyppopomus Pinnicaudatus*." *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 195 (5): 501–14. <https://doi.org/10.1007/s00359-009-0427-6>.

Pévet, Paul. 2003. "Melatonin in Animal Models." *Dialogues in Clinical Neuroscience* 5 (4): 343–52. <https://doi.org/10.31887/dcns.2003.5.4/ppevet>.

Pinillos, M. L., N. De Pedro, A. L. Alonso-Gómez, M. Alonso-Bedate, and M. J. Delgado. 2001. "Food Intake Inhibition by Melatonin in Goldfish (*Carassius Auratus*)." *Physiology and Behavior* 72 (5): 629–34. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(00\)00399-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(00)00399-1).

Quintana Laura. 2010. "Dimorfismo Sexual y Plasticidad Estacional de un Núcleo Central que Controla la Producción de Señales Sociales". Tesis de doctorado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias - PEDECIBA..

Quintana, Laura, Erik Harvey-Girard, Carolina Lescano, Omar Macadar, and Daniel Lorenzo. 2014. "Sex-Specific Role of a Glutamate Receptor Subtype in a Pacemaker Nucleus Controlling Electric Behavior." *Journal of Physiology Paris* 108 (2–3): 155–66. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.04.004>.

Quintana, Laura, Paula Pouso, Gabriela Fabbiani, and Omar Macadar. 2011. "A Central Pacemaker That Underlies the Production of Seasonal and Sexually Dimorphic Social Signals: Anatomical and Electrophysiological Aspects." *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 197 (1): 75–88. <https://doi.org/10.1007/s00359-010-0588-3>.

Refinetti, Roberto. 2010. "Entrainment of Circadian Rhythm by Ambient Temperature Cycles in Mice." *Journal of Biological Rhythms* 25 (4): 247–56. <https://doi.org/10.1177/0748730410372074>.

Ribelayga, Christophe, Yu Wang, and Stuart C. Mangel. 2004. "A Circadian Clock in the Fish Retina Regulates Dopamine Release via Activation of Melatonin Receptors." *Journal of Physiology* 554 (2): 467–82. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.053710>.

Scott, F. F., M. D.C. Belle, P. Delagrange, and H. D. Piggins. 2010. "Electrophysiological Effects of Melatonin on Mouse *Per1* and Non-*Per1* Suprachiasmatic Nuclei Neurones in Vitro." *Journal of Neuroendocrinology* 22 (11): 1148–56. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2010.02063.x>.

Shibata, Shigenobu, Vincent M. Cassone, and Robert Y. Moore. 1989. "Effects of Melatonin on Neuronal Activity in the Rat Suprachiasmatic Nucleus in Vitro." *Neuroscience Letters* 97 (1–2): 140–44. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(89\)90153-5](https://doi.org/10.1016/0304-3940(89)90153-5).

- Shin, Hyun Suk, Na Na Kim, Jehee Lee, Gyung Suk Kil, and Cheol Young Choi. 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 (4): 223–38. <https://doi.org/10.1080/10236244.2011.619314>.
- Siehler, Oliver, Shuo Wang, and Guy Bloch. 2021. "Social Synchronization of Circadian Rhythms with a Focus on Honeybees." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 376 (1835). <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0342>.
- Silva, Ana C., Laura Quintana, José Ardanaz & Omar Macadar. 2002. "Environmental and hormonal effects upon EOD waveform in Gymnotiformes". *Journal of physiology*, Paris. 96. 473-84. 10.1016/S0928-4257(03)00003-2.
- Silva, Ana. C., Laura Quintana, Matias Galeano, Pablo Errandonea. 2003. Biogeography and breeding in Gymnotiformes from Uruguay. *Environmental Biology of Fishes*, 66(4), 329–338. <https://doi.org/10.1023/A:1023986600069>
- Silva, Ana C., Laura Quintana, Matías Galeano, Pablo Errandonea, and Omár Macadar. 1999. "Water Temperature Sensitivity of EOD Waveform in *Brachyhypopomus Pinnicaudatus*." *Journal of Comparative Physiology - A Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 185 (2): 187–97. <https://doi.org/10.1007/s003590050377>.
- Silva, Ana C., Rossana Perrone, and Omar Macadar. 2007. "Environmental, Seasonal, and Social Modulations of Basal Activity in a Weakly Electric Fish." *Physiology and Behavior* 90 (2–3): 525–36. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.11.003>.
- Smith, G. Troy, and Harold H. Zakon. 2000. "Pharmacological Characterization of Ionic Currents That Regulate the Pacemaker Rhythm in a Weakly Electric Fish." *Journal of Neurobiology* 42 (2): 270–86. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4695\(20000205\)42:2<270::AID-NEU10>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(20000205)42:2<270::AID-NEU10>3.0.CO;2-V).
- Stehle, J., J. Vanecek, and L. Vollrath. 1989. "Effects of Melatonin on Spontaneous Electrical Activity of Neurons in Rat Suprachiasmatic Nuclei: An in Vitro Ionophoretic Study." *Journal of Neural Transmission*, no. 78: 173–77. <https://doi.org/10.1037/14200-005>.
- Stephan, Friedrich K. 2002. "The 'Other' Circadian System: Food as a Zeitgeber." *Journal of Biological Rhythms* 17 (4): 284–92. <https://doi.org/10.1177/074873002129002591>.
- Stoddard, Philip K., Harold H. Zakon, Michael R. Markham, and Lynne McAnelly. 2006. "Regulation and Modulation of Electric Waveforms in Gymnotiform Electric Fish." *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 192 (6): 613–24. <https://doi.org/10.1007/s00359-006-0101-1>.
- Stoddard, Philip K., Michael R. Markham, Vielka L. Salazar, and Susan Allee. 2007. "Circadian Rhythms in Electric Waveform Structure and Rate in the Electric Fish *Brachyhypopomus Pinnicaudatus*." *Physiology and Behavior* 90 (1): 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.08.013>.
- Takahashi, T., & Ogiwara, K. 2021. "Roles of melatonin in the teleost ovary: A review of the current status". *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 254, 110907. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.110907>

Vitar, Magdalena. 2019. "El Núcleo Marcapaso de *Gymnotus Omarorum*: Caracterización de La Variabilidad de Un Modelo de Oscilador Neural En Vertebrados." Trabajo de fin de grado, Universidad de la República-Facultad de Ciencias

Whitmore, David, Nicholas S. Foulkes, and Paolo Sassone-Corsi. 2000. "Light Acts Directly on Organs and Cells in Culture to Set the Vertebrate Circadian Clock." *Nature* 404: 87–91.

Ziv, Limor, Adi Tovin, Daniel Strasser, and Yoav Gothilf. 2007. "Spectral Sensitivity of Melatonin Suppression in the Zebrafish Pineal Gland." *Experimental Eye Research* 84 (1): 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2006.09.004>.

Zubizarreta, Lucía, Laura Quintana, Daniel Hernández, Franco Teixeira de Mello, Mariana Meerhoff, Renato Massaaki Honji, Renata Guimarães Moreira, and Ana Silva. 2020. "Seasonal and social factors associated with spacing in a wild territorial electric fish." *PloS one* 15, no. 6: e0228976.

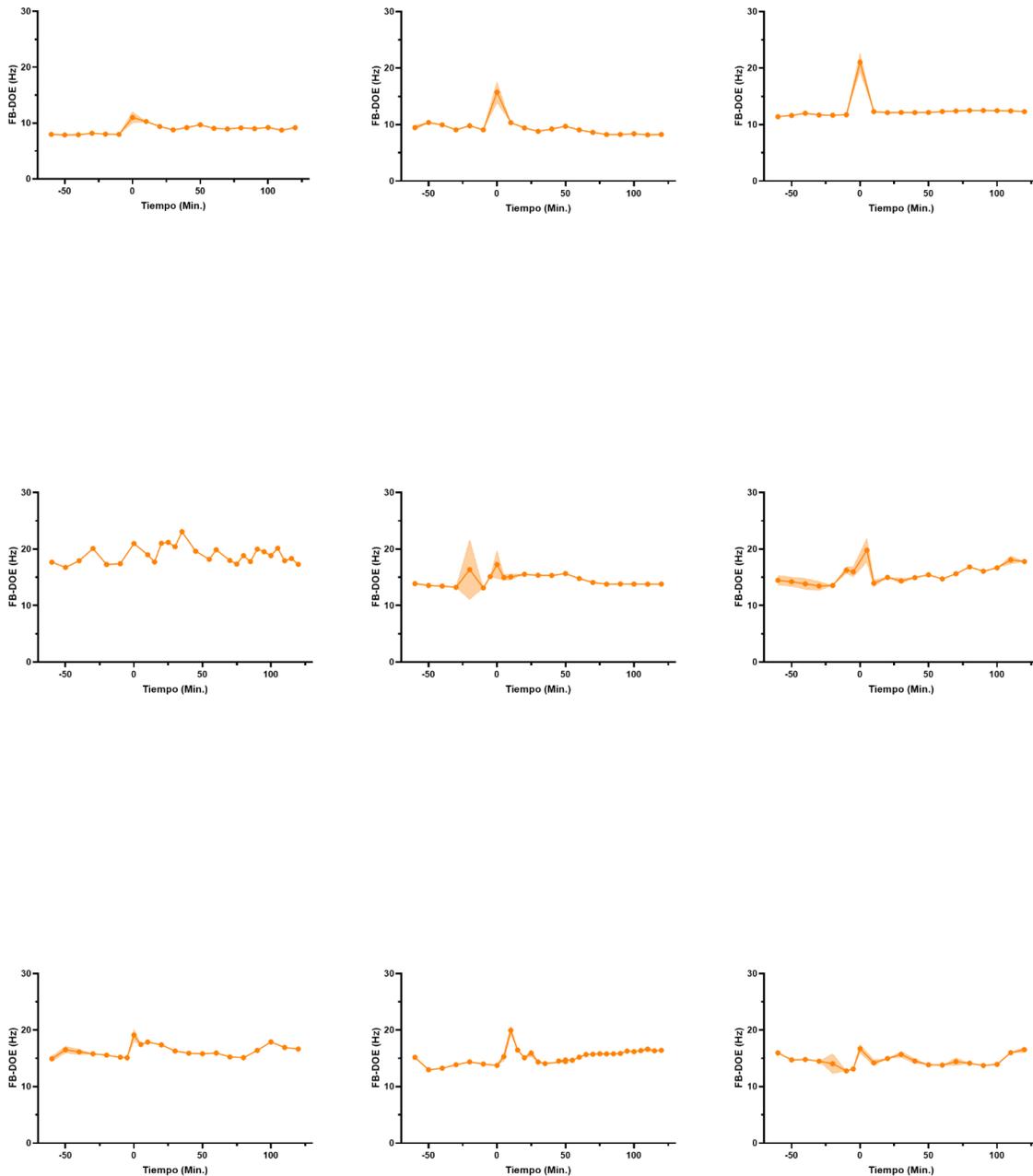
Zupanc, Günther K.H. 2002. "From Oscillators to Modulators: Behavioral and Neural Control of Modulations of the Electric Organ Discharge in the Gymnotiform Fish, *Apteronotus Leptorhynchus*." *Journal of Physiology Paris* 96 (5–6): 459–72. [https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(03\)00002-0](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(03)00002-0).

Zupanc, Günther K. H., and Theodore H. Bullock. 2006. "From Electrogenesis to Electroreception: An Overview." *Electroreception*, 5–46. https://doi.org/10.1007/0-387-28275-0_2.

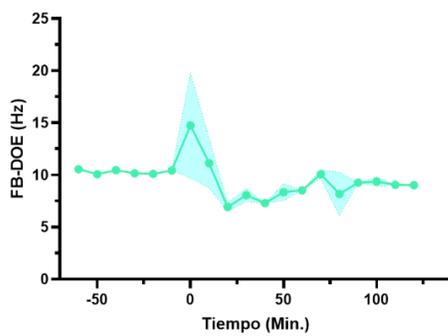
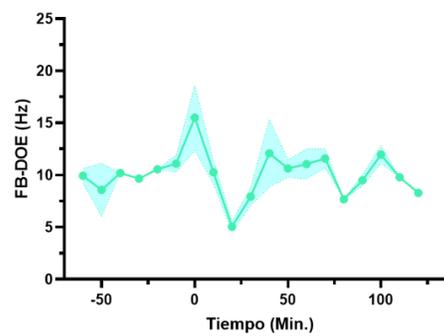
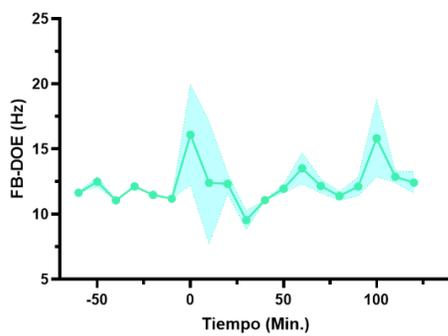
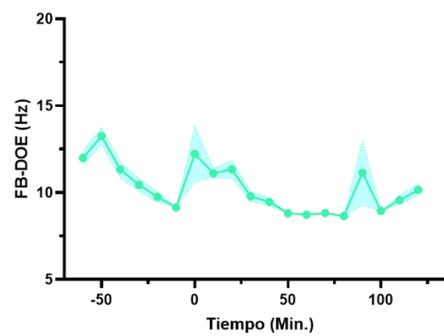
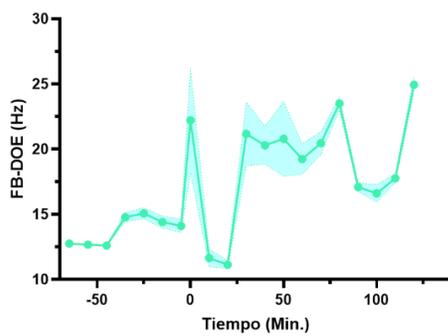
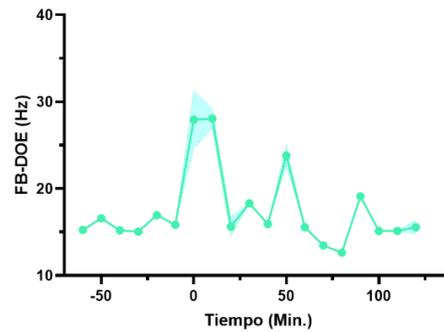
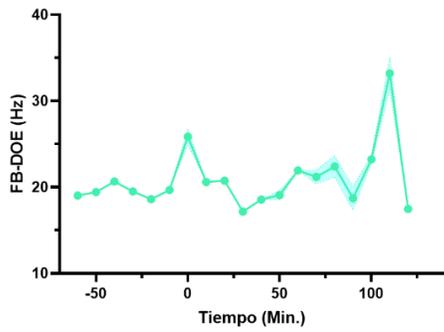
9. ANEXO:

Anexo 1: Gráficos de cambios en la FB-DOE en el tiempo de todos los individuos estudiados en los experimentos comportamentales. El 0 marca el momento de realización de una inyección IP de melatonina. . Las líneas punteadas representan momentos donde no se logró obtener datos debido a una baja relación señal/ruido. Los resultados se muestran como media + DE.

Controles



5 μ g/g



50 μ g/g

