

Tesis de Doctorado
PEDECIBA - Biología
Subárea Neurociencia

**Bases neurales del repertorio electromotor en
Gymnotus omarorum: variedad de mecanismos de
modulación de la actividad de un núcleo
marcapaso del SNC.**

MSc. Virginia Comas

Orientador: Dr. Michel Borde
Laboratorio de ejecución: Neurofisiología Celular & Sináptica
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UdelaR
Montevideo, Uruguay

Tribunal: Dra. Natalia Uriarte
Dra. Lidia Szczupak
Dr. Sebastián Curti

A mis hijos, Santiago y Mariana

Agradecimientos

Esta tesis fue parcialmente financiada por PEDECIBA, la UdelaR y el Programa de Desarrollo Tecnológico (PDT), Banco Interamericano de Desarrollo—Consejo Nacional de Innovación, Ciencia y Tecnología (BID-CONICYT), Grant N° S/C/IF/54/090.

A través de estas líneas quiero agradecer a Michel Borde, que me ha acompañado y apoyado en cada una de mis etapas de formación. Para mí una referencia sin dudas, difícil poner en palabras todo mi agradecimiento hacia él.

Al tribunal: Natalia, Lidia y Sebastián, por tomarse el tiempo de leer esta tesis y hacer sus aportes para mejorarla.

A la Comisión de Admisión y Seguimiento, Raúl Russo, José Luis Peña y Sebastián Curti, que me han seguido desde el inicio del doctorado.

A mis actuales y antiguos compañeros de LNFC&S: Michel, Héctor, Lucía, Esteban, Carolina y Magdalena, que estuvieron en distintas etapas de este proceso. Ellos hacen realmente un agradable y divertido ambiente de trabajo.

Al inigualable grupo del Laboratorio de UBNC, no solo por compartir pescas, sino más que nada por estar ahí para lo que sea: Ana, Lau, Adri, Roxi, Wally, Ceci, Pau, Lu.

A mis compañeros de Fisiología, apoyando de distintas maneras.

A mis hijos, a mis padres, hermanos y sobrinos, todos acompañando y apoyando cada paso de mi vida.

Índice

Abreviaturas.....	ix
Resumen.....	1
1. Introducción.....	5
2. Antecedentes generales.....	7
a. El sistema electromotor de los peces eléctricos como modelo para el estudio de las bases neurales del comportamiento.....	7
b. La descarga del órgano eléctrico.....	8
c. El NEB y su organización.....	9
d. Modulaciones de la DOE.....	13
e. Bases neurales de los comportamientos electromotores de corto plazo.....	16
3. Antecedentes específicos: patrón de inervación en <i>G. omarorum</i>	19
4. Hipótesis y objetivos.....	23
a. Objetivo específico1: Confirmación in vitro de la distribución y naturaleza de los receptores glutamatérgicos en las células del NEB.....	23
b. Objetivo específico 2: Análisis de los receptores postsinápticos para neurotransmisores rápidos en neuronas del NEB implicados en la emisión de señales que implican modificación de la forma de onda de la DOE (“chirps” e interrupciones) en ejemplares con desafío comportamental.....	24
c. Objetivo específico 3: Estudio de la conectividad intrínseca del NEB.....	24
5. Aspectos metodológicos generales. Captura y mantenimiento de los animales.....	27
6. Capítulo 1: Confirmación in vitro de la distribución y naturaleza de los receptores funcionales glutamatérgicos en las células del NEB.....	29
a. Resumen.....	29
b. Artículo: Glutamatergic control of a pattern-generating central nucleus in a gymnotiform fish.....	31
7. Capítulo 2: Bases neurales de la emisión de señales que implican la modificación de la forma de onda de la DOE (“chirps” e interrupciones).....	49
a. Resumen.....	49
b. Artículo: Distinctive mechanisms underlie the emission of social electric signals of submission in <i>Gymnotus omarorum</i>	51
8. Capítulo 3: Estudio de la conectividad intrínseca del NEB.....	65
a. Metodología específica.....	66
i. Obtención de las rodajas.....	66
ii. Registro y estimulación.....	67
iii. Drogas y soluciones.....	69
iv. Acoplamiento para colorante.....	70
v. Análisis estadístico.....	70
b. Resultados.....	70
i. Modificación del intervalo de la descarga del NEB inducida por polarización de célula única.....	70
ii. Bloqueo del aporte de neuronas únicas a la descarga espontánea rítmica de neuronas del NEB.....	72
iii. Evidencia directa de acople electrotonico entre neuronas del NEB. Registro de pares de neuronas.....	73
iv. Acoplamiento de señales transitorias.....	77
v. Acoplamiento para colorante.....	81
vi. Efecto del bloqueo de las uniones gap sobre el desempeño del NEB.....	82
c. Discusión.....	83

9.	Discusión general y perspectivas.....	91
10.	Bibliografía.....	96
11.	Anexo: Revisión	109
	Hormone-mediated modulation of the electromotor CPG in pulse-type weakly electric fish.	
	Commonalities and differences across species.....	111

Abreviaturas

4-AP: 4-aminopiridina

ALLn: nervio de la línea lateral anterior

AP5: ácido (\pm)2-amino-5-fosfonopentanoico

CC: coeficiente de acoplamiento

CGP: centros generadores de patrones

CGP-EM: centro generador de patrones electromotor

CM: célula de Mauthner

cMP: células marcapaso

cR: células relé

CV: coeficiente de variación

DOE: descarga del órgano eléctrico

EE: error estándar

EMns: electromotoneuronas

ePreMP: estructuras premarcapaso

FFT: transformada rápida de Fourier

GABA: ácido gamma-aminobutírico

I_{ZAP}: corriente sinusoidal de amplitud constante y frecuencia variable

JAR: respuesta de evitación de interferencia

M-ARDOE: aumento rápido de la frecuencia de la DOE provocado por la célula de Mauthner

ME: médula espinal

MFA: ácido meclofenámico

mGluR: receptores glutamatérgicos metabotrópicos

MS222: metanosulfonato de tricaína

n.s.; no significativo

NEB: núcleo electromotor bulbar

OE: órgano eléctrico

PA: potencial de acción

PA_{esp}: PA espontáneo

PA_{sig}: PA espontáneo subsiguiente

PBS: buffer fosfato salino

PFA: paraformaldehído

PPnC: subnúcleo diencefálico glutamérgico (chirp)
PPnG: subnúcleo diencefálico glutamérgico (aceleraciones)
PPnI: subnúcleo diencefálico GABAérgico
rAMPA: receptores glutamatergicos ionotrópicos de tipo AMPA
R_{in}: resistencia de entrada
R_j: resistencia de la unión de tipo gap
rNMDA: receptores glutamatergicos ionotrópicos de tipo NMDA
R_{transf}: resistencia de transferencia
SN: sistema nervioso
SNC: sistema nervioso central
SPPn: núcleo sublemniscal
TTX: tetrodotoxina
V_m: potencial de membrana
V_{post}: potencial de membrana postsináptico
V_{pre}: potencial de membrana presináptico

Resumen

El estudio de las estrategias neurales para la organización del comportamiento en vertebrados constituye un desafío mayor para la Neurociencia. En este campo, el conocimiento se ha visto limitado por la escasez de modelos experimentales adecuados para llevar a cabo estudios a varios niveles de análisis utilizando abordajes multitécnicos. El sistema electromotor de los Gymnotiformes, peces eléctricos sudamericanos de descarga débil, surge como un excelente modelo experimental para avanzar en el esclarecimiento de dichos mecanismos. Estas especies, a través del control de un efector periférico derivado del músculo esquelético (órgano eléctrico), emiten descargas rítmicas y estereotipadas, generando campos eléctricos en su entorno cercano. La descarga de su órgano eléctrico (DOE) es utilizada tanto para la comunicación intraespecífica (electrocomunicación) como para conocer características físicas del entorno (electrorrecepción o electrolocalización activas). El comando rítmico para la DOE se origina en el núcleo electromotor bulbar (NEB), que está compuesto por células marcapaso (cMP), autorrítmicas e intrínsecas al núcleo, y neuronas de relevo (cR), de proyección bulboespinal. Estas especies son capaces de generar múltiples modulaciones de la DOE, denominados comportamientos electromotores, con valor adaptativo (comunicación, exploración sensorial) a través de modificaciones específicas de la actividad del NEB por parte de estructuras premarcapaso (ePreMP).

De manera característica, el patrón de inervación del NEB, i.e.: el blanco celular (MP o R) de los axones de neuronas de las ePreMP y el tipo y localización de los receptores postsinápticos para neurotransmisores rápidos expresados en cada tipo celular, ha sido concebido como determinante mayor del repertorio de modulaciones de la DOE de cada especie. Este trabajo busca avanzar en el conocimiento de la estrategia neural general utilizada, incorporando dos elementos que adquieren particular jerarquía en *Gymnotus omarorum*: la modulación de las propiedades intrínsecas de los elementos neuronales que componen el NEB y la conectividad intrínseca del núcleo. Los objetivos específicos: i.- determinar el patrón de inervación del NEB, ii.-indagar acerca de la modulación de las propiedades intrínsecas de neuronas del NEB como base de la emisión de señales de electrocomunicación y iii.- determinar y caracterizar el acoplamiento electrotónico entre las neuronas que componen el NEB como forma de avanzar en el conocimiento de su conectividad intrínseca se abordaron utilizando técnicas electrofisiológicas, morfológicas y farmacológicas en preparaciones *in vivo* e *in vitro*.

Esta tesis está organizada en tres capítulos de acuerdo a los objetivos planteados. El **primer capítulo** refiere a los resultados obtenidos en el análisis *in vitro* de los mecanismos responsables del control de la actividad del NEB por neurotransmisores rápidos. Se demostró que las cMP, pero no las cR expresan receptores glutamatérgicos ionotrópicos (tanto NMDA como AMPA) y metabotrópicos en su membrana. El control glutamatérgico involucra dos tipos de sinapsis sobre las cMP, un tipo contiene receptores de tipo AMPA y de tipo NMDA, en tanto que el otro solo contiene receptores de tipo NMDA. El control del NEB por parte de neurotransmisores rápidos parece capitalizar las diferencias en la cinética de los receptores postsinápticos involucrados (AMPA vs NMDA) para generar diferentes tipos de modulaciones. Estos resultados fueron publicados en el artículo:

Glutamatergic control of a pattern-generating central nucleus in a gymnotiform fish. Virginia Comas y Michel Borde. *Journal of Neurophysiology* (2021) 125(6) 2339-2355

En el **segundo capítulo** se incluyen resultados del estudio *in vivo* de los mecanismos a nivel del NEB que subyacen a la generación de señales eléctricas de sumisión emitidas durante encuentros agonísticos: “chirps” (descargas breves de alta frecuencia y baja amplitud con distorsión de la forma de onda de la DOE) y apagados (interrupciones de la DOE). Se obtuvieron evidencias de que las interrupciones de la DOE parecen obedecer a la activación de receptores GABAérgicos de las cMP. Asimismo, los “chirps” no resultan de la activación de receptores glutamatérgicos en las cR, a diferencia de lo descrito para especies filogenéticamente próximas. La emisión de “chirps” en esta especie implicaría un mecanismo no glutamatérgico basado en un aumento de la excitabilidad de las cR y la descarga en brotes de PAs de alta frecuencia en respuesta a la despolarización generada en las cMP y propagada pasivamente a las cR. Estos cambios serían el resultado de la modulación de conductancias de K⁺ de bajo umbral, producto de la acción de neuromoduladores liberados localmente durante los encuentros agonísticos. Los resultados dieron origen a la publicación:

Distinctive mechanisms underlie the emission of social electric signals of submission in *Gymnotus omarorum*. Virginia Comas, Kim Langevin, Ana Silva y Michel Borde. *Journal of Experimental Biology* (2019) 222(11),

y de forma complementaria:

Hormone-mediated modulation of the electromotor CPG in pulse-type weakly electric fish. Commonalities and differences across species. Michel Borde, Laura Quintana, Virginia Comas y Ana Silva. *Developmental Neurobiology* (2020) 80(1-2) 70-80

El tercer capítulo contiene resultados obtenidos durante el estudio *in vitro* de la conectividad intrínseca del NEB mediante técnicas electrofisiológicas, farmacológicas y morfológicas (acople para colorante). Esta línea de trabajo se encuentra aun en desarrollo por lo que se incluyen resultados con diferentes niveles de consolidación de acuerdo con el grado diverso de avance operado en cada uno de los abordajes. El análisis electrofisiológico incluyó el registro de pares de neuronas como técnica de elección para el estudio del acople electrotónico. Este abordaje fue particularmente exitoso para el caso del contacto entre cR. El registro de pares de neuronas permitió evaluar directamente la bidireccionalidad y estimar el grado de acople a través del cálculo del coeficiente de acoplamiento en el estado estacionario y de la resistencia de transferencia. Dificultades técnicas derivadas del tamaño y la mala visualización del soma de las cMP impidieron aplicar esta técnica para el estudio del contacto cMP-cMP y cMP-cR. En estos casos, se ensayaron protocolos específicos que aportaron evidencias indirectas de acople electrotónico entre estos elementos neuronales: cambios de frecuencia de la descarga espontánea del NEB por polarización de célula única (cMP o cR) y el bloqueo del aporte de células individuales a la descarga espontánea sincrónica de grupos neuronales del NEB. En conjunto, los resultados obtenidos muestran acople electrotónico de escasa magnitud entre los distintos elementos celulares del NEB (cMP-cMP, cMP-cR y cR-cR) a través de contactos no rectificadores que operan como filtro pasa-bajos. La sensibilidad, aunque con bajos niveles de especificidad, a bloqueantes de las uniones gap y la presencia de acople para colorante entre cMP y cR y entre pares de cR apunta a las uniones gap como sustrato molecular del acople electrotónico observado.

Las características de la conectividad intrínseca del NEB reveladas en nuestro estudio sustentan varias propiedades funcionales de este núcleo: i.- como generador del comando rítmico para la DOE y ii.- como integrador de influencias descendentes, responsable de la producción de modulaciones de la DOE utilizadas en la exploración sensorial del entorno o como señales de comunicación. En efecto, el contacto entre cMP contribuye a la sincronización de un conjunto de marcapasos celulares, generando un comando rítmico robusto con escasa variabilidad intrínseca pero pasible de ser modulado por ePreMP para adaptar el desempeño del NEB a distintos contextos comportamentales. Por su parte, el acople electrotónico entre cR implicaría una contribución adicional al sincronismo del comando descendente hacia la médula espinal requerido para la elaboración de la forma de onda de la DOE. La existencia de acople electrotónico cMP-cR aportaría un alto factor de seguridad para la transmisión del comando rítmico desde las cMP hacia las cR. El arreglo temporal resultante (alrededor de 1 ms) entre la descarga sincrónica de ambas poblaciones contribuiría a impedir la transmisión retrógrada del PA sincrónico de las cR. Las características del axón de las cMP estarían en la base de este arreglo temporal a la vez que favorecerían la segregación efectiva de entradas sinápticas a las cMP y cR incrementando la distancia electrotónica entre entre ambos tipos celulares.

En conjunto los resultados presentados en esta tesis aportan significativamente al conocimiento de la organización anátomo-funcional de un núcleo marcapaso del SNC de vertebrados (el NEB), su posible incidencia en la organización del sistema electrogenerador y revelan a la conectividad intrínseca del núcleo y a la modulación de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas del NEB como elementos que contribuyen centralmente a la estrategia neural para la organización de comportamientos electromotores en Gymnotiformes. La tesis amplía la perspectiva original basada exclusivamente en el patrón de inervación del núcleo por parte de ePreMP como determinante del repertorio de modulaciones de la DOE. Los resultados, asimismo, arrojan luz sobre los mecanismos de control de la actividad de los centros generadores de patrón como los implicados en la locomoción y en la elaboración de otras eferencias rítmicas.

1. Introducción

El avance en el conocimiento de las estrategias neurales que organizan el comportamiento es un desafío para la Neurociencia que depende críticamente del uso de modelos experimentales que provean al investigador de múltiples niveles de análisis (i.e. comportamental, circuital, sináptico, celular y molecular), así como también técnicas variadas, corrientemente utilizadas en diversas disciplinas. La capacidad del sistema nervioso de desempeñar tareas complejas tales como la percepción sensorial o el control motor surge de la interconexión de neuronas en redes o circuitos. El desempeño de estas redes depende de las características de las neuronas que las componen y de las conexiones que estas establecen entre sí (Getting 1989). El acceso a las bases neurales del comportamiento se facilita en aquellos modelos en los que existe una relación directa entre el mecanismo neural estudiado y los comportamientos que resultan de dicho mecanismo.

Los invertebrados han constituido modelos experimentales que han aportado significativamente al conocimiento de las bases neurales del comportamiento (Kandel, 1976) en tanto presentan comportamientos relativamente simples, bien definidos, organizados por sistemas neurales paucicelulares y suficientemente robustos para ser reproducidos en condiciones experimentales que admiten la utilización de enfoques reduccionistas. Del análisis realizado en invertebrados, y luego extendido a una variedad de especies de vertebrados, han surgido conceptos generales relevantes que han sido postulados como principios organizativos generales del sistema nervioso (Getting, 1989). Es así que en el nivel más simple se reconocen arreglos circuitales básicos, como la excitación mutua o recurrente (Renshaw, 1941; Eccles y col., 1954; Relá y Szczupak, 2003), la inhibición recíproca (Friesen, 1984, Selverston, 2010; Faber y Pereda, 2011, Lamb y Calabrese, 2011) y la inhibición lateral (von Békésy, 1967; Urban, 2002; Sachdev y col., 2012), descritos en una multiplicidad de sistemas neurales. En un nivel intermedio de organización, que suele combinar este tipo de arreglos circuitales básicos, emergen diseños neurales más complejos como el de neurona o sistema comando (Bullock, 1979; revisado en Eaton y col., 2001) y el de centros generadores de configuraciones témporo-espaciales (Centros Generadores de Patrón, CGPs, Grillner y Wallen, 1985; Dickinson, 2006; Falgairolle y col., 2006). El primero asume que la activación de una neurona (o circuito) es condición necesaria y suficiente para la generación de un comportamiento y se ha constituido en un marco conceptual de enorme valía en el desarrollo de la neuroetología (Eaton y DiDoménico, 1985; DiDoménico e Eaton, 1988; Borde y col., 2004). Las redes neurales de propósito único (o redes dedicadas) constituyen una propuesta de diseño neural que conceptualmente no difiere del diseño de neurona comando. De acuerdo a este arreglo circuital, comportamientos bien definidos serían el resultado de la activación de redes neurales con una arquitectura específica: i.e., un grupo de neuronas con propiedades operativas únicas y conectadas entre sí con un patrón específico e inmutable de conexiones. Más recientemente se han aportado evidencias que indican que la variedad de comportamientos desplegados por una especie no obedece a la activación de un número equivalente de redes de propósito único (Briggman y Kristan, 2006). Por el contrario, estudios tanto de sistemas sencillos (Zucker y col. 1971; Marder, 1988; Getting, 1989) como de sistemas algo más complejos en vertebrados (Calabrese, 1998; Faumont y col., 2005; Lieske y Ramirez, 2006) señalan que una red neural precisa, de arquitectura definida, es capaz de organizar comportamientos sensiblemente diferentes. El concepto de la reconfiguración de redes neurales (Getting, 1989; Hooper, 2004) ha concitado

particularmente la atención de la comunidad científica en los últimos años y cuentan con considerable sustento experimental (ver para revisión Harris-Warrick y Marder, 1991). Este tipo de diseño neural implica la existencia de circuitos que, aunque relativamente rígidos en su arquitectura (neuronas constituyentes y conectividad), deben ser funcionalmente versátiles siendo capaces de mostrar diversos modos de operación en respuesta a influencias moduladoras específicas. Este tipo de diseño ha sido bien estudiado en invertebrados y cada vez más ejemplos se describen en vertebrados aun con las limitaciones derivadas de la complejidad de los sistemas analizados y las limitaciones de las técnicas disponibles (Friesen y Kristan, 2007). Cualquiera sea el modo de la reconfiguración, es esperable que el cambio de una configuración funcional a otra implique tanto la modulación de las propiedades intrínsecas neuronales como de los contactos sinápticos que estas neuronas establecen en el marco de la red neural (Getting, 1989; Harris-Warrick y Marder, 1991).

Los comportamientos motores rítmicos presentan características únicas para el estudio de sus mecanismos neurales. Por su naturaleza, los comportamientos rítmicos se repiten en el tiempo, facilitando la tarea de reconocer las neuronas cuya actividad está relacionada con el patrón motor. Los CGPs son circuitos neurales que producen patrones de actividad neural que subyacen los comportamientos motores rítmicos y estereotipados: aquellos en los cuales una parte o todo el cuerpo del animal se mueve de forma repetitiva y cíclica (p.ej. el caminar, el nado y la masticación, Delcomyn 1980). El comportamiento motor rítmico es, por tanto, una lectura directa del patrón de actividad neural, haciendo posible sacar conclusiones de las bases neurales del comportamiento (Briggman y Kristan 2008; Grillner y El Manira 2015; Marder y col., 2015). La naturaleza cíclica de los patrones motores proporciona un medio robusto para determinar cuáles neuronas producen la ritmicidad y cuales el patrón debido a que las neuronas del CGP están rítmicamente activas y conectadas sinápticamente a otros componentes del CGP.

2. Antecedentes generales

a. El sistema electromotor de los peces eléctricos como modelo para el estudio de las bases neurales del comportamiento

Los peces constituyen un grupo taxonómico antiguo y diverso entre los vertebrados, y esto se ve reflejado en cierta medida en la organización del sistema nervioso (SN). Entre las diversas soluciones que se encuentran en el SN de estos animales se encuentra el desarrollo de la electrorrecepción (Caputi y col. 2005; Alves-Gomes, 2019). Todos los animales acuáticos generan campos eléctricos en su entorno como consecuencia de la distribución desigual de iones entre el animal y el entorno físico, así como también por la actividad muscular (Kalmijn 1974). Esta información es utilizada por animales con electrorreceptores cutáneos, capaces de detectar dicho campo eléctrico, e integran el sistema de electrorrecepción pasiva (Kalmijn, 1988). Se estima que alrededor del 30% de las especies de peces son electrorreceptivos, divididos en especies de electrorrecepción pasiva y activa. Una pequeña proporción de peces teleósteos, los peces eléctricos, han desarrollado la electrorrecepción activa (o electrolocalización). Es así que a través de un sistema electromotor generan un campo eléctrico que es detectado por un mosaico de electrorreceptores sobre la piel del animal (Lissman y Machin, 1958; Bastian, 1981, 1986; Heiligenberg y Bastian, 1984; Carr y Maler, 1986; von der Emde, 1999; Caputi y col., 2008; Lewis, 2014). El perfil espacial y temporal de las corrientes transcutáneas que provocan las líneas de campo son moduladas por la presencia de objetos de conductividad diferente a la del agua que lo rodea (Fig. 1; Lissman, 1951), formando en la piel del animal una “imagen eléctrica” derivada de un universo tridimensional de impedancias que se actualiza periódicamente cada vez que el animal emite una descarga (Caputi, 1999). Esta información es transducida por los electrorreceptores (imagen neural) y procesada por los distintos elementos neuronales del sistema electrosensorial.

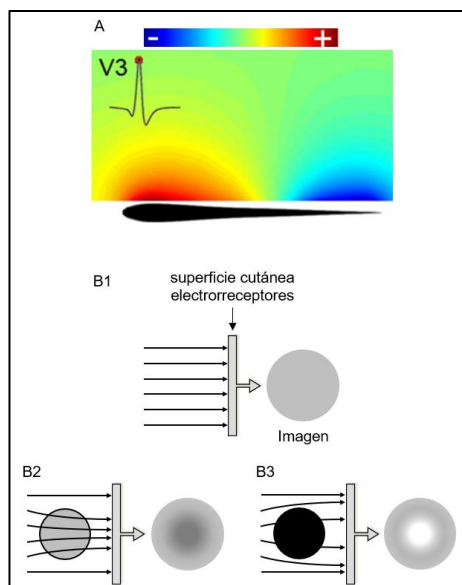


Figura 1: Esquema conceptual básico de la electrorrecepción. A. Mapa de colores de la amplitud del potencial de campo en el pico de la DOE (V3 marcada con un punto rojo) de *Gymnotus omarorum* en un medio isotrópico. En el inserto se ilustra la DOE adquirida a través de un registro bitópico cabeza-cola (cabeza positivo). Los colores cálidos indican valores de voltaje positivos y los fríos valores negativos. B. Representación esquemática de la incidencia de las líneas de corriente en la superficie cutánea y de la imagen eléctrica derivada de la activación de los electrorreceptores (derecha de cada esquema). B1. En ausencia de objetos en la proximidad del pez, B2 en presencia de un objeto conductivo (conductividad > que la del agua), y B3 en presencia de un objeto resistivo (conductividad < que la del agua). (Modificado de Borde y col., 2004 y Sanguinetti-Scheck y col., 2011).

El órgano efector del sistema electromotor es el órgano eléctrico (OE), compuesto por células de estirpe miogénica (células que conservan su actividad eléctrica pero perdieron la capacidad contráctil), aunque también existen algunas especies con OE de origen neurogénico (Bennett, 1971; Waxman y col., 1972; Caputi y col., 2005; Kirschbaum y Schwassmann, 2008; Alves-Gomes, 2019). Los OE generan descargas sincronizadas (DOE), y según la amplitud de la descarga, se reconocen peces eléctricos de descarga débil (unos pocos milivoltios) y de descarga fuerte (cientos de voltios). La DOE permite a

los individuos que la emiten, detectar cambios en el entorno cercano (electrorrecepción) y es el medio de comunicación inter- e intraespecífica (electrocomunicación) (Lissmann, 1958; Lissmann y Machin, 1958; Caputi y col., 2005; Von der Emde, 2006; Crampton, 2019). Este sistema ha evolucionado independientemente al menos dos veces, reconociéndose dos grupos de peces eléctricos: los Mormyriiformes, en el continente africano, y los Gymnotiformes, sudamericanos (Caputi y col., 2005, Alves-Gomes, 2019; Crampton, 2019). Si bien estos dos grupos comparten rasgos fundamentales en lo referido al sistema electrosensorial, esta tesis hará referencia principalmente a los Gymnotiformes con OE de origen miogénico.

b. La descarga del órgano eléctrico

La DOE es una salida comportamental (referencia electromotora) rítmica y relativamente estereotipada. Esta señal es medible utilizando técnicas electrofisiológicas no invasivas de rutina, y ha probado ser un valioso modelo de estudio en vertebrados para avanzar en el conocimiento de las bases neurales del comportamiento (Carlson, 2002; Zakon y Smith, 2002; Caputi y col., 2005; Silva y col., 2008; Perrone y col., 2014; Dunlap y col., 2017). La frecuencia y la forma de onda de la DOE determinan el desempeño del sistema electrosensorial y transmiten información acerca de la especie, del sexo, del estado fisiológico, de la madurez sexual, de la estación del año, de la hora del día e incluso del estado motivacional (Bennett, 1971; Caputi y col., 2005; Migliaro y Silva, 2016) a lo largo de toda la vida del animal.

El comando rítmico para la DOE se origina en un núcleo del sistema nervioso central (SNC), localizado en el bulbo raquídeo, denominado núcleo electromotor bulbar (NEB) a nivel del cual se producen las primeras etapas de la organización de su forma de onda. Los Gymnotiformes se pueden dividir en dos grupos principales según las marcadas diferencias en la configuración temporal de las descargas de su órgano eléctrico. Los peces de onda producen señales continuas casi sinusoidales, mientras que los peces de pulso generan pulsos eléctricos rítmicos, discretos y estereotipados separados por intervalos relativamente largos (Caputi y col., 2005).

El OE comprende centenares de electrocitos organizados en hileras longitudinales rodeadas de tejido conectivo y ocupa el sector ventral del animal desde detrás del ano (aproximadamente al 15% de su longitud desde el extremo cefálico del animal) hasta el extremo caudal (Caputi y col., 2005). Los electrocitos varían en número, forma, tamaño, densidad de inervación y propiedades de membrana según la especie. El circuito básico para la generación de la DOE incluye tres grupos de células (Fig. 2): las células relé (cR) que integran el NEB (1), origen del comando sincrónico descendente que recluta de manera ordenada, a través de una sinapsis excitadora probablemente mixta químico-eléctrica, a las electromotoneuronas (EMns) espinales (2) y cuyos axones inervan, a su vez, a los electrocitos (3) (Baillet-Derbin, 1988; Caputi y Trujillo-Cenóz, 1994), a través de un contacto sináptico colinérgico nicotínico (Zakon, 1995; Markham, 2013). La forma de onda de la DOE requiere del reclutamiento ordenado y preciso de la población de electrocitos distribuidos longitudinalmente en el animal.

La evidencia experimental indica que la descarga sincrónica de las cR en respuesta al comando de las células marcapaso (cMP) del NEB es determinante de la forma de onda de la DOE (Caputi, 1999; Caputi y col. 2005). Se reconocen al menos tres tipos de cR que se distinguen por la velocidad de conducción de su axón y por la región de la médula espinal (ME) a la que proyectan (Lorenzo y col., 1993; Caputi, 1999): i.- cR con axones de baja velocidad de conducción que proyectan a las regiones rostrales de la ME y cuya

activación se asocia a las ondas más tempranas de la DOE, ii.- cR con velocidades de conducción intermedia que contactan EMns ampliamente distribuidas a lo largo de la ME y iii.- cR de velocidad de conducción elevada que proyectan a los sectores caudales de la ME y cuya activación se asocia a las ondas más tardías de la DOE. La activación sincrónica de las cR y la distribución del comando descendente discriminado según la población de EMns invadas constituye uno de los mecanismos centrales que contribuyen al establecimiento de la forma de onda y duración de la DOE.

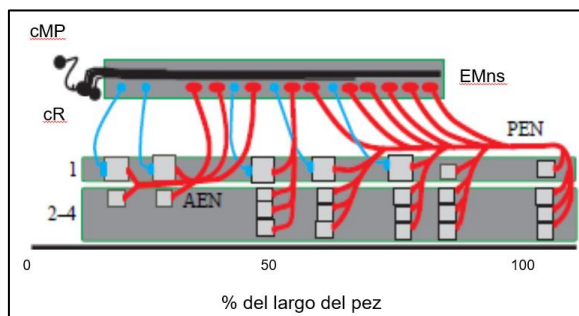


Figura 2: Representación esquemática de la estructura y la inervación del órgano eléctrico en *Gymnotus omarorum*. La red consta de tres grupos de neuronas: las células de relevo (cR) proyectan sobre las electromotoneuronas (EMns), que a su vez proyectan sobre los electrocitos. Los electrocitos están contenidos en tubos conectivos. El tubo 1 contiene electrocitos doblemente inervados en sus tres cuartos rostrales por los nervios electromotores anteriores y posteriores mientras que los otros tubos (tubos 2 a 4) contienen electrocitos exclusivamente inervados caudalmente, ya sea por el nervio electromotor anterior (AEN) o el nervio electromotor posterior (PEN). El patrón de inervación del órgano eléctrico es especie-específico. cMP: células marcapaso. (Modificado de Caputi, 1999).

c. El NEB y su organización

En la mayoría de los Gymnotiformes, el NEB está compuesto por dos tipos neuronales: las células marcapaso (cMP) y las células relé (cR). En algunas especies de peces de onda, un tercer tipo neuronal de pequeño tamaño (7–15 μm de diámetro) ha sido identificado inmunohistoquímicamente (parvalbúmina positivas) pero se desconoce aun su papel en el desempeño del NEB en esas especies (Smith y col, 2000). El número y la distribución de cMP y cR en el núcleo es ligeramente diferente en las distintas especies, sin embargo, sus propiedades funcionales son similares (Elekes y Szabó, 1981). Excepto cuando se indique específicamente, se aborda la descripción de las características del NEB de los peces de pulso en los que es posible distinguir claramente a las cMP de las cR en base a criterios electrofisiológicos y citoarquitecturales.

Las cMP son las células más pequeñas del NEB, de aproximadamente 15-30 μm de diámetro (Ellis y Szabó, 1980; Libouban y col., 1981; Curti y col., 2006; Quintana y col., 2011b), y en la mayoría de los Gymnotiformes de pulso se localizan en el sector dorsal del núcleo. Estas neuronas descargan potenciales de acción (PAs) de forma espontánea, rítmica y sincrónica. En un registro intracelular de estas células, se observa que cada ciclo de actividad se inicia en la hiperpolarización post-espiga lenta del PA y consiste en una lenta despolarización del potencial de membrana (potencial marcapaso) que alcanza el nivel de disparo y desencadena el siguiente PA (Fig. 3; Bennett y col., 1967; Curti y col., 2006). De acuerdo con estas características, las cMP podrían considerarse osciladores celulares. Son pocos los estudios que hayan abordado el análisis de las conductancias de membrana dependientes de voltaje responsables del comportamiento marcapaso de estas células en Gymnotiformes (Curti, 2007; Dye, 1991; Spiro y Heiligenberg, 1992; Smith y Zakon, 2000; Smith, 2005). Evidencias farmacológicas sugieren que la descarga

espontánea de estas células involucra conductancias de Na^+ , tanto transitoria como persistente, varias conductancias de K^+ con diferentes cinéticas de inactivación, conductancias de Ca^{2+} y una conductancia catiónica que se activa por hiperpolarización (I_h). De manera característica, la despolarización de estas células por inyección de pulsos de corriente durante el intervalo interespiga produce la descarga de un único PA al inicio de la despolarización (Bennet y col., 1967).

Las cR son de mayor diámetro (60-70 μm , Ellis y Szabó, 1980; Quintana y col., 2011a; Libouban y col., 1981, Curti y col., 2006), y ocupan el sector ventral del NEB. A diferencia de lo que ocurre a nivel de las cMP, las cR no son capaces de descargar espontáneamente en ausencia el comando originado en las cMP (ver más abajo). En efecto, en estas células, el PA no es precedido por un potencial marcapaso sino que emerge abruptamente desde el potencial de reposo y es seguido de una post-despolarización lenta (Fig. 3). Se desconocen las conductancias de membrana responsables del fenotipo electrofisiológico de estas células aun cuando se especula que, en peces de onda, conductancias de Na^+ (transitoria y persistente) así como conductancias de K^+ con diferentes cinéticas de inactivación estarían involucradas (; Smith y Zakon, 2000). La inyección de pulsos de corriente despolarizante en estas células provoca la descarga repetitiva de PAs cuya frecuencia se incrementa linealmente con la magnitud de la corriente (0.5 a 3.5 nA, Spiro, 1997). Estos PAs muestran menor amplitud que los PAs espontáneos.

Desde los trabajos de Bennett y col. (1967), se acepta que el desempeño del NEB depende de las propiedades electrofisiológicas tanto de las cMP como de las cR, así como también de la conectividad intranuclear (Dye y Heiligenberg, 1987; Spiro, 1997; Moortgat y col., 2000). Este circuito funciona de forma tal que la descarga es 1:1:1 (cMP-cR-DOE, Fig. 3), por tanto la secuencia temporal de las DOEs reproduce la secuencia temporal de la descarga de las cMP. La segregación funcional de ambos tipos celulares del NEB se apoya, entre otras, en las siguientes evidencias experimentales: i. la existencia de potencial marcapaso exclusivamente en las cMP, particularmente evidente en los peces de pulso, señala a este tipo celular como verdadero origen del ritmo, ii. la activación de las cMP precede a la activación de las cR en cada ciclo de actividad, (Kawasaki y Heiligenberg, 1989; Falconi y col., 1997; Spiro, 1997; Curti y col., 2006), iii. in vivo, la aplicación de GABA a las cMP provoca reducciones transitorias de la frecuencia (incluso interrupciones) de la DOE en tanto que no produce modificaciones cuando se aplica a las cR (agrupadas en el sector ventral del NEB), iv. en registros de campo, la aplicación yuxtacelular de microvolúmenes de tetrodotoxina (TTX, bloqueante de canales de Na^+) a las cR, bloquea la negatividad correspondiente a la generación de PAs en estas células pero no afecta la descarga rítmica de la negatividad remanente, correspondiente a la descarga sincrónica de las cMP (Spiro, 1997; Comas y Borde, resultados no publicados) y v. en registros intracelulares, la modificación del intervalo natural de la descarga de las cMP por inyección de corriente es capaz de modificar el intervalo de la DOE en forma paralela (Bennet y col., 1967). Si bien esta maniobra realizada en las cR es capaz de modificar el intervalo de la DOE, la sensibilidad de las cMP a la polarización es notablemente mayor que la de las cR (Bennet y col., 1967; Comas y col., 2012). Dado su papel en la elaboración de una eferencia rítmica, el NEB ha sido postulado como un CGP, el **CGP electromotor** (CGP-EM, Grant y col., 1993), conformado por dos niveles interconectados (McCrea & Rybak, 2008; Dougherty & Ha, 2019). Un nivel generador de ritmo, representado por las cMP, verdadero origen del comando rítmico para la DOE, y otro nivel constituido por la población de cR, que recibe este comando y participa de la elaboración del patrón (forma de onda de la

DOE) a través de su proyección descendente hacia la ME y el reclutamiento ordenado de las EMns con las que su axón hace sinapsis (Lorenzo y col., 1993; Caputi y col., 2005).

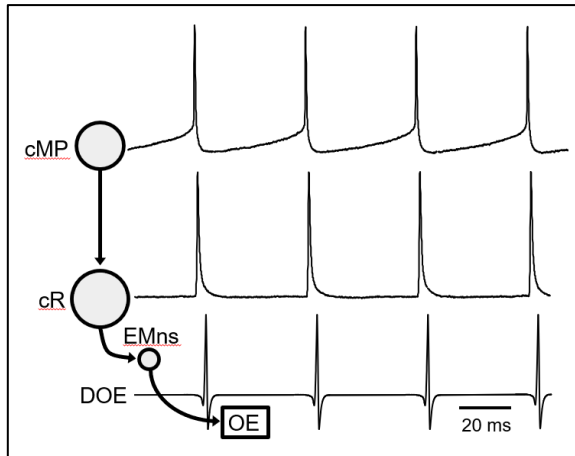


Figura 3: La descarga del NEB comanda la DOE. Esquema de los componentes responsables de la descarga del órgano eléctrico (DOE) y sus respectivas descargas. Las células marcapaso (cMP, registro intracelular) descargan PAs espontáneamente, provocando la descarga de las células de relevo (cR, registro intracelular). Éstas últimas reclutan a las electromotoneuronas (EMns), localizadas en la médula espinal, que reclutan finalmente los electrocitos, que componen el órgano eléctrico (OE), y que su activación genera la DOE (registro cabeza-cola). NEB: núcleo electromotor bulbar. (Modificado de Comas y Borde, 2021).

A excepción de la descripción comparativa de algunos aspectos de la conectividad intranuclear realizada mediante técnicas de microscopía electrónica en varias especies de gymnotiformes (Elekes y Szabó, 1981a, 1981b, 1885), la organización anátomo-funcional del NEB de las distintas especies ha sido poco explorada. Sin embargo, varios estudios destacan el papel del acople electrotónico entre los elementos celulares en el desempeño del núcleo, tanto en relación con la descarga rítmica como en la elaboración del comando descendente (Bennett y col., 1967; Dye y Heiligenberg, 1987; Moortgat y col., 2000; Curti, 2007).

La existencia de acople electrotónico entre cMP se apoya principalmente en evidencias electrofisiológicas indirectas. En efecto, esta conexión ha sido propuesta como el mecanismo responsable de la modificación transitoria del intervalo natural de la DOE provocados por la polarización de una única cMP. La hiperpolarización de la célula provoca aumentos del intervalo en tanto que la despolarización provoca reducciones del intervalo natural de la DOE (Bennett y col., 1967; Curti, 2007). Asimismo, en un registro intracelular de cMP, la espiga espontánea remanente luego del bloqueo del PA en esa célula por refractariedad ha sido interpretada como una espiga acoplada, provocada por la descarga sincrónica de PAs en las cMP acopladas electrotónicamente con ella (Bennett y col., 1967; Curti, 2007).

Por su parte, resultados electrofisiológicos obtenidos en experimentos in vivo indican el acople electrotónico entre las cR. En el curso de estos experimentos, algunos hallazgos fueron interpretados como indicativos de que el acople electrotónico entre cR es indirecto y que se establece a través del axón de las cMP (Bennett y col., 1967). La estimulación eléctrica de la médula espinal con intensidades subumbrales para el axón de la cR registrada provoca un potencial despolarizante de baja amplitud y corta duración (Bennet y col., 1967; Falconi y col., 1997). Estos potenciales serían el resultado de la propagación electrotónica de la corriente generada por los PAs en cR acopladas electrotónicamente con la célula registrada. El registro de pares de cR en *Steatogenys*, gymnotiforme de pulso, permitió obtener evidencias directas de acople electrotónico entre estas células (Bennett y col., 1967). En estos experimentos, la inyección de pulsos hiperpolarizantes en una cR provocó hiperpolarizaciones del potencial de membrana, con el mismo curso temporal pero de menor amplitud en la otra cR, con un coeficiente de acoplamiento cercano al 6%. El acople electrotónico entre cR aportaría al sincronismo entre estas células y con ello a la elaboración del comando descendente requerido para la

generación de la forma de onda de la DOE por parte del resto del sistema electrogenerador (Caputi, 1999). La existencia de acople para colorante entre cR (Spiro, 1997) apunta al contacto eléctrico entre estas células mediado por uniones gap.

La secuencia de activación de las poblaciones neuronales del NEB indica que el comando generado en las cMP es transferido de manera rápida y eficaz, activando sincrónicamente a la población de cR vía contactos sinápticos presumiblemente eléctricos entre ambos tipos neuronales (Bennet y col., 1967; Elekes y Szabó, 1981b; 1982, 1985; Moortgat y col., 2000). De acuerdo con las evidencias morfológicas aportadas por Kawasaki y Heiligenberg (1990) en *Hypopomus*, el axón de las cMP presenta un recorrido extranuclear (bucle de 300-400 μm) antes de reingresar al NEB y establecer contactos con las cR. Esta observación también ha sido realizada en *G. omarorum* (Lorenzo y Trujillo-Cenóz, comunicación personal). El recorrido extranuclear del axón de las cMP podría explicar el intervalo cercano a 1 ms que separa la activación de ambos tipos celulares del NEB (Bennet y col., 1967; Curti y col., 2006). El acople electrotónico entre las cMP y las cR a través de sinapsis eléctricas aseguraría la eficacia de la transmisión del comando rítmico originado en la población de cM, con un alto factor de seguridad y resistente a la fatiga. La existencia de este tipo de contactos ha sido postulado para explicar los efectos de la polarización de una única cR por inyección de corriente sobre la frecuencia de la DOE en *Steatogenys* (Bennet y col., 1967). Asimismo, las diferencias en la amplitud de los PA espontáneos en cR respecto de los provocados de forma directa o antidrómica en estas células han sido atribuidas a la existencia de acople electrotónico entre la célula registrada y el axón de las cMP que la inervan. Este acople ofrecería una vía de baja resistencia para la fuga de corrientes hacia membranas inactivas (Bennett y col., 1967).

Evidencias adicionales a favor de la existencia de acople electrotónico entre las neuronas del NEB provienen de los estudios de Moortgat y col. (2000) **en el pez de onda** *Apteronotus leptorhynchus*. Estos autores hicieron un análisis profundo de la conectividad del NEB a través de técnicas electrofisiológicas, farmacológicas y anatómicas. Los estudios realizados no permiten conocer la naturaleza de la célula registrada debido a que ambos tipos de neuronas, cMP y cR, se distribuyen aleatoriamente en el NEB (Zupanc, 2017), y no se distinguen claramente por sus propiedades electrofisiológicas en los registros intracelulares. A través del registro de pares *in vitro*, demostraron la existencia de acople electrotónico, aunque no fueron capaces de modificar la frecuencia de descarga espontánea a través de la polarización de neuronas (pulsos de corriente de hasta 25 nA). El coeficiente de acoplamiento para el PA fue estimado entre 1 y 5 %. Los autores reportan la reducción del acople electrotónico por agentes desacoplantes (halotano, 2.5-5 %; octanol, 1-5 mM; y carbenoxolona, 100 μM -1 mM) pero no descartan efectos inespecíficos sobre conductancias operadas por voltaje. A través del análisis del acople para colorante observado en sus experimentos, Moortgat y col. (2000) sugieren a las uniones gap como sustrato estructural del acople electrotónico detectado.

Diversos estudios morfológicos refieren la presencia de uniones gap en distintas estructuras del sistema nervioso central de peces Gymnotiformes, particularmente en elementos de la vía electrosensorial (Bennett y col., 1967; Tokunaga y col., 1980; Elekes y Szabo, 1981a, 1981b, 1982, 1985; Yamamoto y col., 1989; Castelló y col., 1998; Moortgat y col., 2000). Estudios ultraestructurales del NEB han demostrado la presencia de uniones en hendidura, sustrato anatómico de las sinapsis eléctricas, aun cuando no se pudo determinar, con certeza, la naturaleza de las neuronas que establecen contactos entre sí (Bennett y col., 1967; Elekes y Szabo, 1982). Complementariamente, se han reportado evidencias inmunocitoquímicas, utilizando un anticuerpo policlonal de baja especificidad,

que sugieren la presencia de conexinas, proteínas de las uniones gap, en el NEB del pez de onda *Apteronotus* (Yamamoto y col., 1989; Sîrbulescu y col., 2014). En las neuronas del núcleo, aparecen escasas marcas de tipo puncta en el segmento inicial del axón y en la periferia de las neuronas, aunque también reportan marcaje en las células gliales.

El efecto de agentes desacoplantes sobre la variabilidad del intervalo de la descarga del NEB en peces de onda sugiere la importancia del acople electrotónico y de las propiedades electrofisiológicas intrínsecas de los componentes neuronales del NEB en el desempeño del NEB como un oscilador de gran precisión (coeficiente de variación del intervalo del orden de 2 ± 10^{-4}) (Moortgat y col., 1998, 2000; Yang y Ling, 2007; Elsen y col., 2008; Verselis y Srinivas, 2013). En peces de pulso, el bajo coeficiente de variación del intervalo (10^{-2} y 10^{-3} , Silva y col., 2007; Giora y col., 2008; Fernandes y col., 2014; Waddell y col., 2016; Vitar, 2019), sugiere un papel similar del acople electrotónico en el desempeño del núcleo. En efecto, en estas especies, el NEB también parece operar como un oscilador neural de gran precisión, responsable de la generación de un comando rítmico temporalmente robusto.

En suma, en la mayoría de los Gymnotiformes, el NEB es una estructura del SNC compuesta por dos tipos celulares -MP y R- acopladas electrotónicamente entre sí y conectadas en serie a través de sinapsis presumiblemente eléctricas, diseño que ha probado dotar de estabilidad funcional a ciertas redes neuronales (Volman y col., 2011). Junto a las propiedades electrofisiológicas de cada tipo celular, esta conectividad intranuclear contribuiría centralmente al desempeño del NEB como un CGP-EM extremadamente robusto y eficaz en el establecimiento del ritmo y responsable de las etapas iniciales de la elaboración de la forma de onda DOE.

d. Modulaciones de la DOE

Sin perjuicio de la elevada estabilidad funcional que deriva del diseño circuital basado en el acople electrotónico entre los elementos neuronales del NEB, este núcleo muestra una extraordinaria versatilidad adaptando la emisión de la eferencia rítmica a las demandas del entorno. Así, en respuesta a los desafíos derivados de la interacción social y de las cambiantes condiciones físicas del entorno, estos peces emiten una variedad de modulaciones de la DOE (repertorio electromotor) modificando tanto su frecuencia como su forma de onda. Las modulaciones de la DOE se producen en respuesta a la activación de fibras aferentes al NEB procedentes de neuronas de distintas ePreMP (Kawasaki y col., 1988; Kawasaki y Heiligenberg, 1988, 1989; Keller y col., 1991; Kennedy y Heiligenberg, 1994; Caputi y col., 2005; Comas y Borde, 2010). Aun cuando se han reportado diferencias entre especies, en general estas estructuras consisten en agrupamientos neuronales bilaterales distribuidos a nivel diencefálico, mesencefálico y bulbar, que integran información procedente de varias estructuras del SNC y proyectan directamente a las células que integran el NEB. A nivel diencefálico, se reconocen distintos subnúcleos: dos glutamatérgicos y uno GABAérgico, cuya activación provoca efectos distintivos en la descarga del NEB durante los comportamientos electromotores. Los glutamatérgicos, PPnG y PPnC, hacen sinapsis sobre las cMP y las cR, respectivamente. La activación del PPnG promueve aceleraciones de la DOE en tanto que la del PPnC provoca brotes de descarga de alta frecuencia de DOEs irregulares, de escasa amplitud, con profunda distorsión de la forma de onda (ver más adelante). Los axones de las neuronas GABAérgicas (PPnI) establecerían contactos sinápticos exclusivamente con las cMP. Las cR del NEB también recibirían contactos glutamatérgicos de un agrupamiento mesencefálico, el núcleo sublemniscal (SPPn), cuya activación asocia diferentes efectos

sobre la DOE según las especies (cambios de la frecuencia, de la forma de onda o interrupciones). Finalmente, neuronas glutamatérgicas distribuidas en la formación reticulada bulbar estarían implicadas en la modulación de la frecuencia de la DOE durante el escape (ver más adelante).

De acuerdo a su duración y a la naturaleza de los moduladores implicados, las modulaciones pueden ser categorizadas en: de corto, de mediano y de largo plazo. Las primeras implican la acción de neurotransmisores rápidos clásicos (por ejemplo GABA y glutamato) actuando sobre receptores específicos de las células del NEB y provocando modulaciones transitorias de corta duración (decenas de milisegundos a segundos) del ritmo y/o del patrón del CPG-EM (Kawasaki y Heiligenberg, 1989; Spiro, 1997; Curti y col., 1999; Quintana y col., 2011b, 2014). Estas incluyen: i.- el incremento abrupto y prolongado de la frecuencia de la DOE preservando su forma de onda, como ocurre durante el escape (Falconi y col., 1995) o ante la presencia de un estímulo novedoso (Barrio y col., 1991) y ii.- los brotes decrementales (“chirps”), descargas breves de alta frecuencia y baja amplitud con profunda distorsión de la forma de onda de la DOE que los individuos emiten como señales de comunicación (Zakon y col., 2002; Perrone y col., 2009, Batista y col., 2012). Las modulaciones de mediano plazo son aquellas que involucran la acción de neuromoduladores y neuropéptidos de acción local y son más prolongadas (minutos a horas). Entre ellas se encuentran las variaciones circadianas de la frecuencia basal de la DOE, descritas en *Brachyhypopomus gauderio*, que implican la participación de diferentes neuropéptidos u hormonas según el contexto social (arginina-vasotocina o melatonina; Perrone y col., 2010; Migliaro y Silva, 2016; Perrone y Silva, 2018). Las modulaciones de largo plazo se expresan como cambios estacionales de la DOE observados en especies que exhiben dimorfismo sexual eléctrico y resultan de la acción de hormonas esteroideas. En estas especies, durante el período reproductivo, los machos muestran cambios en la forma de onda de la DOE a consecuencia de un incremento del volumen de los electrocitos y la modificación de la cinética de la corriente de sodio en estas células (Ferrari y col., 1995; Zakon, 1996). Asimismo, los esteroides podrían promover la expresión de receptores para neurotransmisores rápidos en las cR del NEB durante el período reproductivo, incorporando modulaciones de corto plazo (señales sociales durante el cortejo) a su repertorio electromotor (Pouso y col., 2010; Quintana y col., 2014). Los mecanismos responsables de los cambios que se observan en la actividad del NEB en modulaciones de mediano y largo plazo aun no han sido dilucidados.

A continuación, se describen las principales modulaciones de corto plazo de la DOE descritas en Gymnotiformes. De acuerdo con las características de estas modulaciones y el contexto comportamental en el que son emitidas se distinguen: i.- comportamientos electromotores que resultan en el incremento de la capacidad discriminativa del sistema electrosensorial y caracterizados por aumentos de la frecuencia de la DOE **con preservación de su forma de onda**, y ii.- señales de comunicación que pueden conllevar tanto a cambios de la frecuencia como a la distorsión profunda de la forma de onda de la DOE. Esta distinción es relevante ya que ambos tipos de modulaciones, desplegadas como distintas respuestas adaptativas, implican diferentes mecanismos de generación a nivel del NEB (ver más adelante).

Respuestas de novedad. Este despliegue electromotor es desencadenado por un estímulo sensorial novedoso e implica un aumento abrupto y transitorio de la frecuencia de la DOE (~3 segundos), sin modificaciones de su forma de onda (Lissman, 1958). La magnitud del aumento (5-10 Hz) varía con la intensidad del estímulo (Aguilera y Caputi, 2003; Caputi y col., 2008). Se acepta que este despliegue electromotor conlleva una

función exploratoria incrementando la capacidad discriminativa del sistema electrosensorial del animal (Barrio y col., 1991; Capurro y col., 1994).

Aumento Rápido de la frecuencia de la DOE provocado por la célula de Mauthner (M-ARDOE). Este comportamiento es relativamente estereotipado y se caracteriza por un aumento abrupto (incremento de hasta un 93% de la frecuencia basal, lo que asocia un cambio de frecuencia de entre 10 y 15 Hz) y relativamente duradero (hasta 30 s) de la frecuencia de la DOE, sin modificación de su forma de onda, provocado por la activación de la célula de Mauthner (CM), neurona comando para la respuesta de escape (Falconi y col., 1995, 1997; Curti y col., 1999). El carácter relativamente estereotipado y el comportamiento todo o nada del M-ARDOE deriva su origen en la descarga de un único PA en la CM. El aumento de frecuencia de la DOE asociado al despliegue motor podría estar involucrado en la actualización rápida del mapa electrosensorial inmediatamente antes de la fase propulsiva del escape para la selección de la trayectoria (Comas y Borde, 2010).

Respuesta de evitación de interferencia (Jamming Avoidance Response, JAR). Constituye uno de los comportamientos más estudiados en los peces de onda, aunque también ha sido descrito en peces de pulso (Heiligenberg y col., 1978; Capurro y col., 1997; Lorenzo y col., 2006). En presencia de un individuo de la misma especie con una DOE de frecuencia similar, los peces de onda aumentan o reducen su frecuencia. La duración de esta modulación se mantiene en tanto exista interacción con el individuo interfiriente (Bullock y col., 1972; Zakon y col., 2002). En los peces de pulso, la JAR implica únicamente aumentos transitorios de la frecuencia del pez de mayor frecuencia evitando la coincidencia de su DOE con la del ejemplar interfiriente. Se estima que este comportamiento busca preservar la capacidad electrolocativa del pez ante la presencia de uno o más congéneres cercanos (Bullock y col., 1972; Heiligenberg, 1991).

“Chirps” o brotes decrementales. Particularmente en peces de pulso, este comportamiento electromotor implica la desorganización transitoria (20-300 ms) de la DOE durante la cual se produce una profunda distorsión de su forma de onda y un aumento de la frecuencia de la señal eléctrica emitida (200-300 Hz) (Hagedorn, 1986; Zakon y col., 2002; Quintana y col., 2011b; Batista y col., 2012). Aun cuando no ha sido específicamente demostrado, las características de los “chirps” sugieren que en la emisión de esta señal social, algunas cR descargan repetitivamente pero de manera asincrónica lo que provocaría la profunda distorsión de la forma de onda de la DOE durante el “chirp”. En peces de pulso, típicamente estos comportamientos electromotores son señales de comunicación y se observan durante el cortejo, desove y encuentros agonísticos (Hagedorn, 1986; Zupanc y Maler, 1997; Stoddard, 2002; Perrone y col., 2009; Batista y col., 2012).

Interrupciones de la DOE. En Gymnotiformes se han descrito dos tipos de interrupciones durante las cuales el animal deja de emitir DOEs transitoriamente. En las llamadas interrupciones abruptas, el cese de la DOE (1.6-2.1 s de duración) (Perrone y col., 2009) es precedido en general por una aceleración breve de la descarga. Durante estas interrupciones, las cMP mantienen su descarga regular en tanto que las cR se encuentran despolarizadas desarrollando potenciales plateau que bloquean su capacidad de responder al comando de las cMP (Kawasaki y Heiligenberg, 1989). Una vez finalizada la interrupción, la frecuencia de la DOE permanece transitoriamente elevada. El otro tipo de interrupciones transitorias pueden ser más duraderas (0.1-6 s) se inician con la reducción progresiva de la frecuencia de la DOE y han sido denominadas “offs” (ver p.ej. Batista y col., 2012). Luego de la interrupción la DOE retoma su frecuencia basal. Las

interrupciones han sido descritas tanto durante el cortejo de la familia Hypopomidae como en encuentros agonísticos de varias especies (Black-Cleworth, 1970; Hagedorn, 1986; Stoddard, 2002; Perrone y col., 2009; Batista y col., 2012). En estos últimos, se especula que las interrupciones buscarían “invisibilizar” eléctricamente a uno de los individuos en momentos específicos de la contienda.

Entre los Gymnotiformes, particularmente los de pulso, distintas especies filogenéticamente emparentadas (Crampton, 2019), exhiben notables diferencias en sus repertorios electromotores. Por ejemplo, individuos de la familia Hypopomidae, son peces gregarios que presentan dimorfismo sexual morfológico y eléctrico durante el período reproductivo. Estas especies son capaces de generar al menos 4 tipos distintos de "chirps", breves aceleraciones e interrupciones de la DOE en interacciones hembra-macho durante la época reproductiva (Perrone y col., 2009), así como también respuestas de novedad (Kawasaki y Heiligenberg, 1990) y respuestas de evitación de interferencia (Heiligenberg y col., 1978) comunes a otras especies. En contraste, *Gymnotus omarorum*, especie solitaria y territorial que no presenta dimorfismo sexual morfológico ni eléctrico en ningún momento del año, exhibe menos diversidad en su repertorio electromotor. Se han reportado comportamientos electromotores tales como la respuesta de evitación de interferencia (Capurro y col., 1997; Lorenzo y col., 2006), respuestas de novedad (Caputi y col., 2003; Pereira y col., 2012), el M-ARDOE (Falconi y col., 1995) e interrupciones breves y un tipo de “chirp” durante encuentros agonísticos (Batista y col., 2012).

e. Bases neurales de los comportamientos electromotores de corto plazo

Los mecanismos que subyacen a la generación de los diferentes comportamientos electromotores han sido explorados en una variedad de especies (ver para revisión Caputi y col., 2005). En términos generales, las modulaciones de la DOE que integran el repertorio conductual eléctrico de corto plazo de una especie resultan de la activación específica de las ePreMP por parte de aferentes procedentes de estructuras vinculadas al procesamiento de información sensorial así como de otros sectores del SNC (Zupanc, 2002; Crampton, 2019). A excepción de la JAR en peces de onda y del M-ARDOE en peces de pulso, los procesos neurales que provocan la activación de las ePreMP no han sido completamente dilucidados (Heiligenberg 1991; Comas y Borde, 2010). Estas estructuras proyectan al NEB y son capaces de desencadenar modulaciones específicas de la DOE de acuerdo con el tipo celular (cMP y cR), blanco de la acción sináptica, y con la diversidad de receptores postsinápticos y de su distribución específica en las neuronas del NEB. En esta sección se describen los mecanismos que operan a nivel del NEB, responsables de las modificaciones de la DOE observadas en los principales comportamientos electromotores de corto plazo.

Modificaciones de la frecuencia. Evidencias farmacológicas obtenidas in vivo a través de la aplicación local de agonistas al NEB y el efecto de antagonistas sobre las respuestas provocadas por la estimulación eléctrica de ePreMP, indican que los incrementos de frecuencia de la DOE que ocurren durante las respuestas de novedad y la JAR están asociados a una acción glutamatérgica sobre las cMP, a través de la activación de receptores ionotrópicos de tipo NMDA (rNMDA) (Kawasaki y Heiligenberg, 1988, 1990; Dye y col., 1989; Metzner, 1993; Juranek & Metzner, 1997, 1998). Por su parte, en base a evidencias electrofisiológicas, farmacológicas y morfológicas, se ha demostrado que el M-ARDOE resulta de la co-activación de rNMDA y metabotrópicos para glutamato (mGluR) de las cMP (Curti y col., 1999, 2006). En estos casos, los incrementos de frecuencia se producen con preservación de la forma de onda de la DOE y se especula que resultan en un incremento de la capacidad discriminativa electrosensorial del pez. De forma

característica, en mamíferos, los contactos glutamatérgicos suelen implicar la coactivación de receptores de tipo AMPA (rAMPA) y rNMDA (Isaac y col., 1995; Liao y col., 1995; Voronin y Cherubini, 2004). Aun cuando la aplicación local de agonistas glutamatérgicos revela la existencia de rAMPA funcionales en las cMP (Curti et al., 1999; Quintana y col., 2011b), las aceleraciones de la DOE referidas más arriba parecen involucrar aferentes glutamatérgicas a las cMP de tipo solo-NMDA, i.e.: el glutamato liberado activa únicamente rNMDA. En peces de onda se ha postulado que la frecuencia de la DOE está determinada por el nivel de activación de este tipo de aferentes (Kawasaki y Heiligenberg, 1988, 1990; Dye y col., 1989; Metzner, 1993; Juraneky& Metzner, 1997, 1998). Los cambios de frecuencia de la DOE durante la JAR estarían determinados por variaciones de este nivel de activación.

Modificaciones de la forma de onda. Los “chirps” descritos en especies de pulso representan comportamientos electromotores caracterizados por la distorsión profunda de la forma de onda de la DOE. Aun cuando han sido considerados como señales de comunicación intraespecífica, su valor como estrategia para la evitación de interferencia en *Steatogenys* ha sido propuesto recientemente (Field y col., 2019). En la mayoría de los géneros, los “*chirps*” resultan de la activación de rAMPA presentes en las cR, cuya activación provoca la despolarización supraumbral de las células y la aparición de brotes de PAs de alta frecuencia (180-250 Hz) (Kawasaki y Heiligenberg, 1990; Spiro, 1997).

Interrupciones. Como se mencionara más arriba, se reconocen dos tipos de interrupciones transitorias de la DOE: unas se inician con la disminución progresiva de la frecuencia de la DOE y otras que, por el contrario, se instalan abruptamente (o luego de un breve brote de alta frecuencia). En tanto que las primeras asocian el cese de las descargas de las cMP y son consecuencia de la activación de receptores GABAérgicos en estas células (Kawasaki y Heiligenberg, 1989, 1990; Kennedy y Heiligenberg, 1994), las últimas resultan de la despolarización de gran amplitud, tipo plateau, de las cR mediada por la activación de rNMDA que conlleva a la inactivación de los canales de Na⁺ de estas células (Keller y col., 1991; Spiro y col., 1994; Spiro, 1997; Quintana y col., 2014). Durante las interrupciones abruptas, las cMP mantienen la descarga espontánea y rítmica y el cese de la DOE es consecuencia del bloqueo de la descarga de PAs de las cR.

Estos mecanismos, esquematizados en la Figura 4, revelan la estrategia neural que ha evolucionado en Gymnotiformes, capaz de dotar de versatilidad funcional al NEB, estructura de elevada estabilidad funcional derivada de un diseño circuital basado en el acople electrotónico entre los elementos neuronales que lo componen. Así, el repertorio electromotor de cada especie resulta del **patrón de inervación del NEB** por parte de las ePreMP i.e.: la segregación de entradas sinápticas dirigidas específicamente a cada uno de los tipos neuronales así como la distribución específica de receptores en las dos poblaciones neuronales (MP o R). Las diferencias en el repertorio electromotor entre las especies derivarían de sus diferencias en el patrón de inervación del NEB.

La evidencia experimental obtenida en varias especies sostiene la validez de este marco conceptual. Por ejemplo, la activación del mismo subtipo de receptor (rNMDA) genera comportamientos electromotores diferentes según el tipo celular activado: en las cMP provoca aumentos de la frecuencia de la DOE sin modificación de su forma de onda en tanto que en las cR produce las interrupciones abruptas (Kawasaki y Heiligenberg, 1990; Spiro, 1997, Quintana y col., 2014). Por otra parte, la activación de diferentes subtipos de receptores de glutamato localizados en el mismo tipo celular puede provocar diferentes comportamientos electromotores: la activación de rNMDA de las cR provoca interrupciones abruptas, la activación de rAMPA en estas células provoca “chirps” (Kawasaki y

Heiligenberg, 1990). La consideración del esquema de la Figura 4 permite además concluir que la activación de los receptores postsinápticos de las cMP genera comportamientos electromotores que implican exclusivamente cambios en la frecuencia de la DOE (no de la forma de onda) mientras que la activación de receptores de las cR puede resultar en la interrupción de la DOE precedida de aceleración (rNMDA) o en una profunda distorsión de su forma de onda (rAMPA).

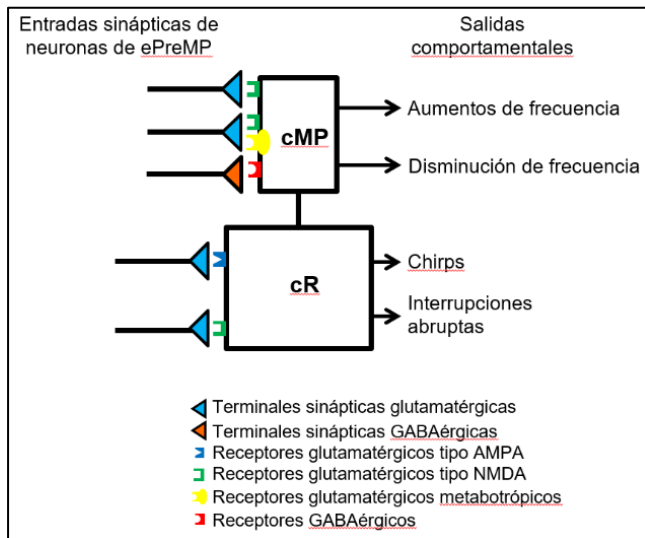


Figura 4: Resumen esquemático de los mecanismos que subyacen a diversos comportamientos electromotores en Gymnotiformes de pulso. A la izquierda se ilustran las entradas sinápticas provenientes de estructuras premarcapaso (ePreMP) dirigidas a las células marcapaso (cMP) o relé (cR) y a la derecha las salidas comportamentales asociadas a la activación de estas entradas sinápticas. Se ilustran los diversos receptores involucrados según la clave incluida abajo a la derecha. (De acuerdo a Dye y col., 1989; Kawasaki y Heiligenberg, 1990; Spiro, 1997 y Quintana y col., 2014).

3. Antecedentes específicos: patrón de inervación en *G. omarorum*

El patrón de inervación de *Gymnotus omarorum*, ha sido analizado in vivo combinando técnicas electrofisiológicas y farmacológicas en experimentos diseñados para esclarecer las bases neurales del M-ARDOE, aumento abrupto de gran amplitud y relativamente duradero (hasta 30 s) de la frecuencia de la DOE, provocado por la activación de la célula de Mauthner (Curti y col., 1999). En esos experimentos, la aplicación local de agonistas glutamatérgicos reveló la expresión de receptores funcionales de tipo NMDA, AMPA y mGluR exclusivamente en las cMP (Fig. 5). En línea con las consecuencias funcionales de la segregación de entradas al NEB, la activación de estos receptores, aunque con diferencias cinéticas según el receptor explorado, provocó únicamente aumentos de la frecuencia de la DOE, preservando su forma de onda. Abordajes complementarios utilizando técnicas de marcaje retrógrado y farmacología in vivo, muestran que el M-ARDOE resulta de la activación, probablemente disináptica, de ePreMP localizadas a nivel diencefálico y bulbar (Comas y Borde, 2010). Estas estructuras, presumiblemente glutamatérgicas, hacen sinapsis exclusivamente con las cMP del NEB. El reclutamiento de estas estructuras por estimulación de la célula de Mauthner provocó aceleraciones de la DOE mediadas por rNMDA y mGluR. La ausencia de efecto de la aplicación local de antagonistas para rAMPA sobre el M-ARDOE descarta la participación de estos receptores de las cMP en la respuesta (Curti y col., 1999; 2006). En otros Gymnotiformes de pulso la aplicación local de agonistas de rAMPA también provoca respuestas en la frecuencia de la DOE compatibles con la activación de este tipo de receptores en las cMP (Quintana et al. 2014).

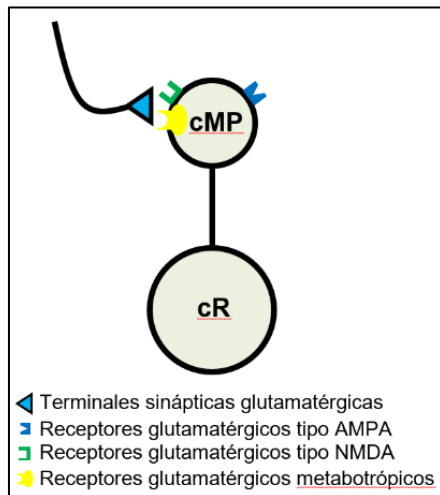


Figura 5: Resumen esquemático del NEB de *Gymnotus omarorum*. Las aferentes glutamatérgicas provenientes de ePreMP que se activan por la estimulación de la célula de Mauthner recluta receptores glutamatérgicos de tipo NMDA y metabotrópicos en las células marcapaso (cMP). Éstas también expresan receptores glutamatérgicos de tipo AMPA, aunque se desconocen las ePreMP capaces de reclutarlos. cR: células de relevo. (De acuerdo a Falconi y col., 1997 y Curti y col., 1999).

Contactos sinápticos glutamatérgicos que involucran exclusivamente rAMPA (contactos de tipo solo-AMPA) han sido demostrados en mamíferos (Asztely y col., 1997) y, específicamente, en cR de varios Gymnotiformes (Kawasaki y Heiligenberg, 1989, 1990; Caputi y col., 2005; Spiro, 1997). La demostración de la activación de rAMPA de las cMP por el glutamato liberado por activación fisiológica de entradas glutamatérgicas al NEB, representaría un avance significativo en la caracterización del patrón de inervación en estas especies. En este sentido, acerca de los rAMPA en estas células, cabe preguntarse: ¿participan de contactos sinápticos solo-AMPA o están implicados en contactos sinápticos glutamatérgicos clásicos rAMPA-rNMDA (Cottrell y col., 2000; Clark y Cull-Candy, 2002; Traynelis y col., 2010)? ¿Se trata de receptores de localización extrasináptica? La respuesta a estas preguntas aportaría información crítica para emprender la búsqueda del comportamiento electromotor que involucra la participación de este tipo de receptores.

En Gymnotiformes, aceleraciones de la DOE resultan de la activación de aferentes glutamatérgicas al NEB que establecen contactos sinápticos que involucran exclusivamente rNMDA (contactos solo-NMDA), con las cMP (Kawasaki y Heiligenberg 1989, 1990; Spiro 1997; ver Caputi et al. 2005 para revisión). El M-ARDOE en *G. omarorum* constituye el ejemplo más claro de este tipo de comportamientos electromotores (Curti y col., 1999, 2006). Los rNMDA exhiben varias propiedades, entre las que se encuentran su cinética lenta y su dependencia al voltaje provocada por el bloqueo del canal a concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} extracelular (Nowak y col., 1984; Qian y col., 2005; Reiner y Levitz, 2018). En mamíferos, la mayoría de los contactos sinápticos glutamatérgicos colocalizan rAMPA y rNMDA (Kleppe y Robinson, 1999; Takumi y col., 1999; Liao y col., 2001; Zhou y col., 2001; Antal y col., 2008). En estos contactos, la activación de los rAMPA provoca la despolarización de la célula postsináptica requerida para remover el bloqueo por Mg^{2+} del rNMDA y permitir el aporte de estos receptores a la corriente postsináptica. A diferencia de lo que ocurre en la mayoría de los casos en mamíferos en que estos contactos no generan corrientes postsinápticas en neuronas en reposo (“contactos silentes”, ver p.ej.: Liao y col., 2001), los contactos solo-NMDA en Gymnotiformes que reciben las neuronas del NEB generan efectos postsinápticos manifiestos aun en ausencia de la coactivación de receptores AMPA (Kawasaki y Heiligenberg 1989, 1990; Spiro 1997; Curti y col., 1999, 2006). Los efectos postsinápticos de la activación de contactos solo-NMDA sobre las cMP del NEB han sido explicados por el hecho de que la célula postsináptica presenta despolarizaciones espontáneas y rítmicas capaces de remover el bloqueo por Mg^{2+} (Curti et al., 1999). Otro tanto podría ocurrir para el caso de los contactos solo-NMDA que reciben las cR en otros Gymnotiformes. Más recientemente se ha reportado que los contactos solo-NMDA involucran rNMDA con subunidades constitutivas de tipo GluN2B (GluN1-GluN2B), lo que le confiere características cinéticas y de dependencia de voltaje particulares (Nakayama y col., 2005; Paoletti, 2011). Característicamente, en los receptores compuestos por este tipo de subunidades, la corriente postsináptica es más lenta que la asociada a la activación de receptores clásicos (GluN1-GluN2A), por lo que las respuestas postsinápticas son comparativamente más lentas y duraderas. Asimismo, la dependencia al voltaje en los rNMDA con subunidad GluN2B es levemente menor. La participación de este tipo de receptores en contactos glutamatérgicos solo-NMDA sobre las células del NEB aportaría características funcionales al contacto adaptadas a las características electrofisiológicas de las células postsinápticas. La dependencia de voltaje ligeramente disminuida de este tipo de receptores, por ejemplo, podría contribuir a incrementar la ganancia del contacto. Por su parte, la cinética lenta de la corriente postsináptica podría aportar al curso temporal de las modulaciones de la DOE mediadas por este tipo de contactos (ver p.ej. curso temporal del M-ARDOE o de las interrupciones abruptas). La caracterización del patrón de inervación del NEB debería incluir, por tanto, la confirmación de la existencia de contactos solo-NMDA, así como la obtención de evidencias acerca de la identidad molecular de los receptores involucrados.

En el curso del análisis in vivo de las bases neurales del M-ARDOE en *G. omarorum* las evidencias obtenidas mediante la aplicación de agonistas específicos a la población de cR indican que estas células carecen de receptores para glutamato (Fig. 5, Curti y col., 1999). Sin embargo, más recientemente (Batista y col., 2012), se ha reportado que en la

etapa de post-resolución de encuentros agonísticos¹ en esta especie, los peces subordinados despliegan tanto “chirps” como interrupciones de la DOE (Fig. 6), comportamientos electromotores asociados a la activación directa de las cR a través de receptores AMPA y NMDA, respectivamente. Ambos comportamientos electromotores son señales eléctricas distintivas de la sumisión en la resolución del conflicto, junto con la reducción de la frecuencia basal del pez subordinado una vez establecida la relación jerárquica entre ambos contendientes (Perrone y Silva, 2018). Estos hallazgos, que sugieren la expresión de receptores ionotrópicos para glutamato en las cR, contrastan con los obtenidos en el curso de experimentos farmacológicos referidos más arriba (Curti y col., 1999). Esta aparente contradicción admite varias hipótesis interpretativas: i.- en los experimentos in vivo realizados por Curti y col. (1999), la interpretación de los resultados farmacológicos a partir del registro de la DOE utilizado para evaluar las respuestas a la aplicación local de agonistas no permitió detectar respuestas subumbrales de las cR concluyendo la ausencia de receptores glutamatérgicos en estas células, ii.- al igual que el mecanismo propuesto para el dimorfismo sexual eléctrico en *Brachyhyopomus gauderio* por el que las hormonas esteroideas provocarían la expresión de receptores glutamatérgicos en las cR responsables de la aparición de comportamientos electromotores propios de este período (Pouso y col., 2010; Quintana y col., 2014), moduladores liberados durante la contienda podrían provocar la expresión transitoria de receptores glutamatérgicos ionotrópicos en estas células, y finalmente iii.- los “chirps” e interrupciones reportadas por Batista y col. (2012) son el resultado de mecanismos no-glutamatérgicos como por ejemplo, la modulación de las propiedades intrínsecas de las cR. En tanto el primero de los mecanismos propuestos refiere limitaciones de la técnica utilizada por Curti y col. (1999), el segundo sugiere que la utilización de ejemplares desafiados comportamentalmente (encuentro agonístico) como modelo experimental podría revelar la presencia de receptores glutamatérgicos. Este último, conjuntamente con lo postulado para *Brachyhyopomus gauderio*, sugiere la existencia de plasticidad en la dotación de receptores en las células del NEB dependiente del contexto comportamental o reproductivo. El tercer mecanismo propuesto, sin embargo, desafía el marco conceptual hegemónico que ha dominado los mecanismos para la generación del repertorio electromotor en una especie dada e incorpora a las propiedades intrínsecas de las células del NEB y su modulación como un componente adicional determinante de la estrategia neural para la generación del repertorio electromotor en Gymnotiformes.

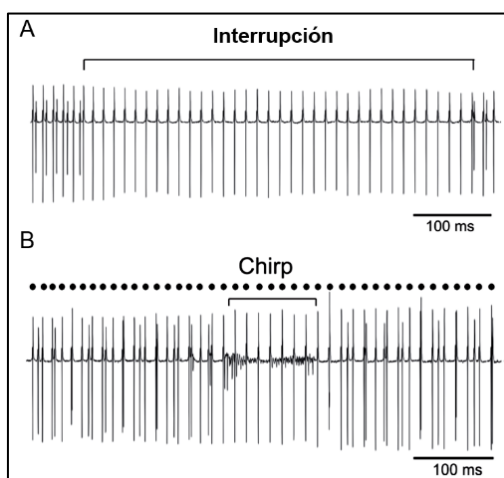


Figura 6: Registro de las DOEs de una pareja de *Gymnotus omarorum* luego de la resolución de su encuentro agonístico. A. Interrupción de la DOE. Se muestra el cese de la descarga del pez subordinado (descarga de menor amplitud) en tanto que el pez dominante mantiene su descarga regular (descarga de mayor amplitud). La interrupción de la DOE se señala con el corchete horizontal. **B.** Chirp. La descarga del pez subordinado (descarga de menor amplitud) muestra la emisión de un chirp (señalada por el corchete) mientras que el pez dominante mantiene su descarga regular (descarga de mayor amplitud, marcada por círculos negros arriba). (Modificado de Batista y col., 2012).

¹ La conducta agonística es un comportamiento social relacionado al conflicto entre miembros de la misma especie (Lorenz, 1963; King, 1973).

4. Hipótesis y objetivos

En Gymnotiformes, los comportamientos electromotores implican tanto cambios en el ritmo como de la de la forma de onda de la DOE que resultan de modulaciones específicas de la descarga del NEB. Mientras que entradas sinápticas dirigidas a las cMP generarán cambios en la frecuencia de la DOE preservando su forma de onda, aquellas dirigidas a las cR provocarán cambios de la forma de onda (“chirps” e interrupciones). En estas especies, se considera que el repertorio de comportamientos electromotores depende críticamente de dos propiedades de la organización circuital en el control del NEB:

1.- la segregación de entradas aferentes sinápticas provenientes de ePreMP a las cMP o cR mediadas por neurotransmisores rápidos (GABA y glutamato), y

2.- la distribución y naturaleza de los receptores postsinápticos activados por estas aferentes en las células blanco (ver esquema Fig. 4).

Sin embargo los hallazgos reseñados en la sección anterior, particularmente los referidos a la emisión de señales de sumisión reportados por Batista y col. (2012) sugieren la necesidad de revisar la estrategia neural para la organización del repertorio electromotor en Gymnotiformes incluyendo elementos adicionales a los propuestos más arriba o la consideración del contexto conductual. La neuromodulación de los elementos neuronales del NEB modificando sus propiedades intrínsecas y/o la expresión de receptores postsinápticos funcionales condicionada por el contexto comportamental podrían formar parte de esos elementos adicionales.

Sin perjuicio de lo anterior, cualquiera sea la estrategia neural para la generación del repertorio electromotor en una especie, ésta debe apoyarse además en que la organización anatómo-funcional del NEB sea capaz de asegurar:

i) su adecuado desempeño como marcapaso, generando un comando descendente rítmico cuyo sincronismo entre los elementos neuronales de proyección, es requerido para el reclutamiento ordenado del resto del sistema electromotor, y

ii) la segregación efectiva de entradas sinápticas a los dos tipos celulares como sustrato necesario para la generación de cambios de frecuencia o de la forma de onda que integran el repertorio electromotor de una especie dada.

El objetivo general de esta tesis consistió en avanzar en el conocimiento de las estrategias neurales que operan a nivel del NEB en Gymnotiformes para adaptar la emisión de señales eléctricas a los múltiples desafíos sociales y del entorno del pez. En consecuencia, y utilizando como modelo experimental a *Gymnotus omarorum*, nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

a. Objetivo específico 1: Confirmación in vitro de la distribución y naturaleza de los receptores funcionales glutamatérgicos en las células del NEB

La descripción actual de la distribución de receptores glutamatérgicos en el NEB de *G. omarorum* se realizó registrando las modificaciones del ritmo y forma de onda de la DOE provocada por la aplicación local de agonistas y antagonistas glutamatérgicos in vivo. Este abordaje tiene, sin embargo, ciertas limitaciones: no es posible el control adecuado de la concentración de las drogas aplicadas en la vecindad de las células del NEB y, debido a que se registra la DOE, eventuales respuestas subumbrales de las cR a la aplicación de agonistas glutamatérgicos pueden no ser detectadas. Para superar estos obstáculos nos propusimos analizar in vitro la presencia de receptores glutamatérgicos y de sus principales características funcionales, en las cMP y particularmente en las cR. De esta manera se pudieron realizar registros intracelulares de ambos tipos celulares al tiempo que se

aplicaron de forma yuxtacelular, bajo inspección visual, agonistas glutamatérgicos. En esta preparación también fue posible aplicar estímulos eléctricos a fibras aferentes glutamatérgicas al NEB, en ausencia y presencia de antagonistas glutamatérgicos. Este abordaje permitió conocer el patrón de inervación glutamatérgica en esta especie.

b. Objetivo específico 2: Análisis de los receptores postsinápticos para neurotransmisores rápidos en neuronas del NEB implicados en la emisión de señales que implican modificación de la forma de onda de la DOE ("chirps" e interrupciones) en ejemplares con desafío comportamental

Los resultados obtenidos durante el cumplimiento del primer objetivo experimental respecto de la ausencia de receptores glutamatérgicos en las cR en animales sin desafío comportamental podrían no ser concluyentes. La expresión transitoria de receptores glutamatérgicos en las cR o su inserción a la membrana sináptica podría estar favorecida por la acción de neuromoduladores liberados en el contexto del encuentro agonístico. Para analizar esta posibilidad, se utilizaron animales que emitieron señales de sumisión ("chirps" e interrupciones) durante un encuentro agonístico no más de 30 minutos antes del experimento. Se ensayaron aplicaciones locales de glutamato en las inmediaciones de las cR, buscando provocar la emisión de estas señales. Ante la ausencia de respuestas a la aplicación de glutamato y agonistas a las cR nos planteamos como hipótesis alternativa que el mecanismo que subyace a la emisión de las señales de sumisión involucra el cese de la actividad de las cMP por acción GABAérgica para el caso de las interrupciones y, como mecanismo subyacente al "chirp", el bloqueo de conductancias de las cR (usualmente implicadas en el control de la excitabilidad) como resultado de la acción de neuromoduladores liberados durante la contienda.

c. Objetivo específico 3: Estudio de la conectividad intrínseca del NEB

El acople electrotónico cMP-cMP, cMP-cR y cR-cR ha sido propuesto como una característica funcional de la conectividad intranuclear, crítica para su desempeño como marcapaso del SNC y como núcleo comando del sistema electromotor en Gymnotiformes. Sin embargo las evidencias en las que se apoya la existencia de acople electrotónico entre los elementos neuronales del NEB son escasas. En el marco de esta tesis sostenemos que, con vistas a la generación de los comportamientos electromotores, la organización anátomo-funcional del NEB debe sustentar: su adecuado desempeño como marcapaso, generando un comando descendente rítmico sincrónico pero a la vez modulable y la segregación efectiva de entradas sinápticas a los dos tipos celulares (MP y R) como sustrato necesario para la generación de cambios de frecuencia o de la forma de onda de la DOE. Con base en estas características funcionales del NEB nos planteamos las siguientes hipótesis: i) **las cMP, verdadero origen del comando rítmico para la DOE, se encuentran acopladas electrotónicamente entre sí.** Este subnúcleo del NEB, nivel generador del ritmo del CGP-EM, opera como marcapaso constituido por osciladores celulares débilmente acoplados. Este diseño le confiere la característica de marcapaso robusto cuya frecuencia puede ser modificada por influencias descendentes procedentes de ePreMP. ii) **las cMP se encuentran acopladas electrotónicamente con las cR a través de contactos axo-dendríticos o axo-somáticos,** transmitiendo el comando rítmico para la DOE originado en las cMP con un alto factor de seguridad. La conexión entre el soma de las cMP y las cR debería contribuir a establecer una suficiente distancia electrotónica entre ambos tipos celulares, determinando así el arreglo temporal entre la descarga de la población de cMP y de cR al favorecer la conducción unidireccional cMP-

cR del comando rítmico. Asimismo, esta distancia también sería responsable de evitar interferencia de entradas dirigidas a cada tipo celular, pese a encontrarse electrotónicamente acopladas. iii) **las cR se encuentran acopladas electrotónicamente entre sí**, sincronizando estas células de forma tal que generen un comando descendente para la elaboración de la forma de onda de la DOE por parte del resto del sistema electrogenerador. Nos propusimos caracterizar los contactos sinápticos entre los diferentes elementos neuronales del NEB utilizando registros de pares de neuronas y otros abordajes complementarios con foco en el análisis del acople electrónico y para colorante.

5. Aspectos metodológicos generales. Captura y mantenimiento de los animales

Todos los procedimientos experimentales fueron realizados en el Laboratorio de Neurofisiología Celular y Sináptica del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, UdelaR. Para llevar a cabo el análisis de los tres capítulos de este trabajo, se utilizaron individuos juveniles de *Gymnotus omarorum* (n = 75, 11-19 cm de largo). Estos fueron localizados en su ambiente natural en la Laguna del Sauce (34° 51' S, 55° 07' O, Departamento de Maldonado, Uruguay) mediante un amplificador portátil para la detección de descargas eléctricas para luego ser recolectados mediante una red sumergida. Se mantuvieron en cautiverio a temperatura ambiente en tanques de 500 litros, con los animales aislados físicamente pero no eléctricamente en jaulas individuales de red. Fueron alimentados con *Tubifex tubifex* una vez por semana ad libitum. Plantas acuáticas (*Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes*, *Salvinia sp.*) cubrían la superficie del agua y proporcionaban refugio a los peces. Debido a que *G. omarorum* no presenta dimorfismo sexual, tanto morfológica como electrofisiológicamente, el sexo de los animales se determinó mediante inspección gonadal antes (≥ 1 meses) o inmediatamente después de los experimentos. El sexo de los animales no tuvo efecto en los resultados obtenidos. La recolección de peces eléctricos con fines experimentales fue autorizada por la DINARA (Dirección Nacional de Recursos Acuáticos) y MGAP (Ministerio de Agricultura y Pesca), resolución N° 065/2004. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (exp. 071140-000092-13 y 071140-000105-13) y de la Comisión Bioética, Instituto Clemente Estable (MEC, 007/02/2010).

6. Capítulo 1: Confirmación in vitro de la distribución y naturaleza de los receptores funcionales glutamatérgicos en las células del NEB

a. Resumen

El artículo “Glutamatergic control of a pattern generating central nucleus in a gymnotiform fish” fue publicado en la revista *Journal of Neurophysiology*: 125 p.:2339 - 2355, en el año 2021.

En este estudio, se utilizó una preparación reducida in vitro del NEB para realizar un análisis electrofisiológico y farmacológico en profundidad de los mecanismos sinápticos implicados en las modulaciones transitorias del CGP-EM en *G. omarorum*. Demostramos que las cMP expresan diversos subtipos de receptores funcionales para el glutamato (NMDA, AMPA y metabotrópicos), mientras que en las cR estos receptores están ausentes, hallazgo que indica un patrón distintivo y específico de la especie respecto de la distribución de subtipos de receptores de glutamato en las neuronas del NEB. En esta especie, el nivel generador del ritmo del CGP-EM es el objetivo exclusivo para las entradas glutamatérgicas procedentes de las ePreMP por lo que las modulaciones de la actividad del NEB mediadas por neurotransmisores rápidos comprende exclusivamente modificaciones transitorias de la frecuencia de la DOE. La ausencia de receptores glutamatérgicos funcionales en las cR apoya la hipótesis de que la emisión de señales de comunicación transitorias que implican cambios en la forma de onda del DOE muy probablemente involucre la neuromodulación extrínseca de estas neuronas. Nuestros datos también indican que el control glutamatérgico de la frecuencia del CGP-EM probablemente incluya sinapsis, llamadas funcionales, en las que el glutamato coactivaría subtipos de receptores AMPA y NMDA de la membrana de las cMP y contactos en los que el glutamato activa exclusivamente receptores de tipo NMDA (sinapsis sólo-NMDA) en estas células. En contraste con los hallazgos en mamíferos, las sinapsis sólo-NMDA en las cMP del NEB también serían funcionales y no involucrarían receptores de tipo NMDA formados por subunidades GluN2B. Las sinapsis AMPA-NMDA y sólo-NMDA contactarían a las cMP en diferentes compartimientos celulares y podrían estar implicadas en modulaciones de la frecuencia de la DOE con diferente valor adaptativo explotando las diferencias en la cinética de las respuestas mediadas por receptores de tipo AMPA y NMDA.

RESEARCH ARTICLE

Control of Movement

Glutamatergic control of a pattern-generating central nucleus in a gymnotiform fish

Virginia Comas and Michel Borde

Laboratorio de Neurofisiología Celular y Sináptica, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Abstract

The activity of central pattern-generating networks (CPGs) may change under the control exerted by various neurotransmitters and modulators to adapt its behavioral outputs to different environmental demands. Although the mechanisms underlying this control have been well established in invertebrates, most of their synaptic and cellular bases are not yet well understood in vertebrates. *Gymnotus omarorum*, a pulse-type gymnotiform electric fish, provides a well-suited vertebrate model to investigate these mechanisms. *G. omarorum* emits rhythmic and stereotyped electric organ discharges (EODs), which function in both perception and communication, under the command of an electromotor CPG. This nucleus is composed of electrotonically coupled intrinsic pacemaker cells, which pace the rhythm, and bulbospinal projecting relay cells that contribute to organize the pattern of the muscle-derived effector activation that produce the EOD. Descending influences target CPG neurons to produce adaptive behavioral electromotor responses to different environmental challenges. We used electrophysiological and pharmacological techniques in brainstem slices of *G. omarorum* to investigate the underpinnings of the fast transmitter control of its electromotor CPG. We demonstrate that pacemaker, but not relay cells, are endowed with ionotropic and metabotropic glutamate receptor subtypes. We also show that glutamatergic control of the CPG likely involves two types of synapses contacting pacemaker cells, one type containing both α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) and *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors and the other one only-NMDA receptor. Fast neurotransmitter control of vertebrate CPGs seems to exploit the kinetics of the involved postsynaptic receptors to command different behavioral outputs. The prospect of common neural designs to control CPG activity in vertebrates is discussed.

NEW & NOTEWORTHY Underpinnings of neuromodulation of central pattern-generating networks (CPG) have been well characterized in many species. The effects of fast neurotransmitter systems remain, however, poorly understood. This research uses in vitro electrophysiological and pharmacological techniques to show that the neurotransmitter control of a vertebrate CPG in gymnotiform fish involves the convergence of only-NMDA and AMPA-NMDA glutamatergic synapses onto neurons that pace the rhythm. These inputs may organize different behavioral outputs according to their distinct functional properties.

AMPA; electric fish; electromotor CPG; NMDA; silent synapses

INTRODUCTION

The study of the neural strategies that organize behavior is a major challenge in neuroscience. Advancing our knowledge in this field critically depends on the use of experimental paradigms that provide multiple levels of analysis (i.e., behavioral, network, cellular, synaptic, and molecular levels) as well as powerful techniques. Understanding the neural underpinning of behavior is further facilitated when there is a direct relationship between the neural mechanisms under

study and the behaviors that result from these mechanisms. Pattern-generating neural systems [central pattern generators (CPGs)] are examples of valuable experimental models that meet this requirement (1). Regardless of its specific network architecture, most CPGs can be considered, functionally, as neural networks involving two interconnected levels (2, 3). One level is represented by a rhythmogenic network that may include neurons with pacemaker activity and the other level is composed by a set of neurons responsible for the specific patterned sequence of activation of peripheral

effectors. CPGs are classically conceived as neural networks endowed with an apparent stability of its neuronal components and intrinsic connectivity. Nevertheless, under the control of various neurotransmitters and modulators, both the rhythm and pattern of the behavioral output may change dramatically to cope with different environmental and social demands. This is supported by extensive experimental evidence obtained both in invertebrates (4–6) and vertebrates (7–12). Although the mechanisms underlying the CPG control exerted by neurotransmitters and modulators have been particularly well established in invertebrates, most of their synaptic and cellular basis in vertebrates are not yet well understood.

The pacemaker nucleus (PN) in gymnotiform electric fish is considered a two-layered model CPG (8) that provides an advantageous model system to investigate the direct impact of CPG modulations on an overt behavior. The rhythmic layer of this CPG is represented by a group of pacemaker cells (PM-cells) and the patterning layer comprises the projecting relay cells (R-cells) and their synaptic targets at the spinal cord, i.e., a topographically distributed population of electromotor neurons that innervate the effector. PM-cells are electrotonically coupled to each other and to R-cells (13, 14) and they form a rather simple circuit with exclusive feed-forward connections. The command for each EOD is thus initiated at PM-cells that discharge synchronously and then transmitted 1:1 to R-cells that ultimately translate the command drive to the electric organ, producing a species-specific EOD waveform pattern (15, 16; reviewed in Ref. 17). Under the control of the PN, these species emit rhythmic and stereotyped electric organ discharges (EOD) that allow electric fish to detect physical properties of their nearby environment and to communicate among conspecifics (15, 17–21). Gymnotiform species can be divided in two main groups according to the marked differences in the temporal pattern of the electric field they produce. Wave-type fish produce continuous, quasi-sinusoidal signals, whereas pulse-type fish generate discrete electrical pulses separated by relatively long intervals (17).

EOD modulations observed during specific adaptive and social behaviors constitute accessible, prominent, and distinctive electromotor behaviors. These depend on the activation of specific descending inputs to the PN, which arise from distinct prepacemaker nuclei (PPn; Refs. 17, 22, and 23). More recently, hormonal and peptidergic influences upon the electromotor system have also been characterized (reviewed in Ref. 24). Especially in pulse-type gymnotiform fish, electromotor behaviors include a wide variety of changes in the rate or in the waveform of the EOD. A wealth of previous studies (17, 21, 25–29) show that distinct types of short term EOD rate modulations depend not only on the specific PPn being activated but also on both the cellular target of PPn axons within the PN and the neurotransmitter receptors involved (17, 25–28, 30–32). More recently, the modulation of electrophysiological properties of PN neurons has emerged as a novel putative mechanism, endowing electromotor networks with higher functional versatility (22). Activation of GABAergic inputs to PM-cells induce them to silence their discharge, provoking EOD interruptions (22, 25, 26). Glutamatergic inputs to these cells, in turn, evoke slow and long-lasting rises in EOD rate via the activation of

NMDA receptors (NMDAR) by only-NMDA synapses (16, 25, 26, 30, 32–37). In pulse type Gymnotiformes an increase in EOD rate in responses to AMPA receptor (AMPA) agonists applied to PM-cells has been described (27, 30). Nevertheless, electromotor behaviors derived from activation of those receptors as well as the pattern of activation by glutamatergic descending inputs are still unknown. In R-cells, GABAergic innervation is apparently lacking (22, 26, 38). However, as described in several gymnotiform species, these cells are contacted by glutamatergic inputs whose activation triggers suprathreshold R-cell depolarizations, emitting bursts of high rate small discharges called chirps (via AMPAR) or abruptly stopping the EOD (via NMDAR) (17, 25–29).

Although the role of fast neurotransmitter modulations of the electromotor CPG in shaping the fish's electric behavior is indisputable, several important questions remain unsolved. For example, can AMPAR of PM-cells be activated by the synaptically released glutamate? Do they participate in AMPAR-only synapses or they are involved in classical AMPAR-NMDAR transmitting synaptic contacts (39–41)? As only-NMDA synapses have been proposed to involve receptors with slow kinetics likely containing subunits of the GluN2B type (42, 43), are similar receptors involved in the control of the electromotor CPG? To address these issues, in the present study we developed an *in vitro* preparation of *Gymnotus omarorum* brainstem slices containing the PN. Among pulse-type gymnotiform fish, this species is particularly suitable for our study since the PM-cells, grouped dorsally in the PN with respect to the R-cells located ventrally (Fig. 3A), are apparently the exclusive cellular target of the descending glutamatergic inputs (16, 30). This preparation allows the extra- and intracellular recording of responses of PM- and R-cells to: 1) glutamate and its agonists for different receptor subtypes applied juxtacellularly and 2) glutamate released by electric activation of descending inputs to the PN. We show that PM-cells, but not R-cells, are endowed with functional NMDA, AMPA, and metabotropic glutamate receptors and that NMDAR containing subunits of the GluN2B type are not involved in the control of the electromotor CPG. We also demonstrate for the first time in Gymnotiformes that glutamate released at certain synaptic terminals coactivates AMPAR and NMDAR that are most probably colocalized at glutamatergic synapses onto PM-cells. Our study contributes to a better understanding of how synaptic inputs to a vertebrate pattern-generating central nucleus may generate adaptive behavioral outputs.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Slices

Gymnotus omarorum ($n = 32$ animals, 11–16 cm in length) were collected from Laguna del Sauce (34°51'S, 55°07'W, Department of Maldonado, Uruguay). All the experimental procedures were conducted in accordance with the guidelines set forth by the Comisión Nacional de Experimentación Animal (exp. 071140-000092-13).

Individuals were anesthetized and placed in a plastic chamber on a wet sponge. All surgical areas and fixation points were heavily infiltrated with 2% lidocaine hydrochloride.

During surgical procedures, the head was maintained in a horizontal position by a pair of plastic tipped metal bars attached to the box and the gills were perfused with MS222 dissolved in iced tap water (0.3 mg/L). The dorsal surface of the brain was exposed while bathed with cold Na-free artificial cerebrospinal fluid (ACSF)-sucrose solution (see *Drugs and Solutions*). The brain with part of the spinal cord was rapidly removed from the skull and submerged in cold ACSF-sucrose solution. Transverse and horizontal sections (Fig. 1A) of the brainstem (400 μm thick) containing the PN were obtained under cold ACSF-sucrose using a Vibratome 1000 plus (The Vibratome Company, Saint Louis, MO) and were incubated (>1 h, at room temperature, 21–23°C) in a 1:1 solution of ACSF-sucrose and control ACSF solution (see *Drugs and Solutions*). Slices were transferred to a 2-mL recording chamber fixed to an upright microscope stage NIKON (Eclipse FN1, Nikon Company, Minato, Tokyo, Japan) equipped with infrared differential interference contrast (DIC) video microscopy and a $\times 40$ water immersion objective. Slices were perfused with carbogen-bubbled ACSF (1.5–3 mL/min) and maintained at room temperature (20–23°C). Under these experimental conditions, the PN maintains its spontaneous synchronized activity with a stable firing rate for at least 6 h (Fig. 1B).

Recording and Stimulation

The electric activity of the PN was monitored using an Axoclamp 2B amplifier (Molecular Devices, San José, CA) by means of extracellular recordings of field potentials or by recording intracellularly from PM- or R-cells. For extracellular recordings, patch pipettes (4–8 M Ω) filled with ACSF were usually placed near R-cell somata. Intracellular recordings were performed with a patch pipette in the whole cell configuration from the soma of the cells. The patch pipette (5–10 M Ω) was filled with a potassium gluconate-based intracellular solution (see *Drugs and Solutions*). In some experiments ($n = 14$) for intracellular recordings, sharp electrodes were used (4 M potassium acetate, 60–140 M Ω). Microelectrodes were placed under visual control with a hydraulic micromanipulator (Narishige, Setagaya, Tokyo, Japan). Signals were low-pass filtered at 3.0 kHz, sampled at 10.0 kHz through a Digidata 1322 A (Molecular Devices, San José, CA) and stored in a PC computer for further analysis with the aid of the pClamp programs (Molecular Devices, San José, CA).

Intracellular recordings of electrical activity of PN neurons were performed under current clamp. Long-lasting depolarizing current pulses (800–1,000 ms, 2–4 nA) were injected to explore repetitive firing behavior in both cellular types.

In horizontal brainstem slices, glutamatergic PN afferent fibers were electrically stimulated. Guided by results obtained in previous studies in *G. omarorum* (23), a bipolar stimulating electrode (Nichrome, 75 μm) was placed near the midline over the medial longitudinal fasciculus at a distance of 200–400 μm from the PN in the rostral direction. The ventral portion of this fasciculus is thought to contain descending axons of PPn neurons. Stimuli consisted in short trains of three pulses (3–6 V; 0.02 ms each) at 250 Hz mimicking the discharge of putative PPn neurons responsible for the acceleration of the EOD triggered by the activation of the command neuron for escape behavior (44). Trains were repeated every 10 s. Strength of stimulation was adjusted to produce

transient accelerations of the PN discharge rate which were very similar in amplitude and time course to these EOD accelerations (16, 30). The interval during which the stimulus was applied was called I_0 , and the subsequent interval was designated I_1 . The interval that immediately preceded the stimulation was designated as the “control” interval (or I_c ; see Fig. 6A). Most biological oscillators exhibit differential sensitivity to a brief perturbing stimulus depending on the phase—the time elapsed between the reference rhythmic event immediately preceding the stimulus and the moment of stimulation—at which this stimulus is applied (45, 46). This also holds for the electromotor CPG (47). To allow the comparison of the effects on I_0 of different pharmacological treatments, in our study the phase of stimuli was consistently kept at $\sim 30\%$ of the duration of the control interval.

Micropipettes filled with different solutions of glutamate or its agonists were used to pressure ejection of drugs in transversal slices at the PN (Picospritzer II; General Valve, NY). Pulses of 20 psi and 20–150 ms duration ejected relatively small volumes (5–15 pL) that were calculated from the diameter of microdroplets estimated by inspection of the area of mechanical distortion of tissue provoked by the ejected solution under the $\times 40$ magnification. Ejection of microvolumes was repeated 5 to 10 times with a 20-s interval. The use of small volumes was preferred in order to avoid affecting responses with mechanical artifacts (however, see ahead in this section). Volumes of drugs were selected in order to evoke mild accelerations (range 1–12.5 Hz). The tips of these micropipettes were positioned at different locations within the PN closely to PM- or R-cells somas under visual control (at distances ranging from 30 to 70 μm). In most cases, within the same experiment, similar microvolumes of drug-containing solutions were applied juxtacellularly to PM- and R-cells. In selected experiments, control of drug effects were made by ejecting similar volumes of ACSF at both PM and R-cells. In some cases, rate responses to drugs applied to PM-cells, small and brief sharp increases in the rate coinciding with the pressure delivery of drug-containing solutions were observed. These responses, which were interpreted as being produced by mechanical stimulation of the cells, were still observed in the presence of glutamatergic antagonists and could also be provoked by the injection of ACSF (not shown).

Analysis of Responses

The Clampfit software (pClamp 10) was used to analyze the effect of stimuli on the rate of the spontaneous discharge of the PN. Individual discharges (field potential or intracellular recorded spike) were detected (threshold search) and instantaneous frequency versus time plots of events were constructed. Rate responses were averaged, and peak amplitude was calculated by subtracting the basal spontaneous rate to the highest frequency attained during the responses. The time course of rate responses was quantified by measuring the following parameters: the rise and decay time constants (τ_{RISE} and τ_{DEC} , respectively) by adjusting a single exponential in the rising and the decay phases of responses, and their duration at the half amplitude (half width, HW).

The absence of evident effects of agonists applied to R-cells was confirmed by comparing the mean PN discharge

rate before and after the ejection. For this purpose the rate was averaged for a period of 1 s preceding the stimulus and a period of 5.5 s after the ejection. The duration of the post-ejection period for this analysis was taken based on the typical time course of the rate responses to similar microvolumes of glutamate applied to PM-cells (mean duration of 5.5 s, see RESULTS section).

In intracellular recordings of R-cells, subthreshold membrane potential changes evoked by agonist ejections were explored by comparing the mean minimum potential level (MPL; Fig. 3B) measured before (1-s duration period) and after (5.5-s duration period) the ejection.

Estimation of NMDA and AMPA Components of Responses

The relative contribution of the NMDAR and AMPAR to responses to glutamate ejection or afferent stimulation was estimated by measuring components of the response due to activation of each receptor subtype (NMDA_{comp} and AMPA_{comp}). For responses evoked by PPN axon stimulation, the magnitude of each component was estimated by a point-by-point subtraction of responses obtained before and during the perfusion of a selective glutamate receptor antagonist (CNQX or AP5, see for an example Fig. 6). For agonist-induced rate responses, peak amplitude of each component was calculated by subtracting the peak amplitude of the responses evoked before and during perfusion of the specific blocker. In both cases, for estimation of the NMDA receptor-dependent component, the formula was as follows:

$$\text{NMDA}_{\text{comp}} = \text{peak amplitude}_{\text{pre AP5}} - \text{peak amplitude}_{\text{post AP5}}$$

and for the AMPA receptor-dependent component,

$$\text{AMPA}_{\text{comp}} = \text{peak amplitude}_{\text{pre CNQX}} - \text{peak amplitude}_{\text{post CNQX}}$$

Once the magnitude of each component was obtained, the NMDA to AMPA ratio of responses was calculated as:

$$\text{NMDA/AMPA ratio} = \frac{\text{NMDA}_{\text{comp}}}{\text{AMPA}_{\text{comp}}}$$

Usually, CNQX and AP5 were added sequentially to the perfusion solution (as illustrated in Fig. 6B for example) in such a way that rate responses were evaluated under one or both glutamatergic blockers. The order in which they were added to the perfusion solution (with either CNQX or AP5 as the first blocker applied) depended on the specific experimental design.

The dependence of the NMDA/AMPA ratio on the order of administration of blockers was estimated by calculating the order dependence index (OD index) as follows:

$$\text{OD index} = \left(\frac{\text{mean NMDA/AMPA ratio seq. 2}}{\text{mean NMDA/AMPA ratio seq. 1}} \right) - 1$$

where seq. 1 corresponds to the CNQX → CNQX + AP5 sequence when AP5 was added to the ACSF containing CNQX and seq. 2 to the AP5 → AP5 + CNQX sequence obtained by adding CNQX to a solution that contains AP5. If

the mean NMDA/AMPA ratio is independent of the sequence:

$$\text{NMDA/AMPA ratio seq. 1} \cong \text{NMDA/AMPA ratio seq. 2}$$

then

$$\frac{\text{NMDA/AMPA ratio seq. 2}}{\text{NMDA/AMPA ratio seq. 1}} \cong 1 \text{ and the OD index} \cong 0.$$

Drugs and Solutions

ACSF solution contained (in mM): 124 NaCl, 3 KCl, 0.75 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 24 NaHCO₃, 10 D-Glucose, 1.6 CaCl₂, pH 7.2–7.4 after saturation with carbogen (29), and NaCl was substituted with 213 sucrose in ACSF-sucrose solution. Mg²⁺-free solution was obtained by substituting the MgSO₄ (1.2 mM) of the ACSF-solution with CaCl₂, increasing its concentration to 2.8 mM. Intracellular solution in patch pipettes contained (in mM): 140 K-gluconate, 0.2 EGTA, 4 ATP-Mg, 10 HEPES, pH 7.3. Effects of the following substances applied juxtacellularly (dissolved in ACSF solution) were investigated: L-glutamic acid (glutamate, 10 mM), NMDA (50 μM), AMPA (50 μM), and trans-(±)-1-amino-1,3-cyclopentanedicarboxylic acid (trans-ACPD, 500 μM), an agonist for metabotropic glutamate receptors (mGluR). Glutamatergic antagonists (±)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5; 50 μM), ifenprodil (10 μM), 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, 20 μM), and (±)-amino-4-carboxy-methyl-phenylacetic acid (MCPG, 600 μM) for NMDAR, NMDAR-containing GluN2B subunits, AMPAR, and mGluR subtypes, respectively, also were dissolved in the ACSF solution, and perfused during at least 30 min. During afferent stimulation experiments, ACSF contained picrotoxin (100 μM) to block GABAergic inputs to the PN that could be recruited by the electric stimuli. These substances were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO) or Tocris Bioscience (Bristol, UK).

Statistical Analysis

In this study, *n* represents the sample size of the dataset for each experimental condition. All data are presented as mean ± standard deviation (SD) and were statistically processed using the Past software (48). Once subjected to the Shapiro–Wilk normality test, Student *t* test and paired *t* test were used for independent and paired variables, respectively. For data sets with nonnormal distribution, the nonparametric statistical tests Mann–Whitney *U* test and Wilcoxon test, for independent and paired variables, respectively, were used. To preserve visibility of the figure panels, significance levels of <0.05 and <0.01 are marked by one or two asterisks, respectively. The absence of statistical significance is indicated by n.s. (nonsignificant). Along the text, absolute *P* values are reported. For estimation of SD of the OD index by computing the mean ± SD of NMDA/AMPA ratios as input values, the Gaussian algorithm of error propagation of a quotient was used.

RESULTS

The PN was spontaneously active in vitro and discharged rhythmically with a mean rate of 18.5 ± 3.7 Hz, values which fall within the range of EOD rates observed in resting behaving diurnal fish (15–25 Hz). A representative example of

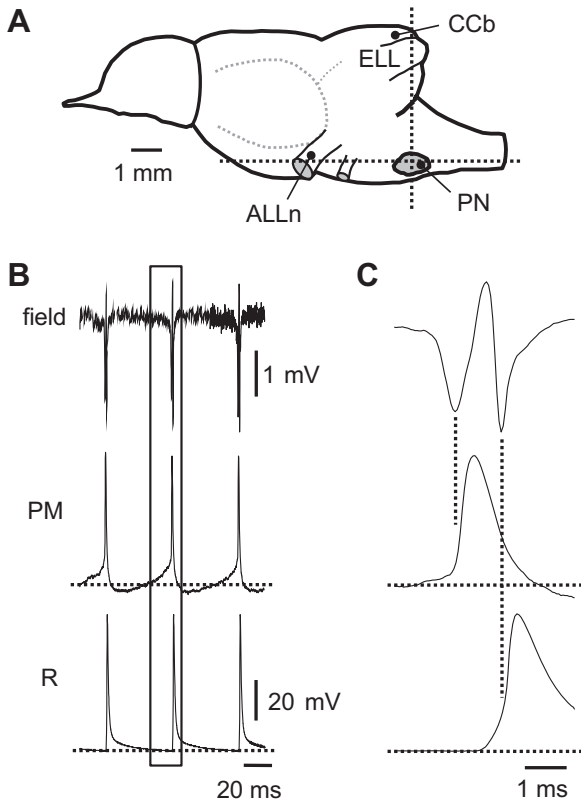


Figure 1. Rhythmic activity of the PN in vitro. **A:** schematic drawing of a lateral view of the brain of *Gymnotus omarorum*. Anterior lateral line nerve (ALLn), corpus cerebelli (CCb), electrosensory lateral line lobe (ELL), and the approximate location of the PN were included in the scheme as references. The dotted lines represent the levels at which the brainstem was sectioned to obtain 400- μ m-thick transverse (vertical line) and horizontal (horizontal line) slices containing the PN. **B:** recordings of the PN spontaneous rhythmic activity in a transverse slice. *Field:* field potential recording of the PN obtained near PM-cells. *PM,* intracellular recording of a PM-cell. *R,* intracellular recording of an R-cell. Paired recordings of the PN field potential and of the transmembrane potential of either a PM- or a R-cell were obtained and traces were aligned taking the field potential of each pair as a temporal reference. **C:** details of discharges shown in **B** (boxed region) displayed at a faster sweep speed showing the temporal correlation between extracellular and intracellular events. *Top:* field potential. *Middle:* PM-cell spike. *Bottom:* R-cell spike. The peak of the first and second negativity of the PN spontaneous field potential correlates with the rising phase of the action potential of the PM- and the R-cell (vertical dotted lines). In **B** and **C**, a membrane potential of -70 mV is indicated in traces of PM- and R-cells by dotted lines. PM-cells, pacemaker cells; PN, pacemaker nucleus; R-cells, relay cells.

simultaneous recordings of the spontaneous extracellular field potential and intracellular activity of either a PM- or a R-cell is shown in Fig. 1*B*. The temporal correlation of the recorded electric events (Fig. 1*B* and *C*) shows that the normal sequence of activation is conserved in vitro, i.e., synchronous activation of PM-cell drives the synchronous discharge of R-cell in a 1 to 1 manner. The amplitude and waveform of field potentials recorded near PM-cells (Fig. 1*C*, *top*) and the timing of PM- and R-cell activity is also preserved when compared to in vivo results. In addition, the spike of PM-cells preceded the spike of R-cells in ~ 0.9 ms, a similar delay to that reported in vivo (16). In intracellular recordings, PM-cells showed an unstable membrane potential with a prolonged “pacemaker potential,” a slow depolarization preceding the spike onset (Fig. 1*B*, *PM*). The action

potential of R-cells, in contrast, rose abruptly from the baseline membrane potential (Fig. 1*B*, *R*). Characteristically both types of neurons also differed in their responses to long-lasting depolarizing suprathreshold pulses (Fig. 2). PM-cells usually responded with a single action potential at the onset of the current pulse (arrowhead in Fig. 2*A*) irrespective of its amplitude. In contrast, suprathreshold depolarizations of R-cells evoked repetitive high rate small amplitude discharges without any detectable high frequency adaptation (Fig. 2*B*). The above data indicate that the in vitro slice preparation preserves the electrophysiological properties of PM- and R-cells and intrinsic network organization of the PN.

Effects of Glutamate Agonists on R-Cells

In this series of experiments, the sensitivity of R-cells to juxtacellular application of glutamate, AMPA, and NMDA (Fig. 3*A*) was assessed. In addition to spike rate, the presence of subthreshold responses to ionotropic glutamate receptor agonists was specifically explored by recording the membrane potential of R-cells during agonist application.

Figure 3*B* illustrates a representative recording of an R-cell obtained before and after the application of a microvolume of glutamate. In the example, there were no evident changes either in the MPL or in the spike rate after glutamate application. However, in some experiments (4 out of 6 experiments), a transient and small (at most 0.8 mV) depolarizing change in the MPL was observed. The mean MPL measured before and after glutamate applications was -73.2 ± 2.9 mV and -72.9 ± 3.1 mV, respectively ($n = 6$, paired t test, $P = 0.027$). Although these values were slightly

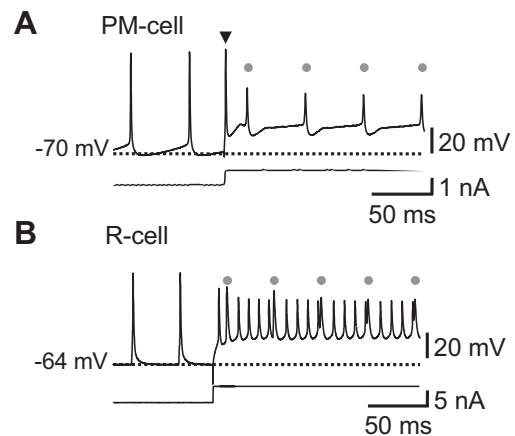


Figure 2. Main electrophysiological features of PN neurons. **A:** PM-cell, intracellular recording of a PM-cell obtained before and during a long-lasting depolarizing current step (*bottom* trace). Before current injection, spontaneous rhythmic action potentials are preceded by a slow depolarizing trend (pacemaker potential). Typically, suprathreshold current pulses evoke a single action potential at the onset of the stimulus (black arrowhead) while, although reduced in amplitude and with altered waveform, the regular rhythmic action potential can be still observed during the depolarization (gray dots) discharging at almost the same pre-ejection rate. **B:** R-Cell, same as **A** but recording was obtained from an R-cell. Spontaneous pre-ejection action potentials arise abruptly from a stable basal membrane potential. Depolarization evokes the repetitive discharge of low amplitude action potentials at a relatively high rate superimposed to the ongoing regular rhythmic discharge driven by pacemaker neurons (gray dots). Numbers at the left of each recording show the membrane potential of cells indicated by the dotted lines. PM-cell, pacemaker cell; PN, pacemaker nucleus; R-cell, relay cell.

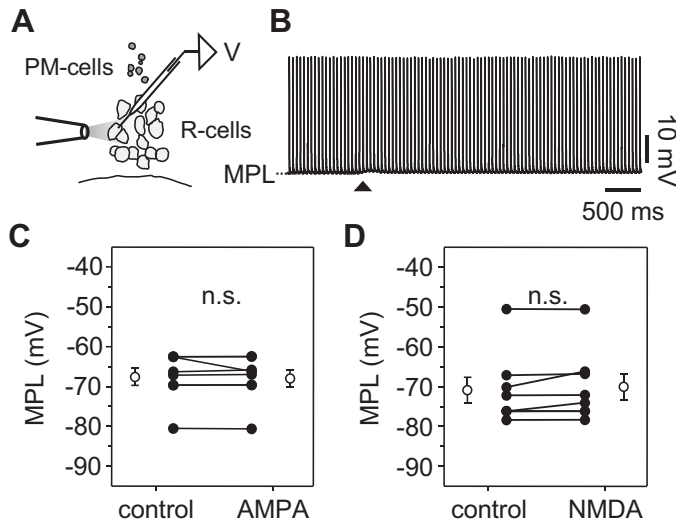


Figure 3. Effects of pressure-applied glutamate agonists on R-cells. *A*: schematic drawing of a transverse section of the PN illustrating a drug-containing micropipette for pressure ejections (at left) and the location of the recording electrode (*V*). *B*: intracellular recording of an R-cell before and during the response to glutamate ejection (10 mM, 20 ms, 20 psi, black arrowhead). MPL at left indicates the minimum potential level before Glu ejection. *C*: connected dot plots of the averaged MPL before (control) and after the juxtacellular ejection of a microvolume of AMPA (50 μ M). Each dot pair represents a particular experiment. Mean \pm SD of MPL values are represented by white circles ($n = 8$; Wilcoxon test; $P = 0.547$). *D*: same as *C* but illustrating the effect of NMDA (50 μ M, $n = 8$; Wilcoxon test; $P = 0.148$). AMPA, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; MPL, minimum potential level; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; n.s., not significant; PM-cells, pacemaker cells; PN, pacemaker nucleus; R-cells, relay cells.

different, in two experiments the small change in the MPL provoked by glutamate persisted after 30 min of bath application of glutamate receptor blockers suggesting its artifactual nature (not shown). The spike rate of R-cells was not modified by glutamate being 20.2 ± 1.8 Hz and 20.2 ± 1.8 Hz, before and after injection, respectively ($n = 6$, paired *t* test, $P = 0.055$). In line with these results, neither AMPA nor NMDA injections provoked changes in the MPL (Fig. 3, *C* and *D*). The mean MPL measured before and after agonists applications were -67.6 ± 2.1 mV and -68.0 ± 2.0 mV, respectively ($n = 8$, Wilcoxon test, $P = 0.547$) for AMPA and -70.9 ± 3.2 mV and -70.0 ± 3.2 mV, respectively ($n = 8$, Wilcoxon test, $P = 0.148$) for NMDA. Spike rate was not affected by agonists being 29.4 ± 1.4 Hz and 29.4 ± 1.4 Hz before and after ejections of AMPA, respectively ($n = 8$, Wilcoxon test, $P = 0.461$) and 20.7 ± 1.5 Hz and 21.0 ± 1.6 Hz, before and after ejections of NMDA, respectively ($n = 8$, Wilcoxon test, $P = 0.063$).

Effects of Glutamate Agonists on PM-Cells

Juxtacellular application of microvolumes of glutamate and its agonists to PM-cells systematically provoked transient accelerations (mean duration 5.5 ± 3.4 s) of PN discharges (Fig. 4*A*). Glutamate-evoked accelerations were on average 8.79 ± 3.2 Hz ($n = 10$) which correspond to an increase of $35.21 \pm 5.67\%$ relative to the basal pre-ejection rates and consistently associated with slow, low amplitude depolarization of PM-cell's MPL of at most 2.3 mV (1.34 ± 0.77 mV; Fig. 4*B*, inset). Representative examples of PN rate responses

evoked by pulse application of ionotropic and metabotropic glutamate receptors specific agonists to PM-cells are illustrated in Fig. 4, *C–E*. AMPA evoked rate increases of 2.1 ± 1.1 Hz ($n = 8$) which represents an increase of $10.9 \pm 4.4\%$ relative to the basal pre-ejection rate (Fig. 4*C*). AMPA rate responses were reduced by $98.7\% \pm 2.47$ ($n = 8$) by CNQX (20 μ M, Fig. 4*C*, gray circles). Rate responses to NMDA (Fig. 4*D*) reached peak amplitudes of 3.0 ± 1.9 Hz ($n = 10$) which correspond to an increase of $14.7 \pm 10.3\%$ of the basal pre-ejection rate. Bath application of AP5 (50 μ M) reduced the rate responses to NMDA by $47.5 \pm 29.7\%$ ($n = 7$, Fig. 4*D*, gray circles). The rate responses to NMDA were characteristically slower than those evoked by AMPA. Rise time constants of the responses to NMDA were significantly higher than to AMPA (NMDA 356.8 ± 78.0 ms, $n = 8$; AMPA 199.6 ± 100.9 ms, $n = 7$; Wilcoxon test, $P = 0.015$). Decay time constants of the NMDA responses were also significantly greater than those of the AMPA responses (NMDA $7,511.09 \pm 3,954.19$ ms, $n = 8$; AMPA $3,705.60 \pm 2,626.21$ ms, $n = 7$; Student *t* test, $P = 0.04$). However, although responses to NMDA were consistently slower than to AMPA their half width were not statistically different (NMDA $6,648.2 \pm 5,577.93$ ms, $n = 8$; AMPA $3,125.4 \pm 2,077.88$ ms, $n = 7$; Mann–Whitney *U* test, $P = 0.195$).

Metabotropic glutamate receptors (mGluR) of PM-cells have been described in vivo as modulators of the PN discharge rate in *G. omarorum* and their contribution to the organization of slow and long-lasting EOD modulations has been suggested (30). Juxtacellular ejection of microvolumes of the mGluR agonist *trans*-ACPD (500 μ M) to PM-cells characteristically caused slow and long-lasting increases in PN discharge rate (Fig. 4*E*) that closely resembled those observed in vivo. The rate response exhibited two components: a relatively fast and early peak followed by a delayed sustained component (~ 1 Hz, 70 s; $n = 3$). Under MCPG (600 mM), a broad spectrum mGluR antagonist, the slower component of the rate responses was partially blocked and their peak amplitudes were reduced by $\sim 53\%$ of control responses ($n = 2$, Fig. 4*E*, gray circles).

To test whether only-NMDA synapses on PM-cells implicated in several well-known electromotor behaviors involve receptors containing subunits of the GluN2B type, we explored the effect of ifenprodil (10 μ M), a specific blocker of this type of NMDAR, on the rate responses to glutamate (Fig. 5). As illustrated in the example in Fig. 5*A*, average peak amplitudes and decay time constants were practically unaffected by ifenprodil, being $97.1 \pm 9.3\%$ and $102.9 \pm 16.1\%$, respectively, from control rate responses (Fig. 5*B*). These values were not different from control (Wilcoxon test, $n = 6$, $P = 0.563$ and $P = 0.25$ for amplitude and decay time constant, respectively). Despite this lack of effect, ifenprodil produced robust and reversible modifications of other variables: overall field potential amplitude was decreased, amplitude of action potential recorded intracellularly was reduced, and PN rate was slightly but consistently decreased ($3.0 \pm 3.1\%$). All changes were reverted after a 90- to 120-min washout.

Effects of Electric Stimulation of Glutamatergic Afferents on the Activity of the PN

We next explored the effect of activating ionotropic glutamate receptors of PM cells under conditions closer to a

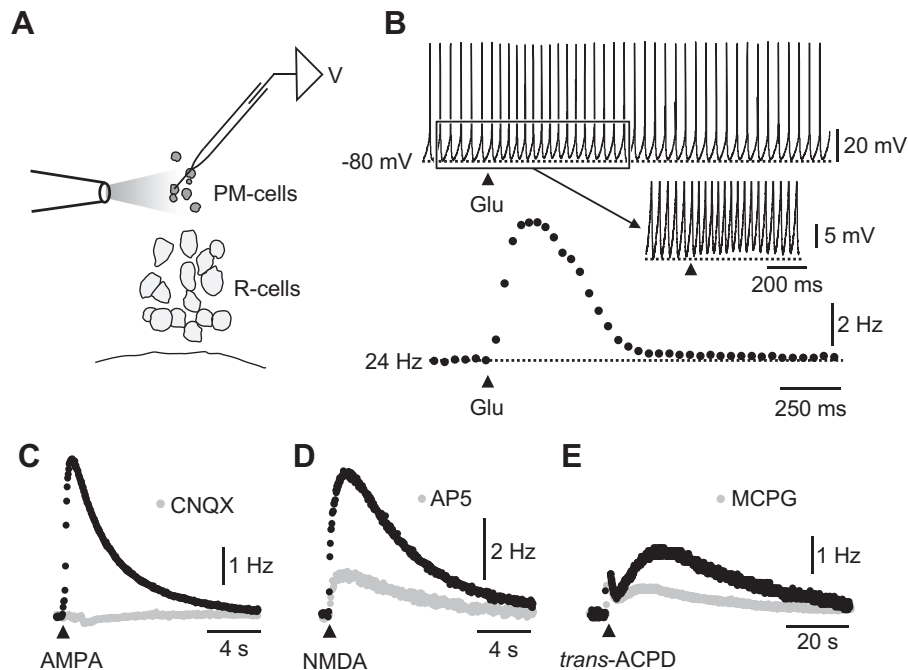


Figure 4. Effects of pressure-applied glutamate agonists on PM-cells. *A*: schematic drawing of a transverse section of the PN illustrating a drug-containing micropipette for pressure ejections (at left), the somas of PM- and R-cells, and a micropipette for intracellular recording of a PM-cell (*V*). *B*: changes in the membrane potential and in the discharge rate of PM-cells in response to glutamate. *Top*: intracellular recording of a PM-cell before and after the juxtacellular ejection of a microvolume of glutamate (10 mM, 20 psi, 20 ms, black arrowhead) obtained according to *A*. The number at left indicates the membrane potential indicated by the dotted line. Part of the response (boxed region) is illustrated in the *inset* below at a higher gain and a slower sweep speed to better illustrate the small depolarization that accompanies the acceleration of discharges. *Bottom*: instantaneous frequency versus time plot of PM-cell discharges recorded in the *top* trace. Number at the left of the plot indicates the basal pre-ejection PN rate indicated by the dotted line. *C*: rate responses of PN discharges before and after juxtacellular application of a microvolume of AMPA (50 μ M, 150 ms, 20 psi) in ACSF (black circles) and after the perfusion of ACSF containing CNQX (20 μ M, gray circles). *D*: same as *C* but applying NMDA (50 μ M, 200 ms, 20 psi). The response in ACSF (black circles) and after adding AP5 (50 μ M, gray circles) to the ACSF are illustrated. *E*: same as *C* but applying trans-ACPD (500 μ M, 20 psi, 130 ms). The response in ACSF (black circles) and under perfusion of MCPG solution (600 μ M, gray circles) are depicted. In *C*, *D*, and *E*, the black arrowhead indicates the moment of ejection of drugs. *B*, *C*, *D*, and *E* are from different experiments. ACSF, artificial cerebrospinal fluid; AMPA, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; AP5, (\pm)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid; CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione; Glu, glutamate; MCPG, (\pm)-amino-4-carboxy-methyl-phenylacetic acid; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; PM-cells, pacemaker cells; PN, pacemaker nucleus; R-cells, relay cells; trans-ACPD, trans-(\pm)-1-amino-1,3-cyclopentanedicarboxylic acid.

natural physiological context by electrically activating its innervation fibers. The strength of stimulation was adjusted to produce transient accelerations of the PN discharge (Fig. 6, *A* and *B*, *top*) which were very similar in amplitude to EOD modulations triggered by the activation of the command neuron for escape behavior (16, 23, 30). Rate responses typically peaked at the interspike interval I_1 (see METHODS), although in some cases the maximum acceleration was observed in I_0 . Overall, the mean peak amplitude of responses was 9.9 ± 6.2 Hz and represented an increase of $59.0 \pm 29.3\%$ with respect to the prestimulus PN discharge rate. The peak of the responses was followed by a slow return to the prestimulus rate with a time constant (τ_{DEC}) of 109.6 ± 26.8 ms ($n = 14$).

The amplitude and the time course of accelerations of the PN discharge evoked by activation of PPN axons were specifically affected by ionotropic glutamate receptor blockers (Fig. 6*B*). Blocking NMDAR with AP5 (50 μ M) reduced the amplitude and the duration of the response (Fig. 6*B*, *middle*) and the remnant acceleration was further reduced by blocking AMPARs through the addition of CNQX (20 μ M) to the ACSF (Fig. 6*B*, *bottom*). The representative example shown in Fig. 6*C* illustrates the procedure followed to estimate the relative

contribution of PM-cell NMDAR and AMPARs to the rate response evoked by electrical stimuli. The point-by-point subtraction of the AP5 response from the control response allowed us to estimate the AP5-sensitive component of the acceleration likely due to the activation of NMDAR (NMDA_{comp}, Fig. 6*C*, *top*). In turn, subtraction of the response obtained after AP5 and CNQX from the AP5 response reveals the component due to the activation of AMPARs (AMPA_{comp}, Fig. 6*C*, *middle*). Characteristically, the NMDA and AMPA components differed in their contribution to the total increase in the rate of the PN discharge evoked by activation of PPN axons. In average, activation of NMDAR contributed with a $45.5 \pm 19.1\%$ and AMPAR with a $30.4 \pm 5.9\%$ of the peak amplitude of the rate response ($n = 5$, Fig. 6*D*, *right bars*). NMDA and AMPA components also differed in their duration and time course (Fig. 6*C*, *bottom*). The AMPA_{comp} typically peaked during I_0 and exhibited a faster time course than the NMDA_{comp} which reached its maximum during I_1 and showed a larger duration. As expected by the different time course of both components, blockers affected the amplitude of the responses at I_0 and I_1 to a different extent. The ratio of the amplitude of the response (AR) at I_1 and I_0 (AR_{I1}/AR_{I0}) was reduced by AP5 (from 0.77 ± 0.77

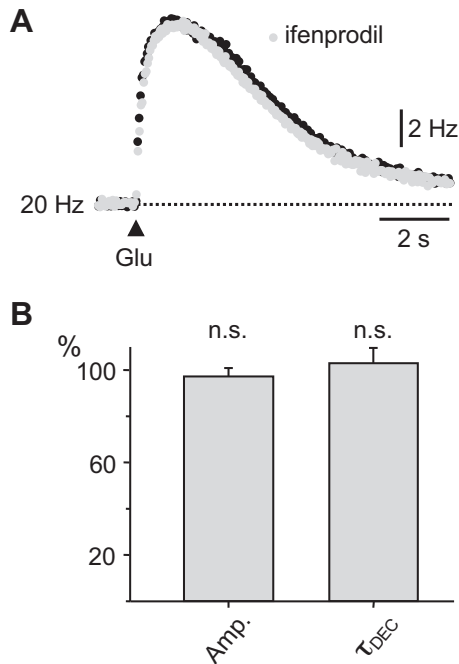


Figure 5. Effects of ifenprodil on rate responses to pressure-applied glutamate. *A*: rate responses to glutamate (10 mM, 20 psi, 60 ms, black arrowhead) obtained in ACSF (black circles) and after 15 min under ifenprodil (10 μ M, gray circles). *B*: summary data (bar chart, mean \pm SD, $n=6$) of the effects of ifenprodil on the peak amplitude (Amp.) and the decay time constant (τ_{DEC}) of rate responses plotted as percentages of their respective control values (Wilcoxon test, $P = 0.563$ and $P = 1.000$, respectively). ACSF, artificial cerebrospinal fluid; Glu, glutamate; n.s., not significant.

to 0.49 ± 0.32 , Wilcoxon test, $n = 5$, $P = 0.055$), whereas the ratio was increased by CNQX (from 1.78 ± 1.37 to 2.85 ± 2.57 , paired t test, $n = 8$, $P = 0.013$). Consistently, under AP5 and CNQX, a small (10%–26%) increase in the PN discharge rate in response to PPN axons stimulation was still observed (Fig. 6*B*, bottom).

The above data demonstrate that NMDAR and AMPAR of PM-cells are activated by glutamate released from electrically activated innervating fibers. However, these data are not optimal for assessing whether postsynaptic effects due to NMDAR activation are dependent on AMPAR activation as it normally occurs at AMPA-NMDA transmitting glutamatergic synapses. If this was indeed the case, the magnitude of the $NMDA_{comp}$ (AP5-sensitive) would depend on the specific order in which ionotropic glutamate receptor blockers were added to the bathing solution. We reasoned that if part of the NMDAR-mediated response was strictly dependent on the activation of AMPARs of PM-cells (coactivation of colocalized AMPAR and NMDAR), the magnitude of the $NMDA_{comp}$ would be smaller when AP5 was added to the ACSF containing CNQX (CNQX \rightarrow CNQX + AP5 sequence) compared to the one obtained adding CNQX to a solution that contains AP5 (AP5 \rightarrow AP5 + CNQX sequence).

To test this possibility, we carried out a series of experiments to estimate the NMDA and AMPA components of rate responses in different conditions. In the first experiment AP5 was added to the slice which was being perfused with CNQX (indicated as CNQX \rightarrow CNQX + AP5) and in the second experiment CNQX was added to the slice that was being

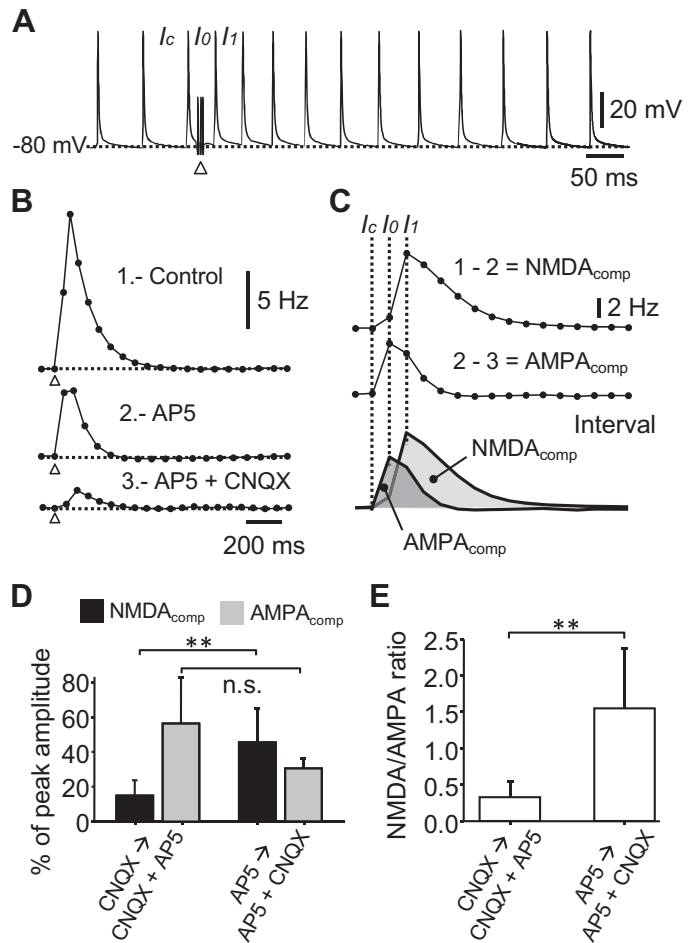


Figure 6. Effect of the sequence of application of blockers on the magnitude of $NMDA_{comp}$ and $AMPA_{comp}$ of rate responses to synaptically released glutamate. *A*: intracellular recording of a R-cell obtained before and after the stimulation of afferent fibers to the PN (3 stimuli @ 250 Hz) in ACSF. The interval at which the stimulus is applied (I_c), the control interval, and is followed by the interval at which the amplitude of rate responses usually reaches its maximum (I_l). The number at left represents the membrane potential indicated by the dotted line. *B*, top: plot of instantaneous frequency vs. time of the recording illustrated in *A* (1.- Control). Middle: plot of the rate response obtained after adding AP5 (50 μ M) to the ACSF (2.- AP5). Bottom: plot of the rate response obtained after adding CNQX (20 μ M) to the AP5-containing solution (3.- AP5 + CNQX). The dotted lines represent the prestimulation basal rate of discharge. Top: 14 Hz, middle: 14 Hz, and bottom: 15 Hz. In *A* and *B*, white arrowheads indicate the moment of afferent fibers stimulation. *C*: plots of frequency vs. interval number of the point-by-point subtractions of the plots illustrated in *B*. Top: component of the rate response due to activation of NMDAR ($NMDA_{comp}$) obtained as the plot 1 minus the plot 2. Middle: component of the rate response due to activation of AMPAR ($AMPA_{comp}$) obtained as the plot 2 minus the plot 3. Bottom: $NMDA_{comp}$ (light gray) and $AMPA_{comp}$ (dark gray) superimposed in order to compare their respective time courses. Identification of intervals I_c , I_0 , and I_l are indicated as vertical dotted lines as a reference. *D*: bar plots of the mean (\pm SD) $NMDA_{comp}$ (black) and $AMPA_{comp}$ (gray) estimated by adding the blockers to the ACSF following the sequence CNQX \rightarrow CNQX + AP5 ($n=7$) and the sequence AP5 \rightarrow AP5 + CNQX ($n=5$). $NMDA_{comp}$ (Student t test, $P = 0.004$) and $AMPA_{comp}$ (Mann-Whitney U test, $P = 0.149$). *E*: bar plot of the mean (\pm SD) $NMDA/AMPA$ ratio calculated from data represented in *A* for the CNQX \rightarrow CNQX + AP5 sequence and the AP5 \rightarrow AP5 + CNQX sequence ($n=7$ and $n=5$, respectively, Mann-Whitney U test, $P = 0.005$). ACSF, artificial cerebrospinal fluid; AMPA, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; AP5, (\pm)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid; CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; n.s., not significant; PN, pacemaker nucleus; R-cell, relay cell. **Significance level of <0.01 .

perfused with AP5 (AP5 → AP5 + CNQX). When administration of blockers followed the former sequence, the $NMDA_{comp}$ was indeed smaller than the one estimated with the later sequence (Fig. 6D, black bars). Overall, the mean estimated $NMDA_{comp}$ of responses represented $14.9 \pm 8.8\%$ of the control response when AP5 was added to the ACSF containing CNQX and $45.5 \pm 19.1\%$ when the order was inverted ($n = 7$ and $n = 5$, respectively, Student t test, $P = 0.004$). The fact that the $NMDA_{comp}$ was consistently smaller under AMPAR blocking by CNQX suggests that part of $NMDA_{comp}$ can be detected if and only if AMPARs of PM-cells are coactivated with NMDAR. The magnitude of estimated $AMPA_{comp}$ was also affected by the order of blocker administration but to a lesser extent (Fig. 6D, gray bars). When blockers were applied following the CNQX → CNQX + AP5 sequence the $AMPA_{comp}$ was $56.3 \pm 26.3\%$ of the control response and was $30.4 \pm 5.9\%$ with the AP5 → AP5 + CNQX sequence ($n = 7$ and $n = 5$, respectively, Mann-Whitney U test, $P = 0.149$). The overall results are summarized in Fig. 6E by comparing the NMDA/AMPA ratios using both sequences of administration of blockers. In experiments applying blockers with the CNQX → CNQX + AP5 sequence the mean NMDA/AMPA ratio was 0.33 ± 0.22 whereas the AP5 → AP5 + CNQX sequence consistently result in larger NMDA/AMPA ratios with a mean value of 1.55 ± 0.82 ($n = 7$ and $n = 5$, Mann-Whitney U test, $P = 0.005$).

Effects of Mg^{2+} -Free ACSF on the NMDA/AMPA Ratio

The above results indicate that at least part of the postsynaptic effects of synaptically released glutamate rely on the activation of a subpopulation of NMDAR of PM-cells that needs the simultaneous AMPAR-mediated depolarization to relieve its Mg^{2+} blockade, as in most other glutamatergic synapses (49–52). According to this model, we hypothesized that the dependence of NMDA/AMPA ratio on the order of administration of glutamatergic blockers should not be observed (or would be greatly reduced) if similar experiments were performed using ACSF that does not contain Mg^{2+} (nominally Mg^{2+} -free). We predicted that this modified ACSF may cause a permanent relief of Mg^{2+} blockade allowing the expression of the full $NMDA_{comp}$ of rate responses regardless of the order of blockers administration.

During preliminary experiments we noticed that the absence of Mg^{2+} (equimolarly substituted by Ca^{2+}) in the medium increased the synaptic efficacy (most probably through a presynaptic mechanism; Ref. 53) in addition to inducing changes in the magnitude of estimated NMDA and AMPA components. Consequently, to avoid a possible synaptic interfering factor, the hypothesis stated above was tested on the rate responses evoked by local application of glutamate to PM-cells instead of those provoked by electrical stimulation of glutamatergic inputs. For estimation of both components in these experiments only responses with time to peak of ~500 ms (or less) were computed in consideration of the theoretical time course of activation of different subtypes of glutamatergic receptors predicted by the diffusion model detailed in the APPENDIX.

The representative example illustrated in Fig. 7A shows the effect of the CNQX → CNQX + AP5 sequence on the rate-responses evoked by application of glutamate at PM-cells. As

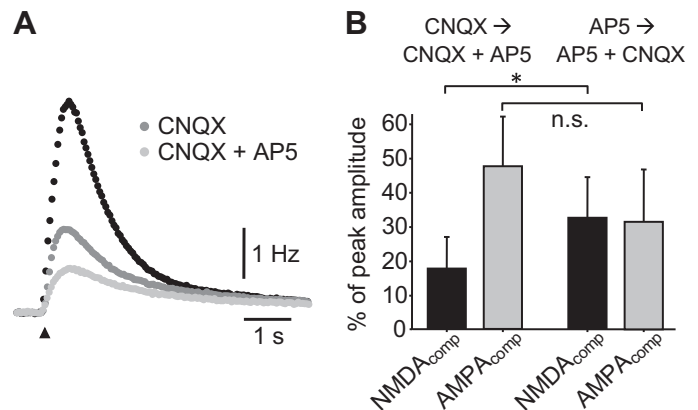


Figure 7. Effect of the sequence of application of blockers on the magnitude of $NMDA_{comp}$ and $AMPA_{comp}$ of rate responses to pressure-applied glutamate. **A:** superimposed plots of the instantaneous frequency vs. time of the rate responses to glutamate applied juxtacellularly to the PM-cells obtained before (black circles) and after adding CNQX (20 μ M) to the ACSF (CNQX, dark gray circles) and after adding AP5 (50 μ M) to the CNQX-containing ACSF (CNQX + AP5, light gray circles). The black arrowhead indicates the moment of glutamate ejection. **B:** bar plots of the mean (\pm SD) $NMDA_{comp}$ (black) and $AMPA_{comp}$ (gray) estimated by adding the blockers to the ACSF following the sequence CNQX → CNQX + AP5 (left pair of bars, $n = 7$) and the sequence AP5 → AP5 + CNQX (right pair of bars, $n = 5$). $NMDA_{comp}$ (Student t test, $P = 0.043$) and $AMPA_{comp}$ (Student t test, $P = 0.093$). ACSF, artificial cerebrospinal fluid; AMPA, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; $AMPA_{comp}$, component of the rate response due to activation of AMPA receptor; AP5, (\pm)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid; CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione; NMDA, N-methyl-D-aspartate; $NMDA_{comp}$, component of the rate response due to activation of NMDA receptor; n.s., not significant; PM-cells, pacemaker cells. *Significance level of < 0.05 .

observed with rate responses to electrical activation of glutamatergic inputs, the magnitude of estimated NMDA and AMPA components of responses to glutamate application also depended on the order of administration of blockers (Fig. 7B). Overall, the mean estimated $NMDA_{comp}$ of responses represented a $17.7 \pm 9.2\%$ of the control response when AP5 was added to the ACSF containing CNQX and $32.5 \pm 11.9\%$ when the order was inverted ($n = 5$ and $n = 7$, respectively, Student t test, $P = 0.043$) and the mean estimated $AMPA_{comp}$ under the two conditions were $47.6 \pm 14.44\%$ and $31.5 \pm 15.1\%$ of responses, respectively ($n = 5$ and $n = 7$, respectively, Student t test, $P = 0.093$). The NMDA/AMPA ratio differed with the order of administration of blockers (Fig. 8A) and the difference was greatly reduced during the perfusion of slices with Mg^{2+} -free ACSF (Fig. 8B). In control conditions (Fig. 8A, ACSF containing 1.2 mM Mg^{2+}) the NMDA/AMPA ratio was 0.45 ± 0.34 when the sequence of blockers was CNQX → CNQX + AP5 and was consistently larger with the inverse sequence with a mean value of 1.46 ± 1.20 ($n = 5$ and $n = 7$, respectively, Student t test, $P = 0.10$). In Mg^{2+} -free ACSF, irrespective of the sequence of blockers tested, there was a global increase of the NMDA/AMPA ratio suggesting a significant reduction of the voltage-dependent Mg^{2+} block of the NMDAR. Consistent with this finding, the NMDA/AMPA ratio following the CNQX → CNQX + AP5 approaches the value of the ratio with the AP5 → AP5 + CNQX sequence (1.80 ± 1.05 and 2.06 ± 1.21 ; $n = 4$ and $n = 5$, respectively, Student t test, $P = 0.730$), suggesting a lower dependence on the order of

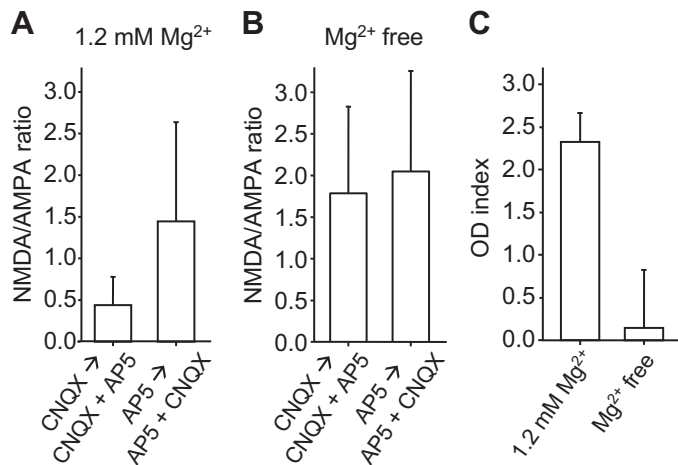


Figure 8. Effects of Mg²⁺-free ACSF on the blockers sequence-dependence of the NMDA/AMPA ratio of rate responses to pressure-applied glutamate. **A:** bar plot of the mean (±SD) NMDA/AMPA ratio in ACSF (1.2 mM Mg²⁺) after adding the blockers following the CNQX → CNQX + AP5 sequence ($n=7$) and the AP5 → AP5 + CNQX sequence ($n=5$; Student t test, $P=0.10$). **B:** same as **A** but in a nominally free Mg²⁺ ACSF (Mg²⁺ free). CNQX → CNQX + AP5 sequence ($n=4$) and the AP5 → AP5 + CNQX sequence ($n=5$; Student t test, $P=0.730$). **C:** bar plot of the OD index (± estimated SD) under the perfusion of control (1.2 mM Mg²⁺) and nominally free Mg²⁺ ACSF (Mg²⁺ free). ACSF, artificial cerebrospinal fluid; AMPA, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; AP5, (\pm)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid; CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; OD index; order dependence index.

application of blockers. This was further evaluated by comparing the OD index estimated in control ACSF with the one obtained in Mg²⁺-free ACSF (Fig. 8C). Under control ACSF (1.2 mM Mg²⁺) the OD index was 2.33 ± 0.34 and was drastically reduced to 0.15 ± 0.68 in Mg²⁺-free ACSF.

DISCUSSION

In this study, we used an *in vitro* reduced preparation of the PN to do an *in depth* electrophysiological and pharmacological analysis of synaptic mechanisms involved in transient neurotransmitter-mediated modulations of the electromotor CPG in *G. omarorum*. Our main findings include the following: 1) PM-cells are endowed with diverse functional glutamate receptor subtypes (NMDA, AMPA, and metabotropic), whereas in R-cells these receptors are absent, a finding that indicates a distinctive, species-specific, distribution of glutamate receptor subtypes on PN neurons; 2) NMDAR of PM-cells are insensitive to specific blockers of receptors containing the GluN2B subunit usually associated with long-lasting postsynaptic effects at only-NMDA synapses, suggesting species-specificity in the mechanisms of control of PN discharge at the molecular level; and 3) synaptically released glutamate by descending inputs to the PN activates both AMPAR and NMDAR subtypes of PM-cells revealing a probable functional role of transmitting AMPA-NMDA synaptic contacts in the control of the electromotor CPG in gymnotiform fish.

R-Cells Lack Glutamate Receptors, Whereas PM-Cell Neurons Express Different Glutamate Receptor Subtypes

In gymnotiform fish, activation of glutamatergic inputs directed to R-cells—the critical component of the patterning

layer of the electromotor CPG—triggers the emission of social electric signals that imply profound modifications of the output pattern due to suprathreshold activation of these cells through NMDAR or AMPAR (25–29, 37). Previous work in *G. omarorum* failed to obtain any evidence suggesting there is direct suprathreshold activation of R-cells by glutamate agonists (22, 30), even though these fish are capable of emitting social electric signals during agonistic encounters with distorted EOD waveform (22, 54). In those studies, however, the role of subthreshold activation of R-cells—which is virtually undetectable during EOD recordings—could not be ruled out. Here, we could analyze that possibility by performing intracellular recordings of R-cells during the juxtacellular application of glutamate agonists to these cells and we show that glutamate, AMPA, and NMDA were indeed ineffective in modifying either its membrane potential or its firing. This demonstrates that R-cells in *G. omarorum* lack functional glutamatergic receptors and provides additional evidence that illustrates the diversity of neural designs for the control of the electromotor CPG that have evolved in gymnotiform fish.

Juxtacellular application of glutamate agonists to PM-cells evoked transient accelerations whose amplitude and time course varied with the specific agonist applied. Our data confirm previous results obtained *in vivo* (30) indicating that, in *G. omarorum*, PM-cells are endowed with AMPAR, NMDAR, and mGluR. In our experiments, accelerations produced by the pressure-applied glutamate represented an increase in the PN discharge rate of ~35% of control basal pre-ejection rates. According to the slight modification of the PN discharge rate caused by the injection of long-lasting depolarizing current pulses (~20 mV depolarization in Fig. 2A), a considerable depolarization during the accelerations caused by glutamate applied to the PM-cells was expected. However, rate responses to pressure applied glutamate consistently associated low amplitude depolarizations of PM-cells of at most 2.3 mV. The apparent discrepancy between the amount of depolarization and the resulting change of the PN discharge rate evoked by glutamate can be reasonably accounted for by the fact that PM-cells are electrotonically coupled (14) and the magnitude of PN rate responses would depend not only on the net effect of the activation of glutamate receptors on the membrane potential of each PM-cell but also on the number of neurons actually activated and the timing of such activation. As proposed by Getting (55), synchronous synaptic inputs to several electrotonically coupled postsynaptic cells (distributed input) may result in an apparent increase in the postsynaptic input resistance and time constant due to an effective reduction in the shunting of current through the junctions. This may lead to a more effective synaptic transmission producing greater postsynaptic effects in the population of coupled cells. At the PN, the more PM-cells receive synchronous depolarizing inputs the greater will be the evoked acceleration of the PN discharge (see APPENDIX). Activation of metabotropic glutamate receptors involving the modulation of a yet unknown membrane conductance involved in the pacemaker discharge but without significantly changing the MPL at PM-cells may be an additional contributing factor.

As expected by the different kinetics of ionotropic glutamate receptor subtypes (41), responses to AMPA were

relatively faster than those to NMDA. Responses to *trans*-ACPD were even much slower than those produced by ionotropic agonists. Evidence indicating the existence of AMPAR and NMDAR in PM-cells in pulse and wave type gymnotiforms has been reported before (17, 26, 27, 31). However, as confirmed in the present work, *G. omarorum* is still the sole gymnotiform species in which pharmacological data suggesting the existence of functional mGluR subtypes in PM-cells has been obtained. Interestingly, recent transcriptomic data showing that metabotropic glutamate receptors 1 to 8 genes are expressed in the brain of *G. omarorum* (G. Valiño, personal communication, Ref. 56) brings additional experimental support to this possibility. In this species, the motor command for the motor escape behavior—a single action potential at one identifiable reticulospinal neuron: the Mauthner cell—triggers an abrupt and prolonged increase of the EOD rate (up to 5 s) thanks to the coactivation of NMDAR and mGluR of PM-cells through a paucisynaptic neural pathway (16, 23, 30, 57). The long duration of this electromotor behavior triggered by a single command action potential seems to exploit the slow kinetics of glutamate receptors involved in the abrupt and long-lasting activation of PM-cells. These long-lasting glutamatergic postsynaptic effects mediated by the activation of NMDAR but without the coactivation of AMPAR (only-NMDA synapses) pointed to a critical role of NMDAR variants with slow kinetics and low voltage dependence in the glutamatergic control of the PN activity. The NMDAR containing GluN2B subunits—an NMDAR variant reported as mediating only-NMDA synaptic contacts—exhibited these distinctive properties (58). In the present study, we show that ifenprodil, a noncompetitive NMDAR antagonist with a high selectivity for the GluN2B subunit (59), was ineffective in modifying both the amplitude or the time course of rate responses to pressure-applied glutamate. This strongly suggests that the NMDAR containing GluN2B subunits are not involved in the glutamatergic control of the PN in this species. In *Apteronotus leptorhynchus*, a related gymnotiform species, molecular and electrophysiological data indicate that GluN2B subunits are expressed in most brain regions including the PN and that these subunit are capable of forming NMDAR whose core functional aspects are similar in fish and in mammals (60, 61). However, *A. leptorhynchus* and *G. omarorum* represent two phylogenetically distant gymnotiform species (62, 63) that may exhibit species-specific differences in the neural underpinnings of electromotor displays as has been found among related gymnotiform species (8). It is therefore reasonable to expect that this diversity also involves the mechanisms of control of PN discharge at the molecular level by expressing different NMDAR subtypes with different functional characteristics.

Although the differences in the kinetics of synaptic currents mediated by AMPAR, NMDAR, and mGluR (41) are consistent with the different time course of rate responses evoked by juxtacellular application of agonists, in our experiments those differences may also be due to other possible contributing factors. In fact, the time course of responses to the pressure-applied glutamate may be influenced not only by the relative contribution of the kinetics of AMPAR-, NMDAR-, and mGluR-mediated postsynaptic currents, but also by the time course of diffusion of

glutamate in the extracellular space and the differences in the EC₅₀ values for glutamate of each receptor subtype (see APPENDIX).

Functional Role of Glutamate via PM-Cells Ionotropic Receptors

The present study reveals, for the first time in pulse-type gymnotiform fish, that synaptically released glutamate consistently activates AMPAR and NMDAR of PM-cells. This is a new finding that demonstrates that AMPARs of PM-cells, which have been described in several gymnotiform species by locally applying glutamate agonists (27, 30), can be activated by glutamate released from synaptic terminals.

It has been reported that an increase in glutamate concentration in the synaptic cleft at silent synapses (only-NMDAR) produced during certain forms of synaptic plasticity or by specific patterns of presynaptic activation may recruit an AMPAR component converting a silent synapse into a functional transmitting one (64). However, the amplitude of the rate responses to synaptically released glutamate observed in the present study suggests that this possibility is unlikely. In fact, the amplitude of these responses are comparable to those elicited in vivo by Mauthner cell activation that provoke a massive recruitment of glutamatergic PPN and even so it is not possible to detect an AMPAR component of rate responses (16, 30). This suggests that the pattern of electrical stimulation of glutamatergic axons used in our experiments—that mimicked the pattern observed during the Mauthner cell-dependent electromotor behavior (see METHODS)—was indeed in the physiological range and provoked rate responses with specific AMPAR components. Moreover, preliminary data obtained in vivo suggest that AMPAR of PM-cells can be recruited by presumed low levels of presynaptic glutamatergic activity. We have observed that resting variability of the EOD interval significantly decreases after the application of CNQX solutions to the PN, suggesting specific spontaneous activation of glutamatergic synapses involving AMPAR (unpublished results).

In this study we found that a substantial part of the total NMDAR-mediated responses (near 67% of the total NMDA_{comp}) is strictly dependent on the activation of AMPARs of PM-cells. This suggests the coactivation of the two receptor subtypes that should be colocalized at the postsynaptic membrane. This interpretation assumes that NMDA receptors were not blocked by CNQX. The fact that the dependence of the NMDA/AMPA ratio of rate responses on the sequence of application of specific blockers (OD index ~ 2.33) is almost absent in nominally Mg²⁺-free ACSF (OD index ~ 0.15) supports the aforementioned idea. Overall, our data suggest that at least part of the postsynaptic effects of synaptically released glutamate rely on the activation of a subpopulation of NMDAR of PM-cells that needs the simultaneous AMPAR-mediated depolarization to relieve its Mg²⁺ blockade. This is a functional trait that characterizes the most classical transmitting glutamatergic synapse (41, 49–52). Despite the large amount of work aimed at characterizing the glutamatergic innervation of the PN in gymnotiform fish (22, 25–34, 36, 37), demonstration of glutamatergic AMPA-NMDA transmitting contacts on PN neurons has remained elusive. The present study is the first report that

provides evidence indicating that the control of the activity of the electromotor CPG in pulse-type gymnotiform fish includes descending PPn axons contacting PM-cells through common transmitting glutamatergic synapses (Fig. 9).

Although the $NMDA_{comp}$ of the rate responses to synaptically released glutamate appears to involve mainly AMPA-NMDA synaptic contacts on PM-cells, there was a significant component of responses (33% of the total $NMDA_{comp}$) that persists under complete AMPAR blockade by CNQX. According to this, for this $NMDA_{comp}$ to be manifest, preceding AMPA-mediated depolarizations are not necessary. This component most probably represents the activation of post-synaptic receptors at only-NMDA synapses. But which could be the mechanism that relieves the blocking by Mg^{2+} of the NMDAR in these synapses? As discussed above, the possibility of the involvement of NMDAR with low voltage-dependence-NMDAR containing GluN2B subunits (58) is unlikely. Two alternative (but not mutually exclusive) mechanisms may account for the apparent low voltage dependence of NMDAR at these synapses. First, only-NMDA synapses in *G. omarorum* may involve receptor variants that may conduct at near resting membrane potentials as described in goldfish Mauthner cell (65) and in the *Apteronotus* electrosensory system, a wave-type gymnotiform fish (66). Second, Mg^{2+} blockade of NMDAR at these synapses may be reduced as PM-cells are spontaneously depolarizing neurons which regularly fire action potentials that may relieve (at least

partially) this blockade. The latter possibility implies that only-NMDAR synaptic contacts would be located at a cellular compartment electrotonically close to the site of generation of action potentials (probably the soma). Classical AMPA-NMDA transmitting synapses, in turn, would be segregated to subcellular locations less affected by the spontaneous rhythmic membrane depolarization, for example, at the thin and long apical dendrite described by Trujillo-Cenóz et al. (67).

The above considerations are based on the estimation of the magnitude of NMDA and AMPA components that were obtained by subtracting the peak amplitude of the responses evoked before and during perfusion of the specific blocker. For those estimations we assumed that AMPAR were not significantly affected by AP5 and that NMDAR were not sensitive to CNQX. Previous results obtained in vivo at the PN of *G. omarorum* indicate that this seems to be indeed the case (see Fig. 6 in Ref. 30). However, a blocking effect of CNQX on NMDAR-mediated synaptic potentials in the electrosensory lateral line lobe (ELL) in *A. leptorhynchus* has been reported (66). This crossed effect of CNQX has been attributed to the expression of a splice variant of the GluN1 subunit of the NMDAR at the ELL in this species that has been shown to confer CNQX sensitivity to NMDAR (68). The expression of this splice variant of the GluN1 subunit in neurons of the CNS of *G. omarorum* is currently unknown. In any case, our previous results (30) and the fact that the concentration of CNQX used in *A. leptorhynchus* ELL is substantially higher than the one used in our study (1 mM vs. 20 μ M, respectively) suggest that unspecific blockade by CNQX of responses mediated by activation of NMDAR of PM-cells in our experiments is unlikely. Differences in molecular and functional properties of NMDAR between both species may be explained by their phylogenetic distance (62, 63). The identification and mapping of splice variants of NMDAR in the PN by in situ hybridization could contribute to understanding species specific circuitual differences which may underlie these different effects.

According to the available evidence, PPn glutamatergic inputs to the PN neurons, which organize most of the behaviorally relevant EOD modulations in Gymnotiformes, likely represent a heterogeneous population of terminals (see for a review, Ref. 17). This population comprises: 1) only-NMDAR synapses on both PM- and R-cells mediating accelerations and sudden interruptions of EODs, respectively, and 2) only-AMPA synaptic contacts on R-cells whose activation is responsible for the emission of chirps (25–27, 29, 32–34, 36). Only-AMPA synapses have also been characterized in mammals (69). In *G. omarorum*, in turn, the glutamatergic control of PN discharges most probably also includes a heterogeneous population of terminals exclusively contacting the PM-cells (Fig. 9). This population includes only-NMDA and AMPA-NMDA synapses although the existence of only-AMPA synapses could not be ruled out. Although activation of only-NMDA synapses underlies the electromotor behavior triggered by the activation of the Mauthner cell (16, 30), the specific EOD modulation mediated by activation of transmitting AMPA-NMDA synaptic contacts has not yet been determined. It is generally accepted that increases in EOD rate result in an enhancement of the electrosensory sampling fish perform of the environment to cope with fast changing

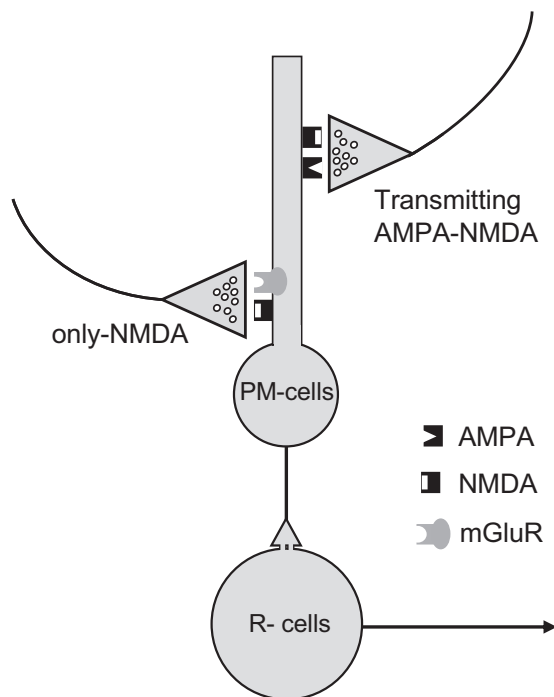


Figure 9. Schematic drawing of the current view of the glutamatergic control of the central component of the electromotor CPG in *Gymnotus omarorum*. Two electrotonically coupled neuronal types, PM-cells and R-cells, and different glutamate receptors subtypes are represented. The diagram summarizes our interpretation of the present data (see DISCUSSION). The key for glutamatergic receptors are depicted in the inset. AMPA, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; CPG, central pattern-generating network; mGluR, metabotropic glutamate receptors; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; PM-cells, pacemaker cells; R-cells, relay cells.

surrounding conditions (23, 70–72). EOD rate can also be modulated to avoid interfering detrimental effects of EODs generated by a nearby conspecific (Jamming Avoidance Response, JAR; Refs. 17 and 73). In pulse-type fish, the interference is avoided by abruptly accelerating the EODs just before the occurrence of a coincident discharge and lasting a few tens of milliseconds (74, 75). Long-lasting increases (seconds) in electrosensory sampling triggered by novel stimuli or during motor activity most probably rely on activation of only-NMDA synapses on PM-cells. AMPA-NMDA synapses, on the other hand, may be involved in the rapid adjustment of the timing of the EOD during the JAR, making the most of the faster kinetic of the AMPAR (76).

Glutamatergic Control of the Electromotor CPG in Comparative Perspective

Overall, our data shed light on the synaptic mechanisms underlying the fast neurotransmitter control of a vertebrate CPG. Although the structure and functional organization of the electromotor CPG in Gymnotiformes is considerably simpler than most vertebrate CPGs involved in other rhythmic behavioral outputs (locomotion for example), many commonalities regardless of the behavior or species or even phylum, can be recognized (1, 77). In what follows, we address four of these commonalities with focus on those related to fast neurotransmitter control mechanisms.

In most vertebrate CPGs, descending glutamatergic control has been implicated in the modulation of both the rhythm and the pattern of the behavioral output (11, 78–81). In line with this, our study demonstrates that descending glutamatergic inputs are critical in the control of the electromotor CPG involving the activation of NMDAR, AMPAR, and mGluR as in most other CPGs.

Rhythm generation in locomotor CPGs is considered as being achieved by a combination of cellular properties and circuit architecture (for a review, see Ref. 79). Pacemaker properties of neurons of the rhythmic layer are conditional on the presence of glutamate and arise mainly from the activation of NMDAR, although in rodents AMPAR have also been proposed to have a role in rhythm generation (82). In Gymnotiformes the electromotor CPG is autorrhythmic and NMDAR of actual pacemaker neurons are involved in transient and relatively slow modulations of the rate of its behavioral output (17, 25, 26, 29, 30). In the present study, we demonstrate that, in *Gymnotus omarorum*, the glutamatergic control of the CPG likely involves both AMPA-NMDA and only-NMDA synapses contacting PM-cells at different cellular compartments. In contrast to what has been reported in mammals, only-NMDA synapses at this CPG are also transmitting synapses and likely involve NMDAR that do not contain GluN2B subunits. Experimental evidence obtained in vivo in *G. omarorum* indicate that these glutamatergic inputs to PM-cells are specifically activated during long-lasting increases in electrosensory sampling during escape behaviors (16, 30). Based on the critical role of NMDAR in rhythm generation in most locomotor CPGs (10, 79), it would be of interest to determine if only-NMDA synapses at putative pacemaker-like interneurons may also be involved in rhythm generation. The voltage dependence of NMDAR appears to be critical in its rhythmogenic capacity (see for a

review Ref. 83). It is reasonable to expect that these only-NMDA synapses involve receptors containing subunits in which this biophysical property is conserved (e.g., GluN1-GluN2).

Peripheral inputs that provide sensory feedback to the locomotor circuitry are important in modulating and adapting CPG-generated motor output to environmental constraints or obstacles by modifying the timing of the rhythm (84). It has been demonstrated that putative rhythmogenic interneurons are innervated by low threshold primary afferents through AMPA-NMDA synapses (85). Activation of these inputs can phasically alter the cycle period of the rhythmic output. Interestingly, in the present study we demonstrate that activation of conventional AMPA-NMDA synapses contacting PM-cells may be involved in the rapid adjustment of the timing of the EOD according to the faster kinetic of the AMPAR. Even though the electromotor CPG differs from locomotor CPGs in that it does not receive direct inputs from the periphery (17), glutamatergic innervation of rhythmogenic neurons through AMPA-NMDA synapses suggests a conserved neural strategy to modify cycle-to-cycle period of rhythmic outputs to rapidly adapt the behavioral output to cope with a fast-changing environment.

In addition to the role of ionotropic glutamate receptors in the transmitter control of locomotor CPGs and their intrinsic connectivity (86), mGluR have been shown to mediate slow and long-lasting effects (10, 87, 88). Metabotropic modulation of the CPG activity by glutamate most likely includes concerted changes in synaptic strength and in electrophysiological properties of neurons within the CPG network. Here, we show that in gymnotiform fish, mGluR are involved in the glutamatergic control of the electromotor CPG. In contrast to its widespread effects in locomotor CPGs, activation of mGluR exclusively increases the rate of PM-cells discharge, most probably, by modulating membrane conductances involved in pacemaker activity (30, 57). Possible effects of mGluR activation on input synapses and electrotonic coupling between neurons of the electromotor CPG remain to be elucidated.

In a comparative perspective, it should be finally highlighted that aside from the commonalities outlined above, locomotor CPGs in most vertebrates and the electromotor CPG in weakly electric fish may have evolved different neural control mechanisms most probably due to their different behavioral outputs (1). In its most basic conception, the locomotor CPG consists of networks coordinating the stereotypic locomotor pattern that implies the activation of the different muscles in the appropriate sequence to organize the movements during each locomotor cycle (10). Descending and peripheral inputs to the CPG contribute critically to adapting the locomotor pattern to different behavioral and environmental demands (78). The electromotor CPG, in turn, has been proposed as a convergence node whose activity has evolved as a compromise between two vital functions: active electroreception and electrocommunication (8). Although active electroreception requires a stereotyped and regular EOD (17), electrocommunication demands a flexible electromotor output, modulating mainly the EOD waveform (but also the rate), which allows the electric dialogue between individuals (8, 27, 89). The accommodation of two competing behavioral demands in a single central pattern-

generating nucleus may have conditioned the evolution of specific control mechanisms. Descending synaptic inputs segregated to the rhythmic or the pattern formation layer of the electromotor CPG (17, 25–29, and present work) and the modulation (by neuropeptides and hormones; Refs. 22 and 24) of those inputs and of neuronal intrinsic properties are apparently at the core of these neural mechanisms. The identification and connectivity of neuronal components of the rhythmic and patterning layers of CPGs in higher vertebrates will be crucial to understand if these mechanisms are indeed specific to weakly electric fish or may represent a more general neural design.

APPENDIX

An accurate knowledge of the time course and the spread in the extracellular space of glutamate (Glu) ejected by pressure greatly facilitates the interpretation of the effects on the discharge rate of the PN obtained by local application of this transmitter as used in some of the above experiments (Figs. 3, 4, 5, and 7).

The spread of Glu in the extracellular space can be estimated by solving the diffusion equation when the boundary conditions are appropriate (90). Since the distance between the tip of the electrode and the membrane of the PM-cells is significantly smaller than the distance between the tip of the electrode and the surface boundaries of the recording chamber, the diffusion process is equivalent to the release of glutamate from a source point into an infinite space. The solution of the diffusion equation with the boundary conditions described above gives the concentration of Glu (C) at any time (t) and the relative position of the electrode tip (r).

Considering the micropipette tip an instantaneous source point of Glu, since the compound is ejected at a relatively short pressure pulse (duration of 50–100 ms), located in an anisotropic medium, the concentration (C) achieved at a certain time (t) is given by:

$$C(t) = Q/8(\pi D^*t)^{1.5} \exp(-r^2/4D^*t) \quad (A1)$$

where Q (μM) is the total amount of glutamate ejected from the pipette, D* is the corrected diffusion coefficient of Glu for a tortuosity (λ) of 1.6 and an available fraction of brain tissue (α) of 0.3 obtained by applying the formula D* = (D/λ²) α (91) and r is the distance at which the concentration is calculated [with the diffusion coefficient (D) of Glu being 5 × 10⁻⁶ cm²·s⁻¹ from Ref. 92).

An example of the time course of Glu concentration after pressure ejection at three different distances from the tip of the ejection pipette is illustrated in Fig. A1.

For calculations illustrated in Fig. A1, the ejected volume of Glu (10 mM) corresponds to the volume of a droplet of 50 μm diameter which is within the range of volumes used in our experiments.

The disparity of the time course of PN rate modulations and the calculated extracellular concentration of Glu at PM-cells membrane suggests that other factors should be taken into account to explain the time course of the responses. Since PM-cells are most likely electrotonically coupled (13, 14, 16), it is reasonable to assume that the total effect of Glu on the PN discharge rate depends on two main factors (55):

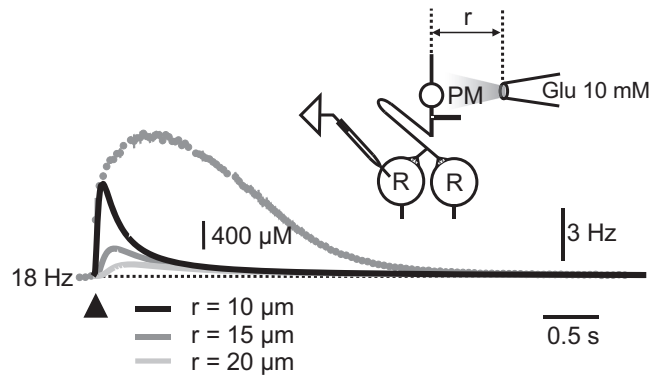


Figure A1. Theoretical calculations of Glu diffusion after juxtacellular pressure application and a representative response of PN discharge rate to Glu obtained during experiments. The inset in the upper right section illustrates a scheme of experimental conditions (PM, pacemaker cell; R, relay cell) that shows a recording micropipette inserted in a relay cell to monitor PN activity during Glu local applications. The superimposed plots indicate the PN discharge rate (gray filled circles) and calculated Glu concentration (lines) at three different distances from the micropipette tip vs. time. Each point of the discharge rate vs. time plot represents the mean (± SD) of 10 average responses to juxtacellular applications of Glu (arrowhead). The dotted line indicates the basal pre-ejection PN discharge rate (number on the left). Glu, glutamate; PN, pacemaker nucleus; r, radius.

- 1) the magnitude of activation at each PM-cell that in turn relies on the concentration of Glu at the pericellular space and on the subtype and density of Glu receptors on the neuronal membrane, and
- 2) the number of neurons activated by Glu and acting on different Glu receptors and on the timing of this activation.

Assuming that the densities of NMDAR, AMPAR, and metabotropic glutamate receptors (mGluR) are almost the same at PM-cells and even ignoring differences in receptor kinetics, it is possible to estimate the time course of the number of cells activated by a given Glu receptors subtype according to their respective EC₅₀ for Glu. This estimation implies the calculation of the spread of glutamate in the extracellular space by defining a theoretical sphere whose surface represents a concentration of Glu that equals the EC₅₀ for a given receptor subtype. For the purpose of calculations, the EC₅₀ for AMPAR (100 μM), NMDAR (3 μM), and mGluR (10 μM) were taken from Traynelis et al. (41).

By rearranging Eq. A1, the time course of the radius of such a sphere can be calculated:

$$r(t) = \{-\ln [EC_{50} \cdot 8(\pi D^*t)^{1.5}/Q] \cdot 4D^*t\}^{0.5} \quad (A2)$$

If the concentration of Glu at the surface of the sphere equals the EC₅₀ for a specific Glu receptor subtype, it can be expected that the sphere contains neurons whose Glu receptors will be activated in a proportion higher than 50% of the available population of this receptor subtype. Neurons located out of this limit could also be activated but under a weak Glu stimulation. Therefore, following the above considerations, the numbers of cells recruited by Glu according to Eq. A2 may represent an underestimation of the total number of cells actually activated.

An example of these calculations is illustrated in Fig. A2.

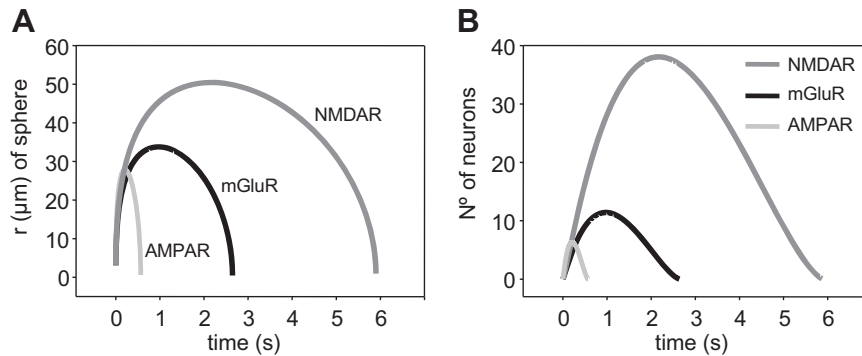


Figure A2. Theoretical estimation of the activation of glutamatergic receptors by the spread of glutamate in the extracellular space. **A:** plots of the radius of spheres limited by an extracellular concentration of Glu that equals the EC_{50} for NMDAR (dark gray), AMPAR (light gray), and mGluR (black) as a function of time. Note that the volume of tissue at which Glu extracellular concentration is able to activate different Glu receptor subtypes varies according to its relative affinity for the neurotransmitter. **B:** plot of the approximate number of cells contained within the limits of spheres illustrated in **A**. For this calculation, each PM-cell was assumed to be spherical (without dendrites or axons) with a diameter of about $25\ \mu\text{m}$ (average diameter of real PM-cells) and to be in contact with neighboring PM-cells. AMPAR, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor; mGluR, metabotropic glutamate receptor; NMDAR, *N*-methyl-D-aspartate receptor; PM-cells, pacemaker cells; *r*, radius.

According to our calculations, a microvolume of Glu (10 mM) applied among the population of PM-cells will differently activate a heterogeneous population of PM-cells which varies with time (see Fig. A2B). Immediately after Glu ejection, during the first 500 ms, a small group of cells (a maximum of 6) will be activated through a combination of AMPAR, NMDAR, and mGluR. In contrast, 1s after ejection ($t = 1$) a significant number of PM-cells will be activated only through NMDAR and mGluR and, surprisingly, at $t = 2.5$ an even more numerous group of PM-cells will be recruited, almost exclusively, via activation of NMDAR subtypes. This spatial sequence of PM-cells recruitment through different combinations of Glu receptor subtypes may explain, at least partially, the disparity of the time course of the effect of Glu on the rate of PN discharge and the extracellular concentration of Glu illustrated in Fig. A1.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Ana Silva and Laura Quintana for their generous comments on a preliminary version of this article.

GRANTS

This research was supported by Programa de Desarrollo Tecnológico (PDT), Banco Interamericano de Desarrollo—Consejo Nacional de Innovación, Ciencia y Tecnología (BID-CONICYT), Grant N° S/C/IF/54/090. Comisión Sectorial de Investigación Científica-Comisión Académica de Postgrado (CSIC-CAP), Universidad de la República (UdelaR), Proyecto de Desarrollo en Ciencias Básicas (PEDECIBA).

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

V.C. and M.B. conceived and designed research; V.C. performed experiments; V.C. and M.B. analyzed data; V.C. and M.B. interpreted results of experiments; V.C. and M.B. prepared figures; V.C. and M.B. drafted manuscript; V.C. and M.B. edited and revised manuscript; V.C. and M.B. approved final version of manuscript.

REFERENCES

- Katz PS. Evolution of central pattern generators and rhythmic behaviours. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 371: 22, 2016. doi:10.1098/rstb.2015.0057.
- Dougherty KJ, Ha NT. The rhythm section: an update on spinal interneurons setting the beat for mammalian locomotion. *Curr Opin Physiol* 8: 84–93, 2019. doi:10.1016/j.cophys.2019.01.004.
- McCrea DA, Rybak IA. Organization of mammalian locomotor rhythm and pattern generation. *Brain Res Rev* 57: 134–146, 2008. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.08.006.
- Briggman KL, Kristan WB. Multifunctional pattern-generating circuits. *Annu Rev Neurosci* 31: 271–294, 2008. doi:10.1146/annurev.neuro.31.060407.125552.
- Marder E, O’Leary T, Shruti S. Neuromodulation of circuits with variable parameters: single neurons and small circuits reveal principles of state-dependent and robust neuromodulation. *Annu Rev Neurosci* 37: 329–346, 2014. doi:10.1146/annurev-neuro-071013-013958.
- Puhl JG, Mesce KA. Dopamine activates the motor pattern for crawling in the medicinal leech. *J Neurosci* 28: 4192–4200, 2008. doi:10.1523/JNEUROSCI.0136-08.2008.
- Bass AH. Steroid-dependent plasticity of vocal motor systems: novel insights from teleost fish. *Brain Res Rev* 57: 299–308, 2008. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.04.006.
- Borde M, Quintana L, Comas V, Silva A. Hormone-mediated modulation of the electromotor CPG in pulse-type weakly electric fish. Commonalities and differences across species. *Develop Neurobiol* 80: 70–80, 2020. doi:10.1002/dneu.22732.
- Grillner S, El Manira A. The intrinsic operation of the networks that make us locomote. *Curr Opin Neurobiol* 31: 244–249, 2015. doi:10.1016/j.conb.2015.01.003.
- Grillner S, El Manira A. Current principles of motor control, with special reference to vertebrate locomotion. *Physiol Rev* 100: 271–320, 2020. doi:10.1152/physrev.00015.2019.
- Steuer J, Guertin PA. Central pattern generators in the brainstem and spinal cord: an overview of basic principles, similarities and differences. *Rev Neurosci* 30: 107–164, 2019. doi:10.1515/revneuro-2017-0102.
- Zornik E, Kelley DB. A neuroendocrine basis for the hierarchical control of frog courtship vocalizations. *Front Neuroendocrinol* 32: 353–366, 2011. doi:10.1016/j.yfrne.2010.12.006.
- Bennett MVL. Electric organs. In: *Fish Physiology*, edited by Hoar WS, Randall D. New York: Academic Press, 1971, vol. 5, p. 347–491. doi:10.1016/S1546-5098(08)60051-5.
- Bennett MVL, Pappas GD, Giménez M, Nakajima Y. Physiology and ultrastructure of electrotonic junctions. IV. Medullary electromotor nuclei in gymnotid fish. *J Neurophysiol* 30: 236–300, 1967. doi:10.1152/jn.1967.30.2.236.

15. **Lissmann HW.** Continuous electrical signals from the tail of a fish, *Gymnarchus niloticus* Cuv. *Nature* 167: 201–202, 1951. doi:10.1038/167201a0.
16. **Curti S, Comas V, Rivero C, Borde M.** Analysis of behavior-related excitatory inputs to a central pacemaker nucleus in a weakly electric fish. *Neuroscience* 140: 491–504, 2006. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.02.037.
17. **Caputi AA, Carlson BA, Macadar O.** Electric organs and their control. In: *Electroreception*, edited by Bullock TH, Hopkins CD, Popper AN, Fay RR. New York: Springer, 2005, p. 410–451. doi:10.1007/0-387-28275-0_14.
18. **Caputi AA, Budelli R.** Peripheral electrosensory imaging by weakly electric fish. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 192: 587–600, 2006. doi:10.1007/s00359-006-0100-2.
19. **Lewis JE.** Active electroreception: signals, sensing, and behavior. In: *The Physiology of Fishes, Fourth Edition*, edited by Evans DH, Claiborne JB, Currie S. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor and Francis Group, 2014, p. 375–390.
20. **Lissmann HW, Machin KE.** The mechanism of object location in *Gymnarchus niloticus* and similar fish. *J Exp Biol* 35: 451–486, 1958. doi:10.1242/jeb.35.2.451.
21. **Lorenzo D, Silva A, Macadar O.** Electrocommunication in Gymnotiformes: jamming avoidance and social signals during courtship. In: *Communication in Fishes 2*, edited by Ladich F, Collin SP, Moller P, Kapoor BG. Enfield, NJ: Science Publishers, 2006, p. 753–779.
22. **Comas V, Langevin K, Silva A, Borde M.** Distinctive mechanisms underlie the emission of social electric signals of submission in *Gymnotus omarorum*. *J Exp Biol* 222: jeb195354, 2019. doi:10.1242/jeb.195354.
23. **Comas V, Borde M.** Neural substrate of an increase in sensory sampling triggered by a motor command in a gymnotid fish. *J Neurophysiol* 104: 2147–2157, 2010. doi:10.1152/jn.00076.2010.
24. **Silva AC.** Hormonal influences on social behavior in South American weakly electric fishes. In: *Electroreception: Fundamental Insights from Comparative Approaches*, edited by Carlson BA, Sisneros JA, Popper AN, Fay RR. Cham, Switzerland: Springer, 2019, p. 163–190.
25. **Kawasaki M, Heiligenberg W.** Distinct mechanisms of modulation in a neuronal oscillator generate different social signals in the electric fish *Hypopomus*. *J Comp Physiol A* 165: 731–741, 1989. doi:10.1007/BF00610872.
26. **Kawasaki M, Heiligenberg W.** Different classes of glutamate receptors and GABA mediate distinct modulations of a neuronal oscillator, the medullary pacemaker of a gymnotiform electric fish. *J Neurosci* 10: 3896–3904, 1990. doi:10.1523/JNEUROSCI.10-12-03896.1990.
27. **Quintana L, Harvey-Girard E, Lescano C, Macadar O, Lorenzo D.** Sex-specific role of a glutamate receptor subtype in a pacemaker nucleus controlling electric behavior. *J Physiol Paris* 108: 155–166, 2014. doi:10.1016/j.jphysparis.2014.04.004.
28. **Quintana L, Sierra F, Silva A, Macadar O.** A central pacemaker that underlies the production of seasonal and sexually dimorphic social signals: functional aspects revealed by glutamate stimulation. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 197: 211–225, 2011. doi:10.1007/s00359-010-0603-8.
29. **Spiro JE.** Differential activation of glutamate receptor subtypes on a single class of cell enables a neural oscillator to produce distinct behaviors. *J Neurophysiol* 78: 835–847, 1997. doi:10.1152/jn.1997.78.2.835.
30. **Curti S, Falconi A, Morales FR, Borde M.** Mauthner cell-initiated electromotor behavior is mediated via NMDA and metabotropic glutamatergic receptors on medullary pacemaker neurons in a gymnotid fish. *J Neurosci* 19: 9133–9140, 1999. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-20-09133.1999.
31. **Dye J, Heiligenberg W, Keller CH, Kawasaki M.** Different classes of glutamate receptors mediate distinct behaviors in a single brainstem nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8993–8997, 1989. doi:10.1073/pnas.86.22.8993.
32. **Keller CH, Kawasaki M, Heiligenberg W.** The control of pacemaker modulations for social communication in the weakly electric fish *Sternopygus*. *J Comp Physiol A* 169: 441–450, 1991. doi:10.1007/BF00197656.
33. **Juranek J, Metzner W.** Cellular characterization of synaptic modulations of a neuronal oscillator in electric fish. *J Comp Physiol A* 181: 393–414, 1997. doi:10.1007/s003590050124.
34. **Juranek J, Metzner W.** Segregation of behavior-specific synaptic inputs to a vertebrate neuronal oscillator. *J Neurosci* 18: 9010–9019, 1998. doi:10.1523/JNEUROSCI.18-21-09010.1998.
35. **Kawasaki M, Heiligenberg W.** Individual prepacemaker neurons can modulate the pacemaker cycle of the gymnotiform electric fish, *Eigenmannia*. *J Comp Physiol A* 162: 13–21, 1988. doi:10.1007/BF01342699.
36. **Kawasaki M, Maler L, Rose GJ, Heiligenberg W.** Anatomical and functional organization of the prepacemaker nucleus in gymnotiform electric fish: the accommodation of two behaviors in one nucleus. *J Comp Neurol* 276: 113–131, 1988. doi:10.1002/cne.902760108.
37. **Spiro JE, Brose N, Heinemann SF, Heiligenberg W.** Immunolocalization of NMDA receptors in the central nervous system of weakly electric fish: functional implications for the modulation of a neuronal Oscillator. *J Neurosci* 14: 6289–6299, 1994. doi:10.1523/JNEUROSCI.14-10-06289.1994.
38. **Kennedy G, Heiligenberg W.** Ultrastructural evidence of GABAergic inhibition and glutamatergic excitation in the pacemaker nucleus of the gymnotiform electric fish, *Hypopomus*. *J Comp Physiol A* 174: 267–280, 1994. doi:10.1007/BF00240210.
39. **Clark BA, Cull-Candy SG.** Activity-dependent recruitment of extrasynaptic NMDA receptor activation at an AMPA receptor-only synapse. *J Neurosci* 22: 4428–4436, 2002. doi:10.1523/jneurosci.22-11-04428.2002.
40. **Cottrell JR, Dubé GR, Egles C, Liu G, Dube GR, Egles C, Liu G.** Distribution, density, and clustering of functional glutamate receptors before and after synaptogenesis in hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 84: 1573–1587, 2000. doi:10.1152/jn.2000.84.3.1573.
41. **Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R.** Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 62: 405–496, 2010 [Erratum in *Pharmacol Rev* 66: 1141, 2014]. doi:10.1124/pr.109.002451.
42. **Nakayama K, Kiyosue K, Taguchi T.** Diminished neuronal activity increases neuron-neuron connectivity underlying silent synapse formation and the rapid conversion of silent to functional synapses. *J Neurosci* 25: 4040–4051, 2005. doi:10.1523/JNEUROSCI.4115-04.2005.
43. **Paoletti P.** Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur J Neurosci* 33: 1351–1365, 2011. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07628.x.
44. **Comas V.** *Estudio De Las Bases Neurales De Un Proceso De Integración Sensorio-Motriz En Vertebrados: Modulación Central De Un Sistema Sensorial Por Un Comando Motor.* Montevideo, Uruguay: Universidad de la República, 2010.
45. **Buño W, Fuentes J, Barrio L.** Modulation of pacemaker activity by IPSP and brief length perturbations in the crayfish stretch receptor. *J Neurophysiol* 57: 819–834, 1987. doi:10.1152/jn.1987.57.3.819.
46. **Sqalli-Houssaini Y, Cazalets JR, Clarac F.** Oscillatory properties of the central pattern generator for locomotion in neonatal rats. *J Neurophysiol* 70: 803–813, 1993. doi:10.1152/jn.1993.70.2.803.
47. **Falconi A, Borde M, Hernández-Cruz A, Morales FR.** Mauthner cell-initiated abrupt increase of the electric organ discharge in the weakly electric fish *Gymnotus carapo*. *J Comp Physiol A* 176: 679–689, 1995. doi:10.1007/BF01021588.
48. **Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD.** Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron* 4: 1–9, 2001. https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf.
49. **Coan EJ, Collingridge GL.** Magnesium ions block an N-methyl-D-aspartate receptor-mediated component of synaptic transmission in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 53: 21–26, 1985. doi:10.1016/0304-3940(85)90091-6.
50. **Collingridge GL, Herron CE, Lester RA.** Synaptic activation of N-methyl-D-aspartate receptors in the Schaffer collateral-commissural pathway of rat hippocampus. *J Physiol* 399: 283–300, 1988. doi:10.1113/jphysiol.1988.sp017080.
51. **Daw NW, Stein PSG, Fox K.** The role of NMDA receptors in information processing. *Annu Rev Neurosci* 16: 207–222, 1993. doi:10.1146/annurev.ne.16.030193.001231.

52. Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbert A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307: 462–465, 1984. doi:10.1038/307462a0.
53. Dodge FA, Rahamimoff R. Co-operative action of calcium ions in transmitter release at the neuromuscular junction. *J Physiol* 193: 419–432, 1967. doi:10.1113/jphysiol.1967.sp008367.
54. Batista G, Zubizarreta L, Perrone R, Silva A. Non-sex-biased dominance in a sexually monomorphic electric fish: fight structure and submissive electric signalling. *Ethology* 118: 398–410, 2012. doi:10.1111/j.1439-0310.2012.02022.x.
55. Getting PA. Modification of neuron properties by electrotonic synapses. I. Input resistance, time constant, and integration. *J Neurophysiol* 37: 846–857, 1974. doi:10.1152/jn.1974.37.5.846.
56. Eastman G, Valiño G, Radío S, Young RL, Quintana L, Zakon HH, Hofmann HA, Sotelo-Silveira J, Silva A. Brain transcriptomics of agonistic behaviour in the weakly electric fish *Gymnotus omarorum*, a wild teleost model of non-breeding aggression. *Sci Rep* 10: 1–11, 2020. doi:10.1038/s41598-020-66494-9.
57. Falconi A, Lorenzo D, Curti S, Morales FR, Borde M. Mauthner cell-evoked synaptic actions on pacemaker medullary neurons of a weakly electric fish. *J Comp Physiol A* 181: 143–151, 1997. doi:10.1007/s003590050101.
58. Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* 2004: re16, 2004. doi:10.1126/stke.2552004re16.
59. Williams K. Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* 44: 851–859, 1993. doi:10.3389/fncir.2016.00018.
60. Harvey-Girard E, Dunn RJ. Excitatory amino acid receptors of the electrosensory system: the NR1/NR2B N-methyl-D-aspartate receptor. *J Neurophysiol* 89: 822–832, 2003. doi:10.1152/jn.00629.2002.
61. Harvey-Girard E, Dunn RJ, Maler L. Regulated expression of N-methyl-D-aspartate receptors and associated proteins in teleost electrosensory system and telencephalon. *J Comp Neurol* 505: 644–668, 2007. doi:10.1002/cne.21521.
62. Crampton WGR. An ecological perspective on diversity and distributions. In: *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. California: University of California Press, 2011, p. 165–192.
63. Hopkins CD. Electric perception and communication. In: *Encyclopedia of Neuroscience*, edited by Squire LR. Oxford, UK: Academic Press, 2009, p. 813–831. doi:10.1016/B978-0-08-045046-9.01827-1.
64. Voronin LL, Cherubini E. Deaf, mute and whispering” silent synapses: their role in synaptic plasticity. *J Physiol* 557: 3–12, 2004. doi:10.1113/jphysiol.2003.058966.
65. Wolszon LR, Pereda AE, Faber DS. A fast synaptic potential mediated by NMDA and non-NMDA receptors. *J Neurophysiol* 78: 2693–2706, 1997. doi:10.1152/jn.1997.78.5.2693.
66. Berman NJ, Plant J, Turner RW, Maler L. Excitatory amino acid receptors at a feedback pathway in the electrosensory system: implications for the searchlight hypothesis. *J Neurophysiol* 78: 1869–1881, 1997. doi:10.1152/jn.1997.78.4.1869.
67. Trujillo-Cenóz O, Lorenzo D, Bertolotto C. Identification of neuronal types in the medullary electromotor nucleus of *Gymnotus carapo*. *J Comp Physiol A* 173: 750, 1993. doi:10.1007/BF00192980.
68. Holmann M, Boulter J, Maron C, Beasley L, Sullivan J, Pecht G, Heinemann S. Zinc potentiates agonist-induced currents at certain splice variants of the NMDA receptor. *Neuron* 10: 943–954, 1993. doi:10.1016/0896-6273(93)90209-A.
69. Asztely F, Erdemli G, Kullmann DM. Extrasynaptic glutamate spill-over in the hippocampus: dependence on temperature and the role of active glutamate uptake. *Neuron* 18: 281–293, 1997. doi:10.1016/S0896-6273(00)80268-8.
70. Caputi AA, Aguilera PA, Castelló ME. Probability and amplitude of novelty responses as a function of the change in contrast of the referent image in *G. carapo*. *J Exp Biol* 206: 999–1010, 2003. doi:10.1242/jeb.00199.
71. Hofmann V, Sanguinetti-Scheck JI, Künzel S, Geurten B, Gómez-Sena L, Engelmann J. Sensor flow shaped by active sensing: sensorimotor strategies in electric fish. *J Exp Biol* 216: 2487–2500, 2013. doi:10.1242/jeb.082420.
72. Jun JJ, Longtin A, Maler L. Active sensing associated with spatial learning reveals memory-based attention in an electric fish. *J Neurophysiol* 115: 2577–2592, 2016. doi:10.1152/jn.00979.2015.
73. Heiligenberg W. The neural basis of behavior: a neuroethological view. *Annu Rev Neurosci* 14: 247–267, 1991. doi:10.1146/annurev.ne.14.030191.001335.
74. Capurro A, Macadar O, Perrone R, Pakdaman K. Computational model of the jamming avoidance response in the electric fish *Gymnotus carapo*. *Biosystems* 48: 21–27, 1998. doi:10.1016/S0303-2647(98)00046-x.
75. Capurro A, Pakdaman K, Perrone R, Macadar O. Analysis of the jamming avoidance response in the electric fish *Gymnotus carapo*. *Biol Cybern* 80: 269–283, 1999. doi:10.1007/s004220050524.
76. Metzner W. The jamming avoidance response in *Eigenmannia* is controlled by two separate motor pathways. *J Neuroscience* 13: 1862–1878, 1993. doi:10.1523/JNEUROSCI.13-05-01862.1993.
77. Fouad K, Bennett D, Fischer H, Büschges A. Comparative locomotor systems. In: *Handbook of Psychology* (2nd ed.), edited by Weiner IB. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2012, p. 176–205.
78. Grätsch S, Büschges A, Dubuc R. Descending control of locomotor circuits. *Curr Opin Physiol* 8: 94–98, 2019. doi:10.1016/j.cophys.2019.01.007.
79. Kiehn O. Decoding the organization of spinal circuits that control locomotion. *Nat Rev Neurosci* 17: 224–238, 2016. doi:10.1038/nrn.2016.9.
80. Lemieux M, Bretzner F. Glutamatergic neurons of the gigantocellular reticular nucleus shape locomotor pattern and rhythm in the freely behaving mouse. *PLoS Biol* 17: e2003880, 2019. doi:10.1371/journal.pbio.2003880.
81. Ziskind-Conhaim L, Mentis GZ, Wiesner EP, Titus DJ. Synaptic integration of rhythmogenic neurons in the locomotor circuitry: the case of Hb9 interneurons. *Ann NY Acad Sci* 1198: 72–84, 2010. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05533.x.
82. Talpalar AE, Kiehn O. Glutamatergic mechanisms for speed control and network operation in the rodent locomotor CPG. *Front Neural Circuits* 4: 19, 2010. doi:10.3389/fncir.2010.00019.
83. Harris-Warrick RM, Ramirez J. Neural networks for the generation of rhythmic motor behaviors. In: *Neurobiology of Motor Control: Fundamental Concepts and New Directions*, edited by Hooper L, Büschges A. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2017, p. 225–262.
84. Guertin PA. Central pattern generator for locomotion: anatomical, physiological, and pathophysiological considerations. *Front Neurol* 3: 183–203, 2012. doi:10.3389/fneur.2012.00183.
85. Hinckley CA, Wiesner EP, Mentis GZ, Titus DJ, Ziskind-Conhaim L. Sensory modulation of locomotor-like membrane oscillations in Hb9-expressing interneurons. *J Neurophysiol* 103: 3407–3423, 2010. doi:10.1152/jn.00996.2009.
86. Kiehn O. Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annu Rev Neurosci* 29: 279–306, 2006. doi:10.1146/annurev.neuro.29.051605.112910.
87. Grillner S. Biological pattern generation: the cellular and computational logic of networks in motion. *Neuron* 52: 751–766, 2006. doi:10.1016/j.neuron.2006.11.008.
88. Nistri A, Ostroumov K, Sharifullina E, Taccola G. Tuning and playing a motor rhythm: how metabotropic glutamate receptors orchestrate generation of motor patterns in the mammalian central nervous system. *J Physiol* 572: 323–334, 2006. doi:10.1113/jphysiol.2005.100610.
89. Crampton WGR. Electroreception, electrogenesis and electric signal evolution. *J Fish Biol* 95: 92–134, 2019. doi:10.1111/jfb.13922.
90. Stone TW. Ionic movement and tissue concentration after iontophoresis ejection by pressure. In: *Microiontophoresis and Pressure Ejection*. Hoboken, NJ: Wiley, 1985, vol. 16, p. 64–75.
91. Nicholson C, Phillips JM, Gardner-Medwin AR. Diffusion from an iontophoretic point source in the brain: role of tortuosity and volume fraction. *Brain Res* 169: 580–584, 1979. doi:10.1016/0006-8993(79)90408-6.
92. Krnjević K, Phillis JW. Iontophoretic studies of neurones in the mammalian cerebral cortex. *J Physiol* 165: 274–304, 1963. doi:10.1113/jphysiol.1963.sp007057.

7. Capítulo 2: Bases neurales de la emisión de señales que implican modificación de la forma de onda de la DOE ("chirps" e interrupciones)

a. Resumen

El artículo: "Distinctive mechanisms underlie the emission of social electric signals of submission in *Gymnotus omarorum*" fue publicado en la revista *Journal of Experimental Biology*: 222(11) p.:jeb.195354, en el año 2019.

Ante la posibilidad de que el desafío comportamental (encuentro agonístico) pudiera promover la expresión de receptores glutamatérgicos funcionales en las cR del NEB, en el presente estudio se examinó *in vivo* la presencia de estos receptores en las cR en ejemplares de *G. omarorum* subordinados que emitieron "chirps" e interrupciones 30 minutos (o menos) antes del experimento. La aplicación local de glutamato en la vecindad de las cR no arrojó, sin embargo, evidencias que indiquen la activación glutamatérgica directa de estas células a través de la activación de receptores glutamatérgicos de tipo AMPA o NMDA. Los resultados obtenidos sugieren la existencia de mecanismos alternativos para la generación de "chirps" e interrupciones. Interrupciones de la DOE con características similares a las observadas durante los encuentros agonísticos fueron provocadas por la inyección de microvolúmenes de GABA en las cMP. Por otra parte, el bloqueo de conductancias de K^+ de lenta inactivación de las cR con 4-aminopiridina (4-AP), bloqueante de los canales de K^+ de la amplia familia de tipo I_A , provocó la emisión de señales similares a los "chirps" (brotes transitorios de DOEs de baja amplitud y de alta frecuencia), cuya aparición fue facilitada por la despolarización sináptica de las cMP provocada por la estimulación del nervio de la línea lateral anterior¹. Evidencias adicionales sugieren que durante la post-resolución del encuentro agonístico la emisión de "chirps" implicaría un mecanismo similar desencadenado por neuromoduladores liberados en el NEB durante la contienda. En rodajas de tronco encefálico conteniendo el NEB la perfusión de 4-AP (30 μ M - 3 mM) detuvo la actividad espontánea rítmica de las cMP e incrementó la excitabilidad de las cR promoviendo el disparo de potenciales de meseta despolarizantes transitorios (100 - 400 ms) que produjeron la descarga repetitiva de PAs a alta frecuencia (150–250 Hz), patrón de descarga presumiblemente asociado a la emisión de "chirps". El estudio permite concluir que, en *G. omarorum*, los "chirps" e interrupciones emitidas como señales sociales de sumisión implican mecanismos **no-glutamatérgicos** a nivel del NEB, a diferencia de lo descrito en el resto de los gymnotiformes. La emisión de "chirps", particularmente, parece implicar un mecanismo previamente desconocido basado en el aumento de la excitabilidad de estas células provocado por neuromoduladores liberados localmente. La modulación de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas del NEB emerge como un mecanismo novedoso que amplía las estrategias neurales para la generación del repertorio electromotor en estas especies, que le otorga un mayor grado de versatilidad funcional al NEB.

¹ El nervio de la línea lateral anterior (ALLn) es un tronco nervioso de gran diámetro que contiene fibras aferentes mecanosensoriales y electrosensoriales que inervan la cabeza del pez. La estimulación eléctrica del ALLn en este trabajo fue utilizado simulando el patrón sensorial que presumiblemente induce el ataque del pez dominante.

RESEARCH ARTICLE

Distinctive mechanisms underlie the emission of social electric signals of submission in *Gymnotus omarorum*

Virginia Comas¹, Kim Langevin², Ana Silva^{2,3} and Michel Borde^{1,*}

ABSTRACT

South American weakly electric fish (order Gymnotiformes) rely on a highly conserved and relatively fixed electromotor circuit to produce species-specific electric organ discharges (EODs) and a variety of meaningful adaptive EOD modulations. The command for each EOD arises from a medullary pacemaker nucleus composed of electrotonically coupled intrinsic pacemaker and bulbospinal projecting relay cells. During agonistic encounters, *Gymnotus omarorum* signals submission by interrupting its EOD (offs) and emitting transient high-rate barrages of low-amplitude discharges (chirps). Previous studies in Gymnotiformes have shown that electric signal diversity is based on the segregation of descending synaptic inputs to pacemaker or relay cells and differential activation of the neurotransmitter receptors –for glutamate or γ -aminobutyric acid (GABA) – of these cells. Therefore, we tested whether GABAergic and glutamatergic inputs to pacemaker nucleus neurons are involved in the emission of submissive electric signals in *G. omarorum*. We found that GABA applied to pacemaker cells evokes EOD interruptions that closely resemble natural offs. Although in other species chirping is probably due to glutamatergic suprathreshold depolarization of relay cells, here, application of glutamate to these cells was unable to replicate the emission of this submissive signal. Nevertheless, chirp-like discharges were emitted after the enhancement of excitability of relay cells by blocking an I_A -type potassium current and, in some cases, by application of vasotocin, a status-dependent modulator peptide of *G. omarorum* agonistic behavior. Modulation of the electrophysiological properties of pacemaker nucleus neurons in Gymnotiformes emerges as a novel putative mechanism endowing electromotor networks with higher functional versatility.

KEY WORDS: Glutamate, GABA, Neuromodulation, Neuronal excitability, Electric fish, Pacemaker nucleus, Electric communication, Agonistic behavior, Social signals, Electric organ discharge

INTRODUCTION

South American freshwater weakly electric fish of the order Gymnotiformes rely on a common and relatively fixed electromotor circuit to produce species-specific electric organ discharges (EODs). This stereotyped EOD carries information not only about

species but also about sex, individual identity, maturity, season, time of day and motivational state by both rhythm and waveform modulations (Bennett, 1971; Caputi et al., 2005). A spontaneously firing hindbrain structure, the pacemaker nucleus (PN), commands the timing of the EOD. The PN contains two neuronal types: actual pacemaker cells (PM-cells) and bulbospinal projection neurons or relay cells (R-cells), which activate electromotor neurons in the spinal cord, which in turn activate the peripheral electric organ. The command for each EOD is initiated at the PM-cells and then transmitted 1:1 to R-cells. Available evidence suggests that PM-cells are electrotonically coupled with each other and with R-cells (Bennett et al., 1967; Bennett, 1971) that form a rather simple circuit with exclusive feedforward connections (Quintana et al., 2011). Although the PN itself produces and maintains the regular EOD, it receives multiple descending inputs that modulate its firing, resulting in EOD rate modulations that adjust electric signaling to ongoing environmental demands (Kawasaki and Heiligenberg, 1989, 1990; Spiro, 1997; Zupanc and Maler, 1997; Caputi et al., 2005; Comas and Borde, 2010). Despite the conserved rigid wiring of the electromotor circuit, it allows a high versatility of behaviorally relevant rate modulations such as gradual raises and falls of EOD rate without waveform distortions, transient high rate barrages of low amplitude and distorted waveform discharges termed chirps, and the cessation of EOD emission termed offs and sudden interruptions, all of which can be generally observed across gymnotiform species (Dye et al., 1989; Kawasaki and Heiligenberg, 1989, 1990; Spiro, 1997; Quintana et al., 2014).

Within pulse Gymnotiformes, early electrophysiological studies unraveled the neural mechanisms underlying social EOD rate modulations in the genus *Brachyhypopomus* (Kawasaki and Heiligenberg, 1989, 1990; Spiro, 1997; Quintana et al., 2014). Distinct types of modulations depend not only on the specific prepacemaker structures being activated but also on the cellular target of prepacemaker inputs within the PN and neurotransmitter receptors involved. Specifically, GABAergic prepacemaker inputs to PM-cells induce them to silence their discharge (EOD offs), whereas glutamatergic prepacemaker inputs increase their discharge rate, and hence the rate of EOD, via activation of NMDA receptors (NMDARs). In R-cells, the activation of glutamatergic prepacemaker inputs provokes chirps by causing the repetitive discharge of R-cells during AMPA receptor (AMPA)-mediated depolarization, or sudden EOD interruptions via a large NMDAR-mediated sustained depolarization that inactivates R-cells (Kawasaki and Heiligenberg, 1989, 1990; Spiro, 1997). The robustness of these early demonstrated mechanisms, as well as the good fit between pharmacologically induced rate modulations and behavioral ones in *Brachyhypopomus*, led to the unproven assumption that chirps and EOD interruptions were produced in a similar way at least among pulse-type gymnotiform species.

The agonistic behavior of *Gymnotus omarorum* is the best understood example among teleosts of non-breeding territorial

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, 11800 Montevideo, Uruguay. ²Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, 11400 Montevideo, Uruguay. ³Unidad Bases Neuronales de la Conducta, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, 11600 Montevideo, Uruguay.

*Author for correspondence (mborde@fmed.edu.uy)

 K.L., 0000-0001-7318-6385; M.B., 0000-0002-5729-8616

aggression (Batista et al., 2012; Jalabert et al., 2015; Quintana et al., 2016). In dyadic contests, the dominant fish defends its territory, while the subordinate fish interrupts its EOD to hide from the dominant one, emits bouts of chirps, and adopts a lower post-resolution EOD basal rate than the dominant fish (Batista et al., 2012; Perrone and Silva, 2018). Two important issues emerge from the above studies. First, as no glutamatergic actions have been ever demonstrated on the R-cells of the *G. omarorum* PN (Curti et al., 1999, 2006), mechanisms underlying subordinate chirps in this species are unlikely to be similar to those demonstrated in *Brachyhyopomus*. Second, chirps are only emitted by subordinates as the most unambiguous signal of submission (Batista et al., 2012; Quintana et al., 2016). This electric behavior is status dependent (i.e. is emitted by the subordinate fish once its condition emerges from the contest) and is modulated by the hypothalamic neuropeptide 8-arginine vasotocin (AVT), the administration of which induces an increase in chirp emission in subordinates but does not induce any change in the electric behavior of dominants (Perrone and Silva, 2018). Taken together, to discern whether or not *Brachyhyopomus* and *Gymnotus* use the same strategies to emit electric signals with similar characteristics (chirps and interruptions), electrophysiological experiments in *G. omarorum* should be carried out in behaviorally tested subordinate individuals. If glutamate has no effect on R-cells of subordinates, this would indicate that R-cells in *G. omarorum* do not possess ionotropic glutamate receptors, and thus cannot produce either chirps or sudden interruptions. The electrical signals of submission should consequently imply an alternative non-glutamatergic mechanism.

In this study, we aimed to contribute to the understanding of the versatility in the mechanisms underlying the emission of social electric signals among the highly conserved electromotor circuitry of pulse gymnotiform fish. In subordinate *G. omarorum* individuals, 30 min after their submissive status had been established in the behavioral arena, we explored the mechanisms of submissive electric signals by analyzing the effect of local administration of endogenous neurotransmitters and of the modulation of R-cell excitability on the activity of the PN. Our data suggest that while chirps are most probably driven by GABAergic inputs on PM-cells, the emission of chirps does not involve direct glutamatergic activation of R-cells – as described in most Gymnotiformes – and probably depends on a previously unknown mechanism based on the enhancement of excitability of these cells. Together with previously described neural underpinnings of electric signaling in weakly electric fish, modulation of electrophysiological properties of PN neurons emerges as a putative novel mechanism that grants a higher degree of functional versatility to electromotor networks.

MATERIALS AND METHODS

We used non-breeding adult *Gymnotus omarorum* (Richerde-Forges et al., 2009) in three sets of experiments: (1) dyadic agonistic encounters ($n=12$), in which the dominant–subordinate status was attained in less than 25 min after social engagement; (2) *in vivo* simultaneous recordings of the PN field potentials and the head-to-tail EODs of subordinates ($n=12$) immediately after each agonistic encounter, in which the effects of neurotransmitters on PN activity and the modulation of electrophysiological intrinsic properties of its cellular components were tested; and (3) *in vitro* intracellular recordings of neurons of the PN ($n=6$), in which R-cell electrophysiological intrinsic properties and their modulation were explored.

Animals and housing

Fish ranged from 15 to 19 cm in body length and 8.8 to 22.3 g in body mass. As sex in *G. omarorum* is not externally apparent (either morphologically or electrophysiologically), it was determined by gonadal inspection either before (≥ 1 months) or immediately after the experiments. All experiments were performed during the non-breeding season (May–August 2017).

Fish were collected as described elsewhere (Silva et al., 2003) in Laguna del Sauce (34°51'S, 55°07'W, Department of Maldonado, Uruguay), and housed in individual mesh compartments in 500 l outdoor tanks for at least 10 days before the experiments. All environmental variables were kept within the normal range exhibited in the natural habitat in the non-breeding season. Water temperature ranged from 8 to 21°C, and natural photoperiod ranged from 10 h:14 h to 11 h:13 h light:dark. Water conductivity was adjusted and always maintained below 250 $\mu\text{S cm}^{-1}$ by the addition of deionized water. Aquatic plants (*Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes*, *Salvinia* sp.) covered the surface of the water and provided shelter for the fish. Fish were fed with *Tubifex tubifex* once a week.

Electric fish collection for experimental purposes was authorized by DINARA (National Direction of Aquatic Resources) and MGAP (Ministry of Agriculture and Fisheries), resolution no. 065/2004. All experimental procedures complied with ASAP/ABS Guidelines for the Use of Animals in Research and were approved by our institutional ethical committees (Comisión Bioética, Instituto Clemente Estable, MEC, 007/02/2010, and Comisión Nacional de Experimentación Animal, exp. 071140-000092-13 and 071140-000105-13).

Laboratory settings for behavioral experiments

Fish were placed (2–3 h before the experiments) in an experimental setup (30 l glass aquarium, 55×40×25 cm) that allowed simultaneous video and electric recordings following Silva et al. (2007). Water temperature, conductivity and pH of the recording tank matched those of the outdoor housing tanks. The experimental tank was fitted with one pair of electrodes attached to two parallel tank walls. The electric signals of freely moving fish recorded by these electrodes were connected to a high-input impedance amplifier (DAM 50, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA). Signals were low-pass filtered at 3.0 kHz, sampled at 20.0 kHz through a Digidata 1200 (Molecular Devices, San José, CA, USA) and stored on a PC for further analysis with the aid of the pCLAMP programs (Molecular Devices). All the behavioral experiments were performed in total darkness, with illumination from an array of infrared LEDs included in an infrared-sensitive video camera (TP-link cloud NC200, TP-link Technologies Co. Ltd, Nanshan, Shenzhen, China) that was focused on the top of the tank. Images were WiFi transmitted to the computer and stored for further analysis.

Behavioral experimental procedures

Following Batista et al. (2012) and Perrone and Silva (2018), we tested the non-breeding territorial aggression of *G. omarorum* under experimental conditions in which territory is the only resource that individuals fight for, by providing symmetric resources and resource values for the two contestants. As the non-breeding territorial aggression of *G. omarorum* is sex independent (Batista et al., 2012), we used either inter-sexual or intra-sexual dyads. In all experiments, a removable glass gate was raised 5 min after sunset, and fish were separated 10 min following conflict resolution. Conflict resolution was established as the moment we observed the

third consecutive retreat of one fish without attacking back. As body mass difference is a proxy for dominance (Batista et al., 2012), we used dyads with a body mass difference that ranged from 9.5% to 42.5% ($n=12$) to predict the contest outcome, and we only proceeded to the second experiment (*in vivo* recordings, see below) if the smaller fish of the dyad subordinated in less than 25 min. To potentiate subordination, as AVT is known to increase the electrical signaling of submission in *G. omarorum* (Perrone and Silva, 2018), we administered AVT ($1 \mu\text{g g}^{-1}$ body mass of a $1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ saline solution; American Peptide Company, Sunnyvale, CA, USA) to expected subordinates by intraperitoneal administration 30 min before the agonistic encounter. In all the experiments, the other animal of the dyad was also intraperitoneally injected with the same volume of a physiological saline solution. With the same purpose of potentiating subordination, we performed a second agonistic encounter using the same subordinate against a different larger contender (60 min after the first fight) in cases in which the electrical signaling of submission in the first fight was scarce ($n=4$). However, as experience may influence the outcome, dynamics and level of aggression of the agonistic encounter (Hsu et al., 2006), we only used the first encounter (in cases in which we had two) in the behavioral description presented in Results to favor statistical comparisons.

Behavioral data processing

We analyzed the locomotor displays in each recorded dyad to identify the three phases of the agonistic encounter following Batista et al. (2012): (1) evaluation phase (pre-contest): from time 0 (gate removal) to the occurrence of the first attack; (2) contest phase: from the first attack to conflict resolution (resolution time); and (3) post-resolution phase (post-contest): 10 min after conflict resolution. As reported elsewhere (Batista et al., 2012), contest resolution was established when we observed the third consecutive retreat of one fish without attacking back.

We measured the following parameters in all the experiments: latency to the first attack (including nips, nudges, bites), contest duration, post-resolution attack rate (number of attacks/contest duration in minutes) of dominants and subordinates, and the time of occurrence of post-resolution dominants' attacks. With respect to electric displays, we measured the occurrence of offs (interruptions of EOD emission) and chirps (transient high-rate barrages of low amplitude and distorted waveform), post-resolution chirp rate (number of chirps per 10 min), and the time of occurrence of post-contest chirps.

In vivo experimental procedures

Immediately after each contest, subordinate fish were prepared for simultaneous PN field potential and head-to-tail EOD recordings. Individuals were anesthetized as described elsewhere (Comas and Borde, 2010) and were placed in a plastic box with the abdomen lying on a wet sponge. All surgical surfaces and fixation points were heavily infiltrated with 2% lidocaine hydrochloride. During surgical procedures, the head was maintained in a horizontal position by a pair of plastic-tipped metal bars attached to the box and the gills were perfused with tricaine methanesulfonate (MS-222, Sigma, St Louis, MO, USA) dissolved in iced tap water (0.3 mg l^{-1}). The dorsal surface of the brain and of the left anterior lateral line nerve (ALLn) – a large-diameter nerve trunk that contains mechanosensory and electrosensory afferent fibers innervating the fish head (Carr et al., 1986; Castelló et al., 1998) – near its entrance to the brainstem were exposed through an opening in the skull to provide access to micropipettes used for recording from and drug

application to the PN and for nerve stimulation. Following these procedures, the animals were injected with d-Tubocurarine ($1\text{--}3 \mu\text{g g}^{-1}$ i.m.) at doses that produced paralysis but did not completely eliminate the EOD. After surgical preparation and curarization, the gills were continuously perfused with aerated dechlorinated tap water (aquarium water) at room temperature ($20\text{--}25^\circ\text{C}$). Conductivity was controlled regularly and was usually under $250 \mu\text{S cm}^{-1}$. Immediately following electrophysiological experiments, animal were killed with an overdose of MS-222.

Field potential and EOD recordings

In these experiments, the same micropipette was used for field potential recordings and drug application. Electrical recordings were obtained using micropipettes ($10\text{--}15 \text{ M}\Omega$) filled with NaCl (154 mmol l^{-1})-based solutions of different compounds (see below) connected to a homemade high input impedance DC amplifier. Drug-containing solutions were applied by pressure (Picospritzer II, General Valve Corporation, Cleveland, OH, USA). Pulses of $10\text{--}20$ psi and $10\text{--}100$ ms duration were used. In order to calibrate drug applications, before each experiment, pressure and pulse duration parameters were adjusted while visualizing the formation of microdroplets under a microscope. The volumes of these microdroplets, calculated from their diameters, were relatively small (between 5 and 15 pl). It was thus supposed that the injection affected a restricted volume of brain tissue. Taking advantage of the spatial segregation of PM- and R-cell populations within the PN, extracellular electrophysiological recordings can be obtained from each cell population independently, and drug-containing solutions (see below) can also be administered locally, separately to each cell population (Bennett et al., 1967; Ellis and Szabo, 1980; Trujillo-Cenóz et al., 1993; Curti et al., 2006). In most experiments, similar microvolumes of drug-containing solutions were injected at two different depths within the nucleus along the same micropipette vertical track passing near ($\pm 100 \mu\text{m}$) the rostro-caudal center of the PN (called $0 \mu\text{m}$ in Curti et al., 2006). Dorsal injections were performed to apply drugs to PM-cells whereas injections performed at $200\text{--}300 \mu\text{m}$ from this location in the ventral direction allowed us to apply drugs to R-cells. Although a detailed cytoarchitectural description of the PN of *G. omarorum* is not yet available in the literature, specific waveforms and depth profiles of field potentials obtained along different vertical electrode tracks in the rostro-caudal axis differed from those obtained in *Brachyhyopomus* (Quintana et al., 2011), suggesting structural differences between the two genera. Although an exhaustive analysis was not performed, during pilot experiments significant differences in the responses to drugs (particularly glutamate) applied at different levels in the rostro-caudal axis ($\pm 100 \mu\text{m}$ from the center) were not detected. Control experiments included the injection of similar volumes of the vehicle solution (154 mmol l^{-1} NaCl).

A Grass Technologies (Quincy, MA, USA) P15 preamplifier was used to monitor the EOD (head to tail) with a pair of metal electrodes placed next to the fish and in contact with the supporting wet sponge, with a gain of $100\times$ and a low-pass filter (cut-off at 3 kHz).

Electrical signals were low-pass filtered at 3.0 kHz, sampled at 20.0 kHz through a Digidata 1200 (Molecular Devices), and stored on a PC for further analysis with the aid of the pCLAMP programs. Clampfit routines were used to detect electrical events (threshold search) and to obtain instantaneous frequency versus time plots. Events during chirps were detected manually and the threshold was set to detect events with amplitudes of at least 5% of the EOD amplitude. Smaller and irregular events interspersed between detected events were usually discarded. Consequently, a few of

the inter-event intervals (usually less than 5%) exhibited a slightly longer duration. Instantaneous frequency values derived from these intervals were included in instantaneous frequency versus time plots and in calculations of mean intra-chirp rates. Clampfit routines were also used to quantify variability of baseline inter-EOD potential computed for periods of 300 ms (mean duration of chirps or pharmacologically evoked chirp-like discharges $23,300 \pm 11$ ms and $34,008 \pm 70.43$ ms, respectively). Normalized noise-free variability of the baseline potential was calculated according to the formula:

$$\text{Baseline variability} = \left(\frac{\text{s.d.}}{\text{EOD amp.}} \times 100 \right)_{\text{mod}} - \left(\frac{\text{s.d.}}{\text{EOD amp.}} \times 100 \right)_{\text{pre}}, \quad (1)$$

where s.d. represents the standard deviation of 300 ms of the inter-EOD potential (the potential after the removal of full EODs from the EOD trace) measured during (mod) and before (pre) the EOD modulation, and EOD amp. is the average of the amplitude of 10 consecutive EODs taken immediately before the occurrence of the EOD modulation. Unless otherwise indicated, this method was used to compare baseline inter-EOD variability between experimental groups subjected to different manipulations. In some cases, estimation of inter-EOD variability normalized to EOD amplitude under a given experimental circumstance omitted the subtraction of basal (pre) noise variability.

Clampfit software was also used to fit the smooth onset and offset of EOD offs observed during behavior and of EOD interruptions evoked by GABA and glutamate injection to a single exponential function (Levenberg–Marquardt and sum of squared errors as search and minimization methods, respectively). The time constant of the onset (τ_{on}) and of the offset (τ_{off}) of the best exponential fit were determined.

The effects of the following substances (dissolved in 154 mmol l^{-1} NaCl) were assessed: L-glutamic acid (glutamate, 10 mmol l^{-1}), GABA (1 mmol l^{-1}), 4-aminopyridine (4-AP, $10\text{--}25 \text{ mmol l}^{-1}$) (all purchased from Sigma-Aldrich) and AVT ($1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ saline solution). The concentrations refer to the micropipette filling solutions. During pilot experiments, dose–response relationships were evaluated and concentrations of drugs were selected to produce maximal effects with minimum volumes.

Electrical stimuli were applied to the ALLn by way of a bipolar stimulating electrode. Stimuli consisted of single rectangular current pulses ($0.15\text{--}0.3 \text{ mA}$, $0.01\text{--}0.02 \text{ ms}$) that were applied using an S88 stimulator and a PSIU5 isolation unit (Grass Technologies). Stimulus strength was maximal as further increases of intensity did not evoke further increases in the amplitude of responses. A series of 10–30 stimuli were delivered either manually (minimum interval of 20 s) or at a rate of 0.05 Hz. The timing between each stimulus and the preceding EOD varied randomly. For each experiment, the electrical stimulation threshold value was determined as the intensity evoking any detectable change in EOD rate.

In vitro experimental procedures

Slice preparation

We followed similar surgical procedures to those for *in vivo* experiments except that the dorsal surface of the brain was totally exposed while bathed with cold Na-free artificial cerebrospinal fluid (ACSF)–sucrose solution (described in ‘Recording and stimulation’, below). The brain and part of the spinal cord were rapidly removed from the skull and submerged

in cold ACSF–sucrose solution. Transverse sections of the brainstem ($400 \mu\text{m}$ thick) containing the PN were obtained under cold ACSF–sucrose solution using a Vibratome 1000 plus (The Vibratome Company, St Louis, MO, USA), and were incubated ($>1 \text{ h}$, at room temperature, $21\text{--}23^\circ\text{C}$) in a 1:1 solution of ACSF–sucrose and control ACSF solution (see ‘Recording and stimulation’, below). Slices were transferred to a 2 ml recording chamber fixed to an upright microscope stage (Eclipse FN1, Nikon Company, Minato, Tokyo, Japan) equipped with infrared differential interference contrast (DIC) video microscopy and a $40\times$ water immersion objective. Slices were perfused with carbogen-bubbled ACSF ($1.5\text{--}3 \text{ ml min}^{-1}$) and maintained at room temperature ($20\text{--}23^\circ\text{C}$). Under these experimental conditions, the PN maintains its spontaneous synchronized activity with a stable firing rate for at least 6 h.

Recording and stimulation

The electric activity was monitored using an Axoclamp 2B amplifier (Molecular Devices) by recording intracellularly from R-cells using patch pipettes in the whole-cell configuration. The patch pipette ($5\text{--}10 \text{ M}\Omega$) was filled with a potassium gluconate-based intracellular solution (see below). Microelectrodes were placed under visual control with a hydraulic micromanipulator (Narishige, Setagaya, Tokyo, Japan). Signals were low-pass filtered at 3.0 kHz , sampled at 10.0 kHz through a Digidata 1322A (Molecular Devices) and stored on a PC for further analysis with the aid of the pCLAMP programs. Repetitive firing behavior of R-cells was explored by injecting slow current ramps (-2 to 2 nA , 4 s) in silenced PN, or long-lasting depolarizing pulses ($800\text{--}1000 \text{ ms}$, $1\text{--}4 \text{ nA}$) in spontaneously discharging neurons. When injecting current ramps, PN spontaneous rhythmic discharge was inhibited by adding a GABA_A receptor agonist (muscimol, $50 \mu\text{mol l}^{-1}$) to the perfusion solution (Spiro, 1997; Curti, 2007). In the presence of muscimol, in the absence of PM-cell input, R-cells do not fire action potentials spontaneously. Spikes evoked by current injection or the input resistance of these neurons are not significantly affected by muscimol. In some experiments ($n=6$), the consequences of blockade of slow I_A -like potassium currents of PN neurons on R-cell spontaneous firing behavior were analyzed by adding 4-AP (1 mmol l^{-1}) to the ACSF solution.

ACSF contained (in mmol l^{-1}): 124 NaCl , 3 KCl , $0.75 \text{ KH}_2\text{PO}_4$, 1.2 MgSO_4 , 24 NaHCO_3 , 10 D-glucose , 1.6 CaCl_2 , pH $7.2\text{--}7.4$ after saturation with carbogen (Spiro, 1997), while NaCl was replaced with 213 sucrose in ACSF–sucrose solution. Intracellular solution contained (in mmol l^{-1}): $140 \text{ potassium gluconate}$, 0.2 EGTA , 4 ATP-Mg , 10 Hepes , pH 7.3 . All substances were purchased from Sigma-Aldrich.

Statistics

All data were analyzed by non-parametric tests. Unless otherwise indicated, Mann–Whitney *U*-test was used for independent variables with sets of data from different fish, or for comparing dominants versus subordinates. For paired comparison, Wilcoxon test was used. Accordingly, data are expressed as median±median absolute deviation (MAD) throughout. Differences were considered statistically significant when *P*-values were less than 0.05.

RESULTS

Agonistic behavior

All dyads of non-breeding *G. omarorum* tested ($n=12$) displayed agonistic behavior immediately after the gate was removed and the dominant–subordinate status was established within a few minutes

with the expected contest outcome (i.e. the larger fish of the dyad always won the fight). In accordance with previous reports (Batista et al., 2012; Quintana et al., 2016), all the agonistic encounters also showed similar temporal profiles and followed the typical three phases: (1) a short pre-contest of 46.5 ± 43 s; (2) the contest, characterized by highly aggressive displays by both contenders with a duration of 228.5 ± 100 s; and (3) the 10 min post-contest phase, in which dominants, but not subordinates, persisted in attacking while subordinates attempted to flee and emitted submissive electric signals.

EOD offs and chirps were profusely emitted by subordinates (8/12 and 6/12 produced chirps and offs, respectively) after contest resolution, while three subordinates also displayed offs and/or chirps during the contest phase. As shown in Fig. 1B, offs are complete EOD cessations preceded by a smooth decrease in EOD rate with a time constant (τ_{on}) of -147.65 ± 105.91 ms ($n=12$) and followed by a progressive increase in EOD rate before reaching the regular previous EOD rate with a time constant (τ_{off}) of 156.78 ± 52.29 ms ($n=12$). Chirps are transient high-rate (170.95 ± 51.91 Hz, $n=20$) barrages of low amplitude and distorted waveform discharges (Fig. 1C, left). During chirps, the full-size EOD or its remnant at the same prior rate cannot be recognized. However, the time course of this chirp-related EOD cessation does not resemble that observed during the EOD off, as the chirp occurs suddenly, interrupting the normal regular discharge with no anticipated smooth decrease in EOD rate. In contrast, chirps are usually preceded by a smooth increase in EOD rate that slowly returns to baseline after the chirp (Fig. 1C, right). Because of the relatively high frequency of irregular discharges during the chirp, the variability of the recording was comparatively much higher ($3.199 \pm 0.183\%$) than that observed during the inter-EOD interval of the regular full-size EOD baseline discharge ($0.653 \pm 0.219\%$).

During the post-resolution phase, the dominant fish's attack rate was significantly higher than that of the subordinate fish (Fig. 2A). Moreover, 63% of the post-resolution attacks performed by dominants to chirping subordinates (145 out of the 231 attacks, $n=8$ dyads) occurred in a time window of 10 s around the emission of chirps, and 88 out of these 145 dominant attacks occurred

immediately before the occurrence of one chirp. As shown in Fig. 2B, the probability of occurrence of a dominant attack was maximal during the 1 s preceding the subordinate chirp, when 38.1% of the total post-resolution dominant attacks were observed. Therefore, a common feature of the post-resolution phase was the observation of the sequence: dominant approach–dominant attack–subordinate chirp–subordinate retreat.

Effects of intra-PN injection of glutamate and GABA in the subordinate fish

To explore whether submissive electric signals, offs and chirps, result from activation of NMDAR and AMPAR of R-cells, respectively, microvolumes of glutamate (10 mmol l^{-1}) were applied at different locations within the PN (Fig. 3). Injections at the level of R-cell somata in subordinate fish were ineffective in producing either chirps or EOD interruptions (Fig. 3B). We observed a small ($26.87 \pm 11.77\%$ of basal pre-injection rate) and slow (time constant of frequency rise of 189.78 ± 60.48 ms) transient increase in EOD rate with no changes in EOD amplitude (Fig. 3B, right). In contrast, when similar microvolumes were applied near PM-cells, transient EOD accelerations of $130.76 \pm 44.11\%$ increase with a significantly shorter time constant of frequency rise (87.36 ± 18.09 ms; $P=0.04$, $n=7$) were systematically evoked (Fig. 3C). The sensitivity of R-cells to glutamate was further explored by comparing baseline inter-EOD variability observed immediately after glutamate injection ($0.089 \pm 0.025\%$ of EOD amplitude), which was significantly smaller than that observed during the natural chirp ($3.199 \pm 0.183\%$; $P=0.02$, $n=7$; Fig. 3D) and similar to that observed during the regular pre-injection discharge ($0.565 \pm 0.155\%$ of EOD amplitude, $P=0.81$, $n=7$). In addition, no changes in EOD amplitude were observed after glutamate injection at R-cells; pre-injection values did not differ from post-injection ones (Wilcoxon signed-rank test, pairing pre- and post-injection values, $P=0.69$, $n=7$).

GABA applied at the level of PM-cell somata evoked interruptions of the EOD (Fig. 4A, left) that were preceded by a slow decrease in EOD rate (Fig. 4A, right) with a τ_{on} of 174.27 ± 113.13 ms ($n=7$). Immediately after interruptions, EOD rate slowly returned to pre-injection values with a τ_{off} of

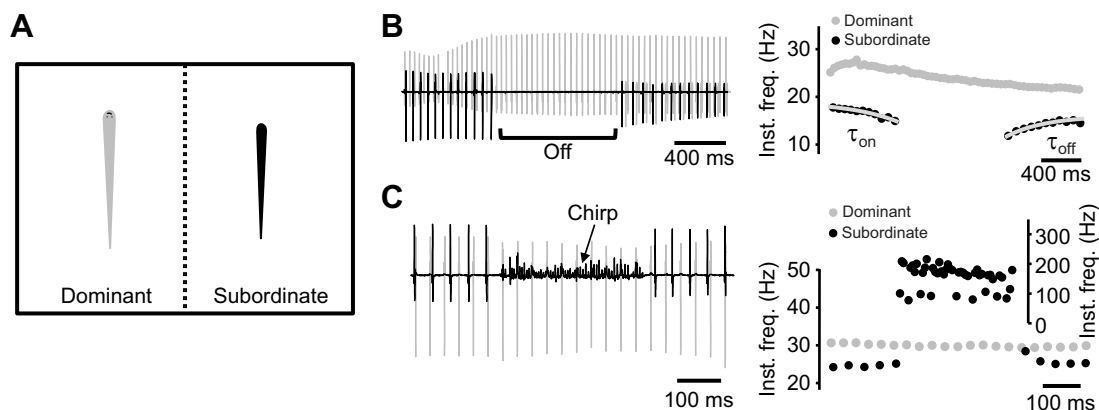


Fig. 1. Electric displays of subordination and dominant aggression during the post-resolution phase of the agonistic behavior of *Gymnotus omarorum*. (A) Schematic drawing of the arena used for behavioral experiments, indicating the size asymmetry of dominant and subordinate contenders. (B) EOD off. Left: post-resolution dyadic electric organ discharge (EOD) recordings showing the cessation of the subordinate's discharge (black trace) while the dominant fish retains its regular discharge (gray trace). The EOD off of the subordinate is indicated by a horizontal square bracket. Right: dominant and subordinate instantaneous EOD rate versus time during the recording illustrated on the left. Single exponential fittings (gray traces) are superimposed at the onset (τ_{on}) and offset (τ_{off}) of the transient EOD interruption. (C) Chirp. Left: post-resolution dyadic EOD recordings showing the subordinate's chirp (black trace) while the dominant fish retains its regular discharge (gray trace). The submissive chirp is indicated by the arrow. Right: dominant and subordinate instantaneous EOD rate versus time during the recording illustrated on the left. The left ordinate axis indicates full EOD rates while the right ordinate axis indicates the intra-chirp rate.

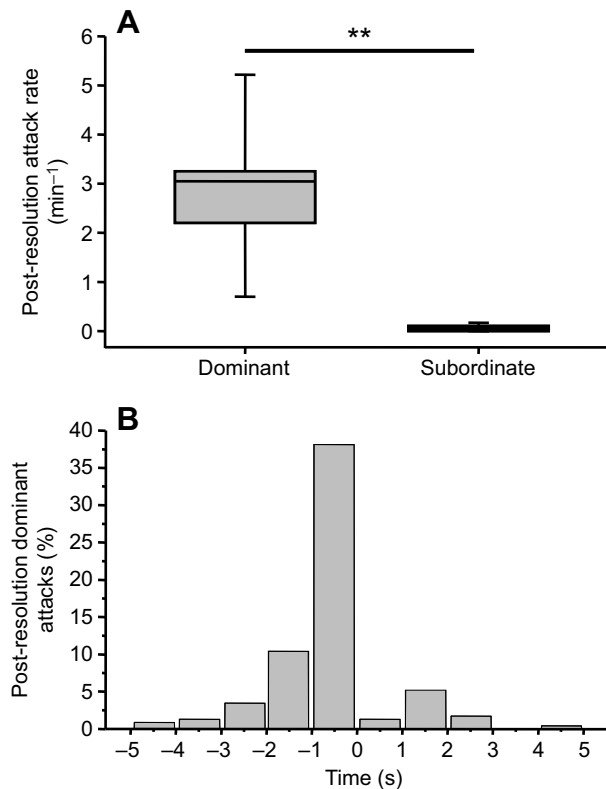


Fig. 2. Emission of chirps by the subordinate fish is correlated with the occurrence of dominant attacks. (A) Box plots of post-resolution attack rate (number per minute) of dominants ($3.05 \pm 0.25 \text{ min}^{-1}$) and subordinates ($0.1 \pm 0.05 \text{ min}^{-1}$) (Mann–Whitney U -test, $**P < 0.010$, $n = 12$ dyads). The boundary of the box closest to zero indicates the 25th percentile, a line within the box marks the median, and the boundary of the box farthest from zero indicates the 75th percentile. Error bars above and below the box indicate the 90th and 10th percentiles. (B) Peri-chirp time histogram of post-resolution dominant attacks (as a percentage of the total post-resolution dominant attacks recorded in the eight dyads in which subordinates emitted chirps) occurring in a time window of -5 to $+5$ s around each subordinate chirp. Chirp occurrence is indicated by 0 on the time axis.

$148.97 \pm 32.29 \text{ ms}$ ($n = 7$). Smaller volumes caused transient decreases in EOD rate instead of interruptions (data not shown). Similar volumes applied near R-cells were almost ineffective in changing EOD rate or amplitude (Fig. 4B). Usually, the injected volume was adjusted to provoke interruptions lasting the same length of time as behavioral interruptions ($\sim 2500 \text{ ms}$). The median τ_{on} and τ_{off} of the behavioral offs ($-147.65 \pm 105.91 \text{ ms}$ and $156.78 \pm 52.29 \text{ ms}$; $n = 12$) did not differ from these GABA-induced interruptions (Fig. 4C; $P = 0.89$ for τ_{on} and $P = 0.47$ for τ_{off}).

Experimental induction of chirping behavior

As the production of chirps by the subordinate fish during the agonist encounter was tightly correlated with the occurrence of dominant attacks (Fig. 2B), we tested whether an intense sensory stimulation was a prerequisite for the production of chirps. For this purpose, we mimicked the sensory pattern of activation presumably induced in the subordinate after the dominant attack by the electrical stimulation of the ALLn in immobilized subordinate fish ($n = 5$, white arrowhead in Fig. 5A,B). Electrical stimulation of the ALLn evoked transient increases of the EOD rate with a median peak amplitude of $31.99 \pm 3.33 \text{ Hz}$, a $289.63 \pm 32.86\%$ increase from basal pre-stimulus rate (Fig. 5A). Typically, after ALLn stimulation, EOD

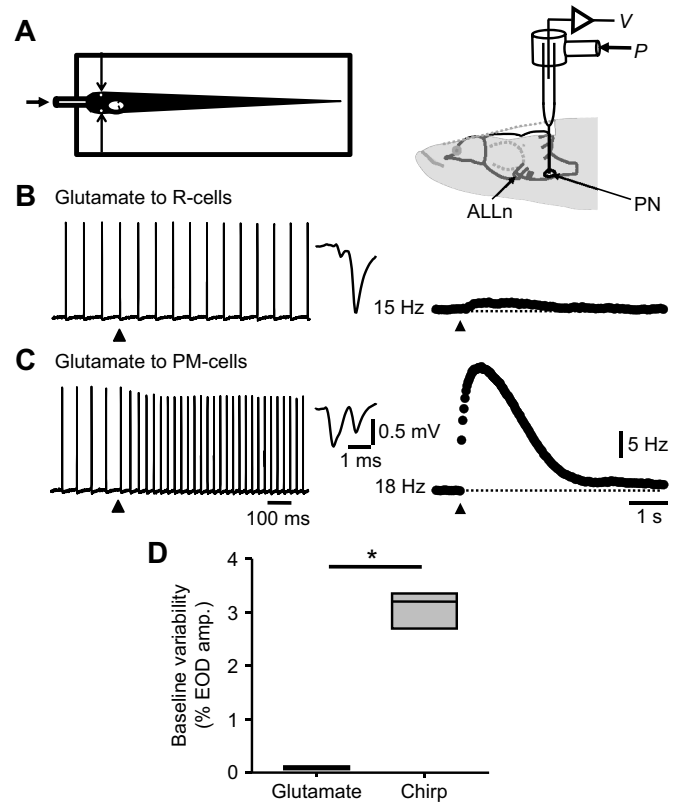


Fig. 3. Glutamate injection within the pacemaker nucleus (PN) of subordinate fish. (A) Left: sketch of the box used for *in vivo* recordings and drug application at the PN. The white oval surface illustrates the opening of the skull for lowering microelectrodes to the PN. The head was fixed by two lateral bars, and a tube inserted through the mouth was used to perfuse continuously aerated aquarium water (horizontal arrow). Right: schematic drawing of a lateral view of the fish's head including the brain and part of the spinal cord. A micropipette for extracellular recording (V) and pressure drug application (P) lowered to the PN is depicted. ALLn, anterior lateral line nerve. (B) Left: raw head-to-tail recordings of EOD from a partially curarized animal obtained before and after injection of 10 mmol l^{-1} glutamate (black arrowhead, 10 ms , 10 psi) at the level of relay cell (R-cell) somata as confirmed by the waveform of the PN field potential depicted in the inset (average of 30 individual field potentials). Right: instantaneous EOD frequency versus time plot of the response to glutamate injection illustrated on the left. (C) Same as B but a similar volume of glutamate was injected in the same fish, dorsally, at the level of pacemaker cell (PM-cell) somata (typical field potential in the inset, average of 30 individual field potentials). The two sites of injection were located $300 \mu\text{m}$ apart along the same vertical micropipette track. For right panels in B and C, dotted lines and numbers on the left indicate basal pre-injection EOD rates. (D) Box plot of baseline inter-EOD variability free of noise at the peak of the response to glutamate applied to R-cells and during the natural chirps normalized to the EOD amplitude (Mann–Whitney U -test, $*P = 0.02$, $n = 7$).

rate increased abruptly (time to peak of $76.80 \pm 16.15 \text{ ms}$) and slowly returned to baseline with a time constant of $351.14 \pm 75.16 \text{ ms}$ (Fig. 5A, left). In spite of the range of intensities explored, electrical stimulation of the ALLn was ineffective in eliciting chirps by itself (Fig. 5A). In some experiments ($n = 3$), electrical stimulation of the ALLn was combined with glutamate injection at R-cells using different timings between the two challenges. This combined stimulation pattern was also ineffective in eliciting chirps (data not shown). However, when associated with an increase in R-cell excitability by local application of 4-AP, a blocker of I_A -type voltage-activated K^+ conductance, electrical stimulation of the ALLn systematically elicited chirp-like discharges (Fig. 5B). These

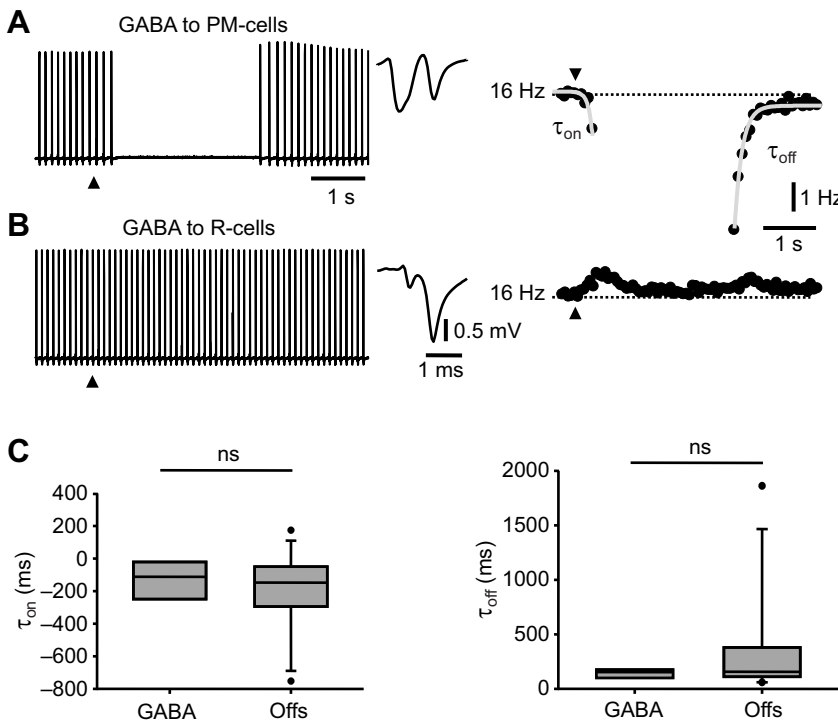


Fig. 4. GABA injections within the PN of subordinate fish.

(A) Left: raw head-to-tail recordings of EODs from a partially curarized animal obtained before and after injection of 1 mmol l^{-1} GABA (black arrowhead, 50 ms, 10 psi) at the level of PM-cell somata as indicated by the waveform of the PN field potential depicted in the inset (average of 30 individual field potentials). Right: instantaneous EOD frequency versus time plot of the response to GABA injection illustrated on the left. Single exponential fittings (gray traces) are superimposed at the onset (τ_{on}) and the offset (τ_{off}) of the transient EOD interruption. (B) Same as A but GABA was injected 300 μm from PM-cells in the ventral direction in the same vertical micropipette track, at the level of R-cell somata (characteristic field potential in the inset, average of 30 individual field potentials). For right panels in A and B, dotted lines and numbers on the left indicate basal pre-injection EOD rates. (C) Box plots of the time constant of the onset (τ_{on} , left) and offset (τ_{off} , right) of EOD interruptions evoked by GABA ejected near the PM-cells (GABA, $n=7$) and of the natural interruptions observed during agonistic contests (offs, $n=12$) (Mann–Whitney U -test, $P=0.89$ and $P=0.47$ for τ_{on} and τ_{off} , respectively; ns, not significant). Dots are outliers.

signals consisted of transient (340.08 ± 70.43 ms duration), high-rate (178.55 ± 43.04 Hz) barrages of low-amplitude discharges of the electric organ (inset in Fig. 5B, right). The stimulation of the ALLn by itself was also ineffective in increasing baseline inter-EOD variability, which did not differ from pre-stimulation baseline inter-EOD variability ($P=0.84$) and was significantly lower than that observed during chirp-like discharges ($P<0.01$; Fig. 5C). Although some spontaneous chirp-like discharges were observed, 88.4% occurred during the first 200 ms after ALLn stimulation (Fig. 5D). An example of the effects of 4-AP applied to R-cells on PN extracellular electrical activity evoked by activation of ALLn afferents is given in Fig. 6. Before 4-AP application, field potentials evoked by ALLn stimuli recorded at the level of R-cell somata consisted of a short-latency (latency to peak ~ 4 ms), brief (20–30 ms), positive potential (Fig. 6A), suggestive of a passive depolarization of R-cells. Shortly (1–2 min) after the injection of 4-AP, the ALLn stimulus evoked a relatively long-lasting (300 ms) negative field potential that followed the positive potential (Fig. 6B). Coincidentally with this negative potential in the extracellular recording at R-cells, an incipient chirping activity characterized by the occurrence of isolated extra-EOD small irregular discharges was observed in the EOD recording.

Chirp-like discharges closely resembled natural behavioral chirps in many critical aspects such as the intra-chirp discharge rate and the changes in baseline inter-EOD variability (Fig. 7). Both electrical signals consisted of transient high-rate barrages of low amplitude and distorted waveform discharges of the electric organ (Fig. 7A,B, left). The discharges of the behavioral and pharmacologically induced chirps were similar and exhibited similar modal values in frequency histograms (~ 180 Hz; Fig. 7A,B, right). Overall, the intra-chirp rate of chirp-like discharges (178.55 ± 43.04 Hz) was marginally higher than that of natural chirps (170.95 ± 51.91 Hz) (Fig. 7C; $P=0.06$, $n=20$). Baseline inter-EOD variability of chirp-like discharges and behavioral chirps was also marginally different ($3.92 \pm 0.37\%$ versus $3.20 \pm 0.18\%$, respectively, $P=0.05$). Finally,

the duration of the two electromotor displays was not statistically different (340.08 ± 70.43 ms and 233 ± 11 ms for chirp-like discharges and natural chirps, respectively, $P=0.55$).

As AVT has been reported to be a status-dependent modulator of *G. omarorum* agonistic behavior (Perrone and Silva, 2018), we explored the effect of AVT applied at different locations within the PN in subordinate immobilized fish ($n=6$). In 4 out of 6 experiments, AVT was ineffective in eliciting any change of the electromotor pattern. In the two remaining experiments, AVT evoked small-amplitude chirp-like discharges with different latencies (Fig. 8). When applied to R-cells, a burst of high-rate discharges was observed immediately after AVT injection (Fig. 8B, trace 1) followed by small-amplitude repetitive discharges (Fig. 8B, trace 2). Injection of AVT at the level of PM-cells evoked rhythmic barrages of small-amplitude discharges at a high rate (Fig. 8C,D), similar to those observed after application of AVT to R-cells but with a longer delay (13 s). In both cases, during chirp-like discharges, the EOD kept its regular rate. Putative effects of AVT were reversible and bursts of discharges were no longer observed 20 min after injection.

Cellular basis of chirp-like discharges

We conducted a series of experiments to explore, in a CNS *in vitro* preparation containing the PN, the capacity of R-cells to sustain a high-rate repetitive discharge of action potentials when depolarized (Fig. 9) as well as to investigate changes of R-cell excitability produced by 4-AP (Fig. 10). Under perfusion of control solution, R-cells showed a spontaneous rhythmic (<15 Hz) activity similar to that observed in *in vivo* preparations (e.g. Curti et al., 2006). R-cells exhibited a relatively hyperpolarized basal membrane potential (-73.9 ± 1.8 mV) and action potentials arising abruptly from the baseline (Fig. 9B). Pulse-evoked depolarization elicited the discharge of small-amplitude action potentials at a high rate (130–190 Hz; Fig. 9C). The occurrence of spontaneous rhythmic discharges that followed 1:1 the regular pacemaker command

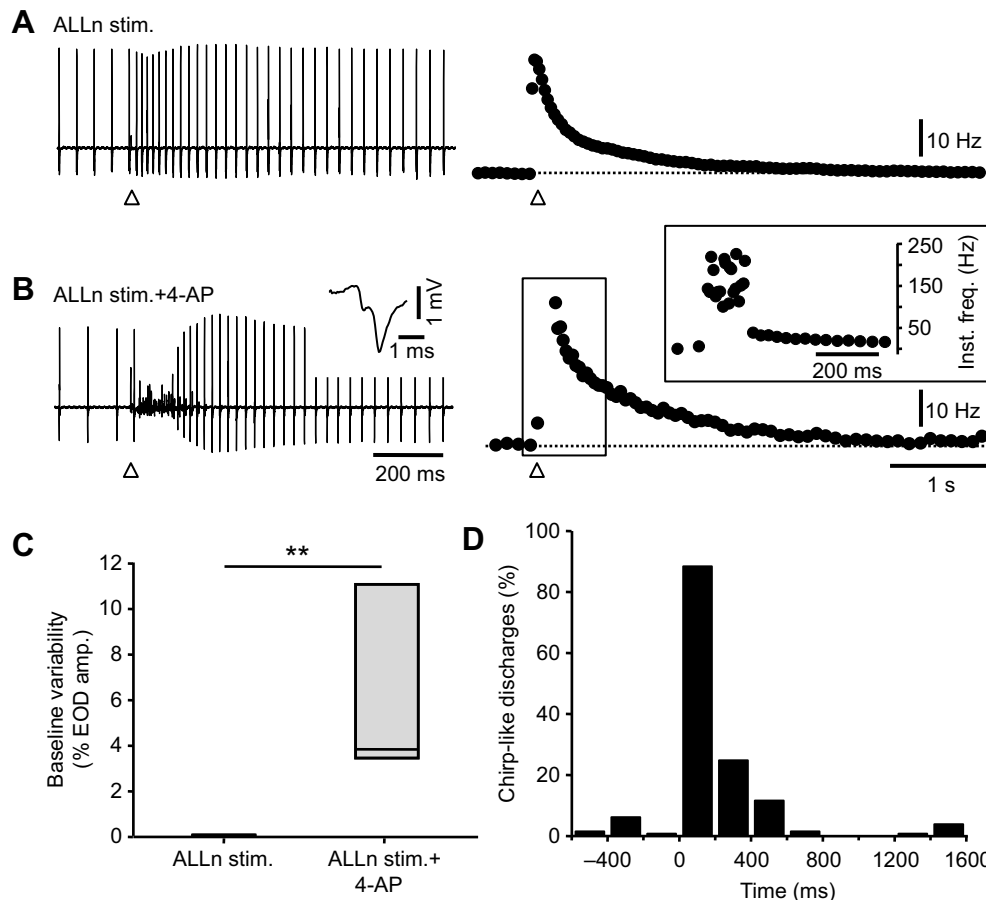


Fig. 5. Production of chirp-like discharges. (A) Left: raw head-to-tail EOD recordings obtained before and after electrical stimulation of the ALLn (white arrowhead). Right: instantaneous EOD frequency versus time plot of the response to ALLn stimulation. The dotted line indicates a pre-stimulation EOD rate of 13.5 Hz. (B) Same as A but responses to ALLn stimulation were obtained 2 min after the application of a microvolume of 10 mmol l⁻¹ 4-AP (20 ms, 20 psi) at the level of R-cell somata as indicated by the waveform of the PN field potential depicted in the inset. The dotted line in the instantaneous EOD frequency versus time plot indicates a pre-stimulation EOD rate of 9 Hz. Inset: instantaneous EOD frequency versus time plot of the region of the response delimited by the box. The gain of the instantaneous frequency axis was changed to include the frequency range of the intra-chirp-like discharge (100–250 Hz) in the plot. (C) Box plot of baseline inter-EOD variability free of noise at the peak of the response to ALLn stimulation (ALLn stim., $n=5$) and during the chirp-like discharges evoked by ALLn stimuli after 4-AP injection at R-cells (ALLn stim.+4-AP, $n=5$) (Mann–Whitney U -test, $**P<0.01$). (D) Peri-stimulus time histogram of chirp-like discharges during the first 15 min after intra-PN 4-AP applications in 5 animals. The number of chirp-like discharges is expressed as a percentage of the total ALLn applied stimuli (0 on the time axis).

minimally altered repetitive R-cell discharge evoked by the depolarizing pulse. In the silenced PN by perfusion of GABA agonists (Fig. 9D), depolarization-induced repetitive firing of R-cells was further characterized by injecting slow ramp depolarizing currents. Characteristically, discharge rate increased almost linearly with depolarization (16.39 ± 4.87 Hz mV^{-1}) until reaching a maximum rate (Fig. 9D, inset) and neurons usually inactivated at membrane potentials more positive than -45 mV.

The perfusion of 1 mmol l⁻¹ 4-AP provoked the cessation of spontaneous PN rhythmic activity after 6 ± 1 min of perfusion, which was recovered after 62 ± 32 min of washout with normal solution ($n=6$). Before the complete cessation of PN activity, R-cells showed spontaneous rhythmic (900 ± 200 ms mean interval) abrupt transient plateau depolarizations that elicited bursts of small-amplitude action potentials at a high rate (136 ± 68 Hz; Fig. 10A, inset). During the bursts there was an apparent interruption of rhythmic PN full activation. At this stage, R-cells were depolarized (basal membrane potential -60.1 ± 9.0 mV) and full regular spikes were followed by depolarizing afterpotentials and several spikelets (Fig. 10A). In the silent PN, plateaus were still observed as rhythmic (Fig. 10B;

~ 700 ms interval), abrupt and long-lasting depolarizations that usually elicited the discharge of action potentials at a high rate (Fig. 10B), although on some occasions, subthreshold plateaus were also observed in intracellular recordings of other cells in the same slice (not shown).

DISCUSSION

Since the pioneering work of Heiligenberg (reviewed in Heiligenberg, 1991), based on extensive work on both pulse- and wave-type gymnotiform fish (Dye et al., 1989; Kawasaki and Heiligenberg, 1989, 1990; Keller et al., 1991; Kennedy and Heiligenberg, 1994; Spiro et al., 1994; Spiro, 1997; Curti et al., 1999; Caputi et al., 2005; Quintana et al., 2011, 2014), it has been accepted that the EOD rate modulations depend on electromotor behavior-specific innervation patterns combining the neurotransmitter receptor subtype and the target cell type within the PN. Specifically, in *G. omarorum*, the absence of chirps and sudden interruptions among the electromotor behaviors displayed by this species (Black-Cleworth, 1970; Westby, 1974, 1975; Kramer et al., 1981; Barrio et al., 1991) fitted with the lack of

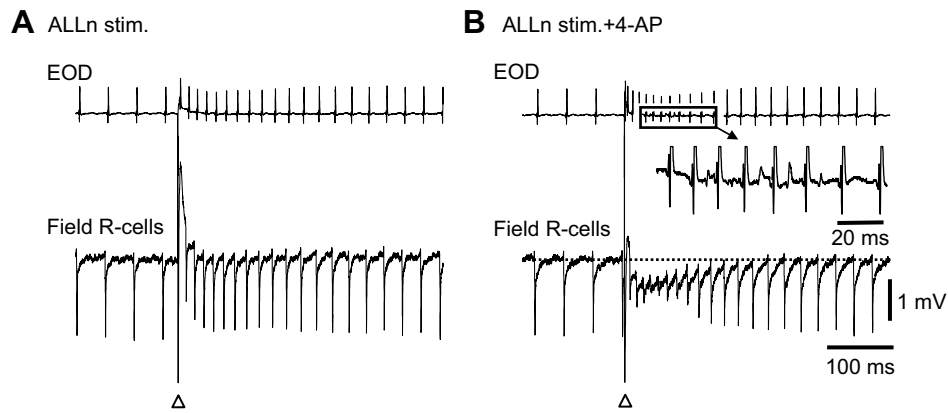


Fig. 6. Changes of the ALLn-evoked PN field potentials during chirp-like discharges. (A) Simultaneous raw head-to-tail EODs recordings (upper trace, EOD) and field potential recorded at the level of R-cell somata (lower trace, Field R-cells) obtained before and after the application of a single maximal electrical stimulus to the ALLn (white arrowhead). (B) Same as A but responses to ALLn stimulation were obtained 2 min after the application of a microvolume of 10 mmol l^{-1} 4-AP (30 ms, 20 psi) at the level of R-cell somata. The dotted line indicates the 0 mV potential level and is depicted to highlight the occurrence of a slow negative potential evoked by ALLn stimulation under the effects of locally applied 4-AP. Part of the EOD response to ALLn stimulation (boxed region) is displayed at a higher gain and faster sweep speed. The occurrence of the slow negative evoked potential coincides with the appearance of chirping activity in the EOD recording.

evidence supporting the activation of the R-cells of their PN through AMPAR and NMDAR (Curti et al., 1999). New evidence obtained in this species, however, challenged the current conception

regarding the neural underpinnings of the electromotor repertoire in gymnotiform fish. As an unequivocal electrical social signal of submission after the resolution of agonist encounters, only

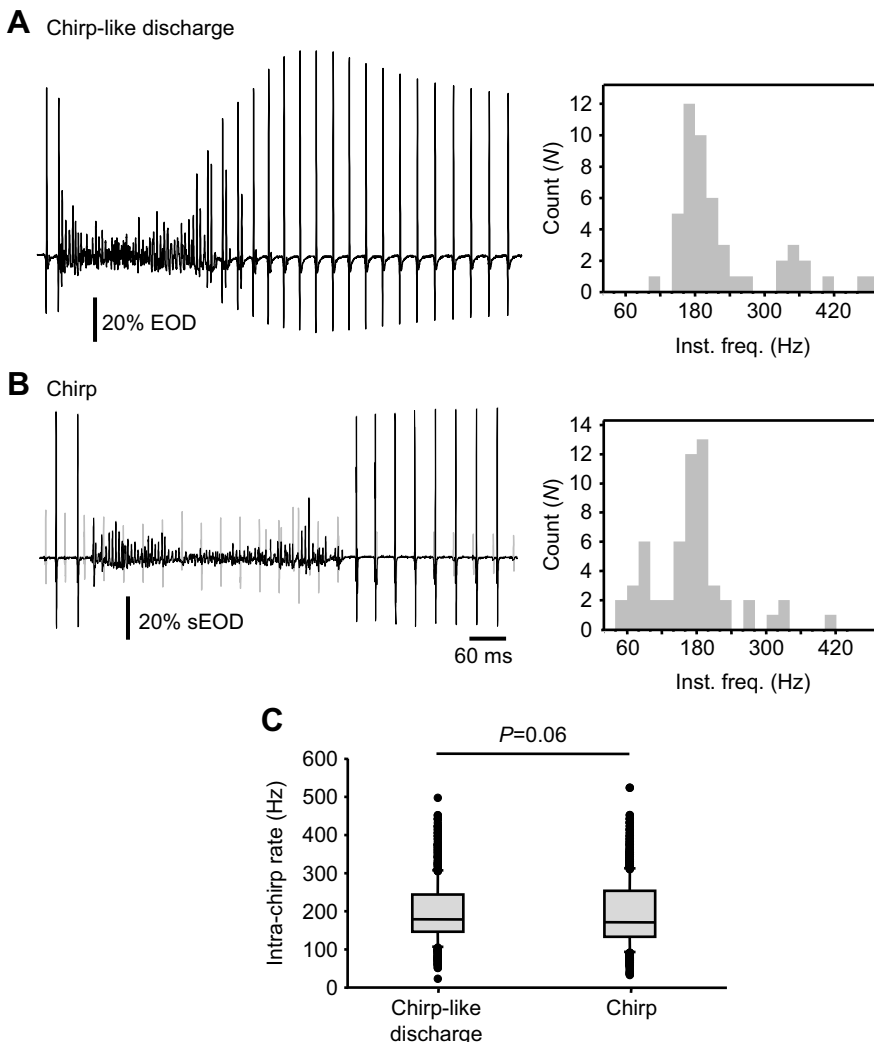


Fig. 7. Similarities of pharmacologically induced chirp-like discharges and natural behavioral chirps. (A) Raw head-to-tail EOD recording (left) and intra-chirp frequency histogram (right) of a spontaneous chirp-like discharge observed in a partially curarized fish 5 min after local injection of 10 mmol l^{-1} 4-AP (20 ms, 20 psi) near R-cell somata. (B) Behavioral dyadic EOD recordings showing a typical chirp emitted by the subordinate fish (left, black trace) and the intra-chirp frequency histogram (right). Because of the position of each fish relative to the recording electrodes in the arena, the dominant fish (gray trace) exhibited an EOD with lower amplitude. sEOD, subordinate EOD. (C) Box plot of the intra-chirp discharge rate of chirp-like discharges and natural behavioral chirps (Mann–Whitney U -test, $P=0.06$).

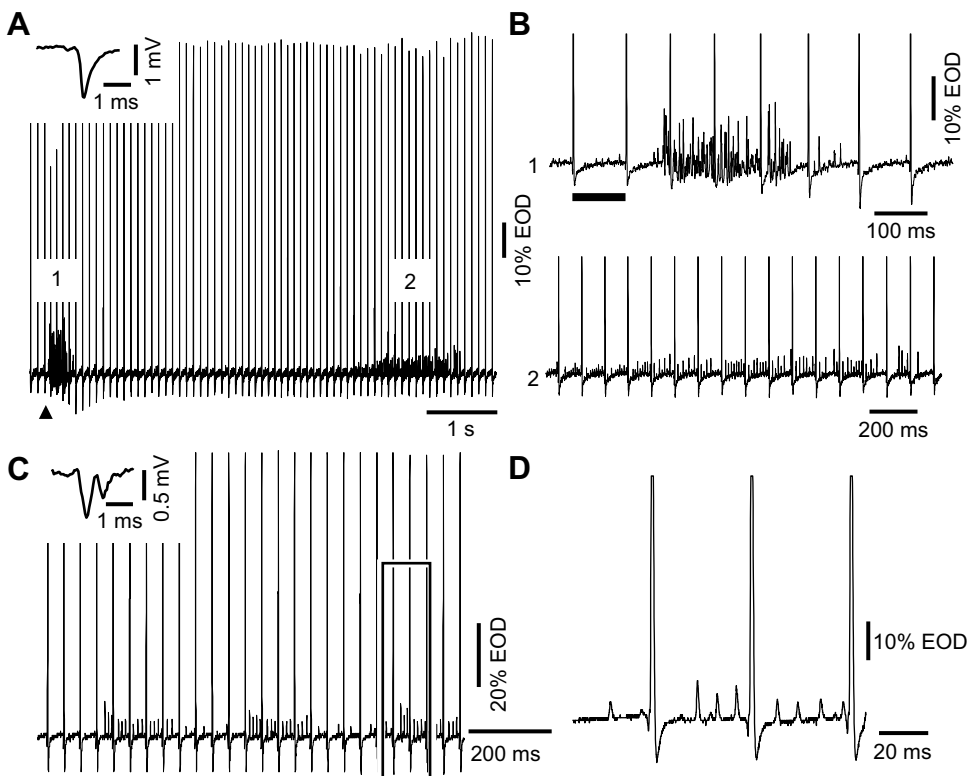


Fig. 8. Effects of intra-PN injection of 8-arginine vasotocin (AVT) in the subordinate fish. (A) Raw head-to-tail recordings of EODs before and after injection of a microvolume of 1 mmol l^{-1} AVT (black arrowhead, 100 ms, 20 psi) near R-cell somata, as indicated by the waveform of the PN field potential depicted in the inset. Two different discharge patterns of the electric organ (indicated by 1 and 2 on the recording) that occur while the EOD keeps its regular rate are illustrated in B (traces 1 and 2) at higher gain and faster sweep speed. In trace 1, injection of AVT is illustrated by the horizontal bar. In both traces, the peak of the regular full EOD was truncated. (C) Same as in A but the recording was obtained 130 s after the application of a microvolume of AVT (250 ms, 20 psi) in the vicinity of PM-cells, as indicated by the waveform of the PN field potential depicted in the inset. (D) Details of discharges shown in C (boxed region) displayed at higher gain and faster sweep speed. As in B, the peak of regular full EOD was truncated.

subordinate fish emit chirps and interrupt their EOD emission (Batista et al., 2012). Given that the adaptation of the electric repertoire to different environmental demands has been demonstrated to rely on context-dependent modification of the PN innervation pattern (Quintana et al., 2011, 2014), in the present study the presence of glutamate receptors in PN neurons was re-examined in subordinate fish that were emitting EOD offs and/or chirps 30 min (or less) before the experiment. In spite of this, we failed to obtain any evidence indicating direct glutamatergic activation of R-cells via AMPA or NMDA receptors in these fish. It is unlikely that the extracellular concentration of glutamate applied locally in this work was insufficient to activate R-cell glutamate receptors. Local application of microvolumes of glutamate is a common experimental technique that has been extensively used in the CNS of gymnotiform fish species to mimic the action of this neurotransmitter (Dye et al., 1989; Kawasaki and Heiligenberg, 1989, 1990; Keller et al., 1991; Curti et al., 1999; Metzner, 1999; Zupanc, 2002; Comas and Borde, 2010; Quintana et al., 2011, 2014). Here, we used similar parameters of glutamate application to those utilized in many of these studies. Moreover, the amplitude of rate responses provoked by glutamate applied to PM-cells in our experiments was similar to that of responses provoked by activation of the Mauthner cells in this species (Falconi et al., 1997; Curti et al., 1999, 2006; Comas and Borde, 2010), suggesting that the amount of glutamate applied to PN neurons was in the physiological range. The possibility of uneven (and probably asynchronous) activation of a few scattered R-cells by glutamate injections is also unlikely. This type of R-cell activation through AMPARs would increase the baseline inter-EOD variability, equivalent to subtle chirping activity, whereas if NMDARs were involved, a decrease in EOD amplitude would be expected as the result of NMDAR-mediated inactivation of a small group of R-cells. None of these effects were evoked by glutamate when applied to R-cells. In spite of the above arguments against the possibility

of activation of glutamate receptors of R-cells, the occurrence of glutamate-evoked subthreshold depolarization of these cells without any detectable consequence in the EOD recordings (even during strong ALLn stimulation) cannot be definitely ruled out in our experiments. Taken together, the above considerations indicate that alternative non-glutamatergic mechanisms should operate at the PN to produce submissive electrical signals in *G. omarorum*.

Mechanisms of submissive EOD interruptions

Cessations in the emission of electric signals have been recognized as general submissive displays in several species (Black-Cleworth, 1970; Westby, 1975; Batista et al., 2012; Zubizarreta et al., 2012). The characteristic time course of onset and offset of interruptions together with a stable potential in head-to-tail recordings during the absence of regular discharges allowed us to identify this submissive signal as being distinct from sudden interruptions provoked by NMDAR-mediated sustained depolarization of R-cells. Glutamatergic sudden interruptions usually occur without significant leading or following modulation of EOD rate (Kawasaki and Heiligenberg, 1989; Spiro, 1997; Caputi et al., 2005; Quintana et al., 2011). Moreover, as the onset and offset of EOD interruptions evoked by injection of microvolumes of GABA at PM-cells exhibited almost the same time course to that observed during behavioral offs, our results suggest that offs most likely result from the activation of GABA receptors on PM-cells. Although this is the first report of the effects of GABA on PN discharge in *G. omarorum*, similar results were obtained in *Brachyhyppopomus*, in which interruptions were also evoked by stimulation of specific diencephalic structures containing inhibitory pacemaker neurons and blocked by GABA antagonists applied to the PN (Kawasaki and Heiligenberg, 1989, 1990). Although these pacemaker structures have not been described yet in *G. omarorum*, GABAergic pacemaker neurons could be selectively activated by descending inputs to produce offs

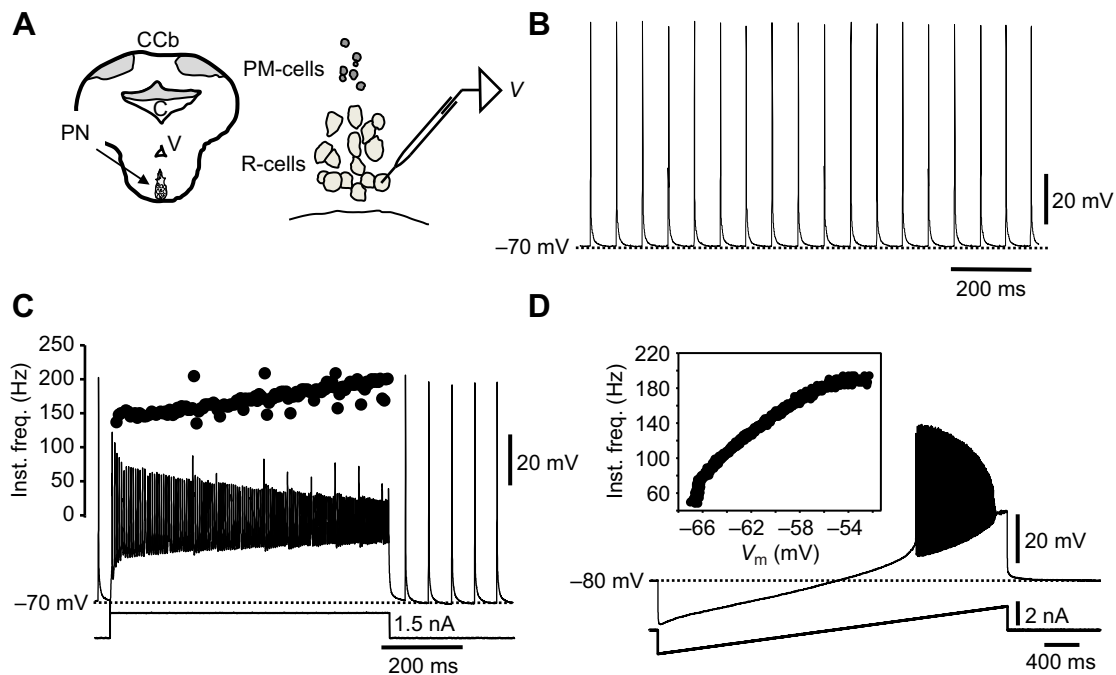


Fig. 9. Depolarization of R-cells *in vitro* elicits repetitive discharge of action potentials at a high rate. (A) Schematic drawing of the experimental design for *in vitro* experiments. Left: outline of a representative transverse brainstem slice containing the PN, V, ventricle; CCB, corpus cerebelli; C, cerebello-medullary cistern. Right: diagrammatic representation of a transverse section of the PN. The somas of PM-cells and R-cells are indicated. An intracellular recording electrode inserted in an R-cell is also illustrated. The line below the R-cell somata represents the ventral limit of the brainstem slice. (B) Intracellular activity of an R-cell exhibiting spontaneous and rhythmic discharges. (C) Bottom: a long-lasting constant depolarizing current pulse (lower trace) evokes the discharge of small action potentials at a high rate. Top: instantaneous frequency versus time plot of discharges during the pulse. In B and C (same cell), dotted lines indicate the membrane potential (values on the left). (D) Intracellular recording of a representative R-cell obtained in a silenced PN by perfusion of a GABA-A receptor agonist ($50 \mu\text{mol l}^{-1}$ muscimol). Depolarizing slow ramp current (lower trace) elicited a quasi-linear depolarization until the threshold for action potentials was reached and triggered a burst of discharges at increasing frequency (upper trace). The dotted line indicates the resting membrane potential (value on the left). Inset: instantaneous frequency versus membrane potential (V_m) plot of the discharges evoked by the current ramp.

in the subordinate fish. However, this speculation is difficult to experimentally test as it requires, for example, evaluation of the effects of the blockade of GABA receptors of PM-cells in the behaving animal.

Mechanisms of submissive chirps

In gymnotiform fish, chirps consist of transient (50–400 ms) high-rate barrages of low-amplitude, distorted-waveform discharges that are produced by repetitive discharge of R-cells at a high rate (up to 180–200 Hz) in response to a transient suprathreshold AMPAR-mediated depolarization (Kawasaki and Heiligenberg, 1989, 1990; Spiro, 1997; Quintana et al., 2014). In *G. omarorum*, submissive chirps exhibited similar high-rate, low-amplitude discharges of the electric organ and probably also rely on the repetitive high-rate discharge of R-cells, although, unlike *Brachyhypopomus*, the suprathreshold depolarization of these cells cannot be explained by ionotropic glutamate receptor activation. One alternative mechanism for R-cell depolarization in this species involves their passive depolarization secondary to PM-cell depolarization evoked by excitatory inputs as the two groups of cells are electrotonically coupled (Bennett et al., 1967; Bennett, 1971). Several lines of evidence suggest that this might occur in the subordinate fish. First, previous work indicates that PM-cells are the exclusive direct cellular target of prepacemaker glutamatergic inputs to the PN in *G. omarorum* (Falconi et al., 1997; Curti et al., 1999, 2006). Second, the close correlation of submissive chirps with dominant attacks indicates that chirp emission is probably associated with a strong excitatory drive upon the PN derived from the massive

recruitment of sensory afferent inputs elicited by the assault. Finally, the fact that submissive chirps are usually preceded by a gradual increase and followed by a slow decline in EOD rate suggests that the depolarization of PM-cells is critical for chirp production. In this study, the activation of sensory inputs provoked by the dominant attack to the subordinate fish was mimicked by electrical stimulation of the ALLn at a high strength. The short-latency positive extracellular potential recorded at the level of R-cells provoked by the activation of these sensory afferents suggests that depolarizing inputs to PM-cells can passively depolarize the R-cells. However, although strong ALLn stimulation induced an abrupt and long-lasting acceleration of the EOD, indicative of a large depolarization of PM-cells, it was ineffective in eliciting chirps. Probably, during the contest in the behaving fish, concurrent activation of inputs of other sensory modalities (Moller, 2002) as well as of descending neuromodulatory influences upon the electromotor system (see below) is required to stimulate the emission of chirps in the subordinate fish.

As in *Brachyhypopomus* (Spiro, 1997), we demonstrated that *G. omarorum* R-cells can indeed discharge action potentials at a high rate (up to 200 Hz) when depolarized. According to the level of membrane depolarization, R-cells can discharge repetitively at rates in the range of intra-chirp rates observed during submissive chirps and chirp-like discharges. Consequently, a concurrent increase in R-cell excitability boosting the response of these cells to passive depolarization is probably needed to bring these cells to fire repetitively during chirps. Here, an increase in R-cell excitability was induced by 4-AP, a K^+ channel blocker that has been widely used as a pharmacological tool for both experimental and

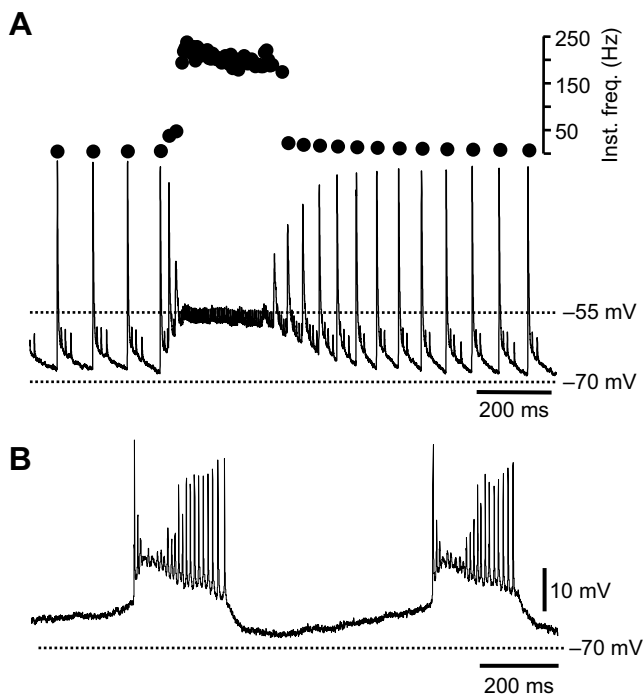


Fig. 10. Effects of 4-AP on R-cell electrophysiology. Whole-cell patch recordings of R-cells perfused with 1 mmol l^{-1} 4-AP. (A) Instantaneous frequency versus time plot (top) of rhythmic full R-cell discharges and of high-rate discharge during the spontaneous plateau potential (bottom). (B) Spontaneous rhythmic plateau potentials of a representative R-cell recorded in a PN silenced by 4-AP. A and B are from different experiments. Dotted lines represent membrane potential values indicated by the numbers on the right.

therapeutic purposes (Kita et al., 1985; Jahnsen, 1986; Bekkers and Delaney, 2001; Hayes, 2004; Avoli and Jefferys, 2016). In a concentration-dependent manner, 4-AP is particularly effective as a blocker of K^+ channels of the broad I_A -type family, increasing neuronal excitability and facilitating the discharge of transient depolarizing plateau potentials (Kita et al., 1985; Voskuyl and Albus, 1985; Szenté and Baranyi, 1989). In wave-type gymnotiform fish, pharmacological evidence obtained *in vitro* suggests that a 4-AP-sensitive potassium current is involved in the control of excitability of PN neurons although plateau potentials have not been reported (Dye, 1991; Smith, 1999; Smith and Zakon, 2000). Low concentrations of 4-AP initially increased pacemaker firing frequency and, shortly after, stopped pacemaker firing. In *G. omarorum*, in addition to stopping pacemaker firing, bath application of 4-AP increased excitability of R-cells, leading to the discharge of a burst of spikelets at a high rate (150–250 Hz) following each rhythmic action potential and during spontaneous transient depolarizing plateau potentials. Under blockade of 4-AP-sensitive K^+ channels of R-cells *in vivo*, subordinate fish emit spontaneous chirp-like discharges, the occurrence of which was greatly facilitated by strong synaptic depolarization of PM-cells. These results suggest that 4-AP-sensitive K^+ channels may participate in the control of excitability of PM- and R-cells in *G. omarorum* and signals probable differences in the functional role of this membrane conductance in the PN of wave-type gymnotiform fish.

Boosting the responses of R-cells to passive depolarization by blocking K^+ channels of the broad I_A -type family may be the basis of submissive chirp emission. Moreover, an indirect increase in the strength of electrotonic coupling between PN neurons because

of K^+ channel blockade may also be involved in chirp mechanisms (Pereda et al., 2013). The occurrence of a slow negative extracellular potential (indicative of active depolarization) at R-cells correlated with chirping activity evoked by ALLn stimulation after 4-AP application to R-cells in the subordinate fish supports this notion. Even though during chirps, boosted slow depolarizing responses or spontaneous plateau potentials could involve most R-cells, the magnitude of the baseline inter-EOD variability (<3% of EOD amplitude), a parameter that depends directly on the amplitude of small high-rate discharges, suggests that synchronization of action potentials of R-cells triggered by slow depolarizing electrical events is poor. This is consistent with the well-known low-pass filter properties of electrical synapses (Galarreta and Hestrin, 1999; Gibson et al., 1999, 2005), although electrotonic coupling between PN neurons in *G. omarorum* and its frequency-dependent behavior remain to be explored. The above-proposed model of chirping may account for the apparent loss of regular rhythmic PN discharges during chirps, a phenomenon that has been described in *Brachyhyopomus* as the functional uncoupling of R- and PM-cell discharge (Kawasaki and Heiligenberg, 1989). Further investigation is needed to obtain evidence about the electrophysiological properties of the PN neurons and their connectivity within the nucleus in pulse gymnotiform fish to support the proposed model.

Nonapeptide regulation of social behavior is a conserved feature in vertebrate evolution, particularly in teleosts (Godwin and Thompson, 2012; Stoop, 2012). In gymnotid fish, AVTergic fibers project to areas related to the control of social behavior and electromotor displays (Pouso et al., 2017), and a role of AVT in the modulation of emission of social electric signals via V1a receptors in PN neurons has been documented (Perrone et al., 2010, 2014). More recently, Perrone and Silva (2018) demonstrated that AVT enhances the electric signaling of submission in subordinates and modulates the intensity of aggression and the readiness to attack in dominants in *G. omarorum*. Inhibition of several potassium currents (including 4-AP-sensitive I_A -type K^+ currents) has been described as a mechanism of neuromodulatory effects of AVT in several neural systems (Raggenbass, 2008; Breton et al., 2009; Stoop, 2012), raising the intriguing possibility that AVT may act as an endogenous modulator of R-cell excitability during contests. Despite the above data, an effect of AVT compatible with an increase in R-cell excitability was detected in only two out of six experiments. Differences in the latency and magnitude of effects suggest that AVT is acting directly on a specific group of AVT-sensitive R-cells that were probably not affected by AVT in most experiments. The development of immunolabeling methods of specific AVT receptors to identify the cellular targets of AVT within the PN in gymnotid fish may provide critical evidence to explain the above results and will contribute to understanding more precisely the modulatory effects of AVT on the electromotor system.

Concluding remarks

Our results indicate that submissive electric signals in *G. omarorum* do not involve direct glutamatergic mechanisms. Whereas EOD interruptions are likely to result from activation of GABAergic receptors of PM-cells, emission of chirps most probably does not involve direct glutamatergic activation of R-cells and involves a mechanism based on the enhancement of the excitability of these cells. Modulation of electrophysiological properties of R-cells probably triggered by an as-yet unknown neuromodulatory input activated during contests represents a previously unknown mechanism for the production of electric social signals in gymnotiform fish. Whereas *Brachyhyopomus* and *Gymnotus* most

probably share a cellular mechanism for the generation of chirps based on the synchronous repetitive high-rate discharge of action potentials of a group of R-cells, the two genera most likely differ in the mechanisms underlying the depolarization capable of triggering high-rate repetitive firing of these cells. In *Brachyhypopomus*, depolarization and firing of the R-cell rely on the activation of AMPAR by specific glutamatergic pacemaker structures. In *Gymnotus*, in contrast, high-rate repetitive spiking of these cells requires an increase of R-cell excitability leading to the boosting of responses to depolarization of these cells, most likely originating in PM-cells with subsequent passive R-cell depolarization. We propose that modulation of electrophysiological intrinsic properties of neurons that comprise the PN constitutes an additional neural strategy that has evolved in gymnotid fish to produce specific electromotor outputs. This novel mechanism confers a higher degree of functional versatility to the PN and a high wired command nucleus of the electromotor system, and allows dynamic adaptation of the electromotor repertoire of gymnotid fish to different social and environmental demands.

Acknowledgements

Kim Langevin participated in the behavioral experiments and data processing during her internship in Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, as part of her undergraduate studies in Biological Sciences at the Université Laval, Québec, Canada. We thank Magdalena Vitar and Carolina Acordagoitia for their assistance during electrophysiological experiments. Special thanks to Alberto Pereda for critical reading and helpful suggestions on the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

Conceptualization: V.C., A.S., M.B.; Methodology: V.C., A.S., M.B.; Investigation: V.C., K.L., A.S., M.B.; Writing - original draft: V.C., A.S., M.B.; Writing - review & editing: V.C., A.S., M.B.

Funding

This work was partially supported by Universidad de la República (UdelaR) and Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA).

References

- Avoli, M. and Jefferys, J. G. R. (2016). Models of drug-induced epileptiform synchronization in vitro. *J. Neurosci. Methods* **260**, 26-32. doi:10.1016/j.jneumeth.2015.10.006
- Barrio, L. C., Caputi, A., Crispino, L. and Buño, W. (1991). Electric organ discharge frequency modulation evoked by water vibration in *Gymnotus carapo*. *Comp. Biochem. and Physiol. A Physiol.* **100**, 555-562. doi:10.1016/0300-9629(91)90369-N
- Batista, G., Zubizarreta, L., Perrone, R. and Silva, A. (2012). Non-sex-biased dominance in a sexually monomorphic electric fish: fight structure and submissive electric signalling. *Ethology* **118**, 398-410. doi:10.1111/j.1439-0310.2012.02022.x
- Bekkers, J. M. and Delaney, A. J. (2001). Modulation of excitability by alpha-dendrotoxin-sensitive potassium channels in neocortical pyramidal neurons. *J. Neurosci.* **21**, 6553-6560. doi:10.1523/JNEUROSCI.21-17-06553.2001
- Bennett, M. V. L. (1971). *Sensory Systems and Electric Organs, Fish Physiology*. Elsevier (Fish Physiology).
- Bennett, M. V. L., Pappas, G. D., Giménez, M. and Nakajima, Y. (1967). Physiology and ultrastructure of electrotonic junctions. IV. Medullary electromotor nuclei in gymnotid fish. *J. Neurophysiol.* **30**, 236-300. doi:10.1152/jn.1967.30.2.236
- Black-Cleworth, P. (1970). The role of electrical discharges in the non-reproductive social behaviour of *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Pisces). *Anim. Behav. Monographs* **3**, 11-IN1. doi:10.1016/S0066-1856(70)80001-2
- Breton, J. D., Poisbeau, P. and Darbon, P. (2009). Antinociceptive action of oxytocin involves inhibition of potassium channel currents in lamina II neurons of the rat spinal cord. *Mol. Pain* **5**, 63. doi:10.1186/1744-8069-5-63
- Caputi, A. A., Carlson, B. A. and Macadar, O. (2005). Electric organs and their control. *Electroreception* **410-451**. doi:10.1007/0-387-28275-0_14
- Carr, C. E., Maler, L. and Taylor, B. (1986). A time-comparison circuit in the electric fish midbrain. II functional morphology. *J. Neurosci.* **6**, 1372-1383. doi:10.1523/JNEUROSCI.06-05-01372.1986
- Castelló, M. E., Caputi, A. and Trujillo-Cenóz, O. (1998). Structural and functional aspects of the fast electroreceptive pathway in the electroreceptive lateral line lobe of the pulse fish *Gymnotus carapo*. *J. Comp. Neurol.* **401**, 549-563. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19981130)401:4<549::AID-CNE7>3.0.CO;2-H
- Comas, V. and Borde, M. (2010). Neural substrate of an increase in sensory sampling triggered by a motor command in a gymnotid fish. *J. Neurophysiol.* **104**, 2147-2157. doi:10.1152/jn.00076.2010
- Curti, S. (2007). Papel de la corriente de sodio persistente en la modulación del acople eléctrico y la descarga repetitiva neuronal. PhD thesis, Facultad de Medicina, UdelaR, PEDECIBA.
- Curti, S., Falconi, A., Morales, F. R. and Borde, M. (1999). Mauthner cell-initiated electromotor behavior is mediated via NMDA and metabotropic glutamatergic receptors on medullary pacemaker neurons in a gymnotid fish. *J. Neurosci.* **19**, 9133-9140. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-20-09133.1999
- Curti, S., Comas, V., Rivero, C. and Borde, M. (2006). Analysis of behavior-related excitatory inputs to a central pacemaker nucleus in a weakly electric fish. *Neuroscience* **140**, 491-504. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.02.037
- Dye, J. (1991). Ionic and synaptic mechanisms underlying a brainstem oscillator: An in vitro study of the pacemaker nucleus of *Apteronotus*. *J. Comp. Physiol. A* **168**, 521-532. doi:10.1007/BF00215074
- Dye, J., Heiligenberg, W., Keller, C. H. and Kawasaki, M. (1989). Different classes of glutamate receptors mediate distinct behaviors in a single brainstem nucleus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **86**, 8993-8997. doi:10.1073/pnas.86.22.8993
- Ellis, D. B. and Szabo, T. (1980). Identification of different cell types in the command (pacemaker) nucleus of several gymnotiform species by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Neuroscience* **5**, 1917-1929. doi:10.1016/0306-4522(80)90039-1
- Falconi, A., Lorenzo, D., Curti, S., Morales, F. R. and Borde, M. (1997). Mauthner cell-evoked synaptic actions on pacemaker medullary neurons of a weakly electric fish. *J. Comp. Physiol. A* **181**, 143-151. doi:10.1007/s003590050101
- Galarreta, M. and Hestrin, S. (1999). A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature* **402**, 72-75. doi:10.1038/47029
- Gibson, J. R., Beierlein, M. and Connors, B. W. (1999). Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex. *Nature* **402**, 75-79. doi:10.1038/47035
- Gibson, J. R., Beierlein, M. and Connors, B. W. (2005). Functional properties of electrical synapses between inhibitory interneurons of neocortical layer 4. *J. Neurophysiol.* **93**, 467-480. doi:10.1152/jn.00520.2004
- Godwin, J. and Thompson, R. (2012). Nonapeptides and social behavior in fishes. *Horm. Behav.* **61**, 230-238. doi:10.1016/j.yhbeh.2011.12.016
- Hayes, K. C. (2004). The Use of 4-Aminopyridine (Fampridine) in Demyelinating Disorders. *CNS Drug Rev.* **10**, 295-316. doi:10.1111/j.1527-3458.2004.tb00029.x
- Heiligenberg, W. (1991). *Neural Nets in Electric Fish*. MIT Press.
- Hsu, Y., Earley, R. L. and Wolf, L. L. (2006). Modulation of aggressive behaviour by fighting experience: Mechanisms and contest outcomes. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **81**, 33-74. doi:10.1017/S146479310500686X
- Jahnsen, H. (1986). Responses of neurons in isolated preparations of the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* **27**, 351-372. doi:10.1016/0301-0082(86)90006-7
- Jalabert, C., Quintana, L., Pessina, P. and Silva, A. (2015). Extra-gonadal steroids modulate non-breeding territorial aggression in weakly electric fish. *Horm. Behav.* **72**, 60-67. doi:10.1016/j.yhbeh.2015.05.003
- Kawasaki, M. and Heiligenberg, W. (1989). Distinct mechanisms of modulation in a neuronal oscillator generate different social signals in the electric fish *Hypopomus*. *J. Comp. Physiol. A* **165**, 731-741. doi:10.1007/BF00610872
- Kawasaki, M. and Heiligenberg, W. (1990). Different classes of glutamate receptors and GABA mediate distinct modulations of a neuronal oscillator, the medullary pacemaker of a Gymnotiform electric fish. *J. Neurosci.* **10**, 3896-3904. doi:10.1523/JNEUROSCI.10-12-03896.1990
- Keller, C. H., Kawasaki, M. and Heiligenberg, W. (1991). The control of pacemaker modulations for social communication in the weakly electric fish *Sternopygus*. *J. Comp. Physiol. A* **169**, 441-450. doi:10.1007/bf00240210
- Kennedy, G. and Heiligenberg, W. (1994). Ultrastructural evidence of GABA-ergic inhibition and glutamatergic excitation in the pacemaker nucleus of the gymnotiform electric fish, *Hypopomus*. *J. Comp. Physiol. A* **174**, 267-280.
- Kita, T., Kita, H. and Kitai, S. T. (1985). Effects of 4-aminopyridine (4-AP) on rat neostriatal neurons in an in vitro slice preparation. *Brain Res.* **361**, 10-18. doi:10.1016/0006-8993(85)91269-7
- Kramer, B., Kirschbaum, F., Markl, H. (1981). Species specificity of electric organ discharges in a sympatric group of gymnotoid fish from Manaus (Amazonas). In *Sensory Physiology of Aquatic Lower Vertebrates* (ed. T. Szabó and G. Czéh), pp. 195-219. Pergamon.
- Metzner, W. (1999). Neural circuitry for communication and jamming avoidance in gymnotiform fish. *J. Exp. Biol.* **202**, 1365-1375.
- Moller, P. (2002). Multimodal sensory integration in weakly electric fish: a behavioral account. *J. Physiol. Paris* **96**, 547-556. doi:10.1016/S0928-4257(03)00010-X
- Pereda, A. E., Curti, S., Hoge, G., Cachepe, R., Flores, C. E. and Rash, J. E. (2013). Gap junction-mediated electrical transmission: regulatory mechanisms and plasticity. *Biochim. Biophys. Acta* **1828**, 134-146. doi:10.1016/j.bbame.2012.05.026

- Perrone, R. and Silva, A. C.** (2018). Status-dependent vasotocin modulation of dominance and subordination in the weakly electric fish *Gymnotus omarorum*. *Front. Behav. Neurosci.* **12**, 1. doi:10.3389/fnbeh.2018.00001
- Perrone, R., Batista, G., Lorenzo, D., Macadar, O. and Silva, A.** (2010). Vasotocin actions on electric behavior: interspecific, seasonal, and social context-dependent differences. *Front. Behav. Neurosci.* **4**, 1-12. doi:10.3389/fnbeh.2010.00052
- Perrone, R., Migliaro, A., Comas, V., Quintana, L., Borde, M. and Silva, A.** (2014). Local vasotocin modulation of the pacemaker nucleus resembles distinct electric behaviors in two species of weakly electric fish. *J. Physiol. Paris* **108**, 203-212. doi:10.1016/j.jphysparis.2014.07.007
- Pouso, P., Radmilovich, M. and Silva, A.** (2017). An immunohistochemical study on the distribution of vasotocin neurons in the brain of two weakly electric fish, *Gymnotus omarorum* and *Brachyhyppopomus gauderio*. *Tissue Cell* **49**, 257-269. doi:10.1016/j.tice.2017.02.003
- Quintana, L., Sierra, F., Silva, A. and Macadar, O.** (2011). A central pacemaker that underlies the production of seasonal and sexually dimorphic social signals: Functional aspects revealed by glutamate stimulation. *J. Comp. Physiol. A* **197**, 211-225. doi:10.1007/s00359-010-0603-8
- Quintana, L., Harvey-Girard, E., Lescano, C., Macadar, O. and Lorenzo, D.** (2014). Sex-specific role of a glutamate receptor subtype in a pacemaker nucleus controlling electric behavior. *J. Physiol. Paris* **108**, 155-166. doi:10.1016/j.jphysparis.2014.04.004
- Quintana, L., Zubizarreta, L., Jalabert, C., Batista, G., Perrone, R. and Silva, A.** (2016). Building the case for a novel teleost model of non-breeding aggression and its neuroendocrine control. *J. Physiol. Paris* **110**, 224-232. doi:10.1016/j.jphysparis.2016.11.009
- Raggenbass, M.** (2008). Overview of cellular electrophysiological actions of vasopressin. *Eur. J. Pharmacol.* **583**, 243-254. doi:10.1016/j.ejphar.2007.11.074
- Richer-de-Forges, M. M., Crampton, W. G. R. and Albert, J. S.** (2009). A new species of gymnotus (Gymnotiformes, Gymnotidae) from Uruguay: description of a model species in neurophysiological research. *Copeia* **2009**, 538-544. doi:10.1643/C1-07-103
- Silva, A., Quintana, L., Galeano, M. and Errandonea, P.** (2003). Biogeography and breeding in Gymnotiformes from Uruguay. *Environ. Biol. Fishes* **66**, 329-338. doi:10.1023/A:1023986600069
- Silva, A., Perrone, R. and Macadar, O.** (2007). Environmental, seasonal, and social modulations of basal activity in a weakly electric fish. *Physiol. Behav.* **90**, 525-536. doi:10.1016/j.physbeh.2006.11.003
- Smith, G. T.** (1999). Ionic currents that contribute to a sexually dimorphic communication signal in weakly electric fish. *J. Comp. Physiol. A* **185**, 379-387. doi:10.1007/s003590050398
- Smith, G. T. and Zakon, H. H.** (2000). Pharmacological characterization of ionic currents that regulate the pacemaker rhythm in a weakly electric fish. *J. Neurobiol.* **42**, 270-286. doi:10.1002/(SICI)1097-4695(20000205)42:2<270::AID-NEU10>3.0.CO;2-V
- Spiro, J. E.** (1997). Differential activation of glutamate receptor subtypes on a single class of cells enables a neural oscillator to produce distinct behaviors. *J. Neurophysiol.* **78**, 835-847. doi:10.1152/jn.1997.78.2.835
- Spiro, J. E., Brose, N., Heinemann, S. F. and Heiligenberg, W.** (1994). Immunolocalization of NMDA receptors in the central nervous system of weakly electric fish: functional implications for the modulation of a neuronal oscillator. *J. Neurosci.* **14**, 6289-6299. doi:10.1523/JNEUROSCI.14-10-06289.1994
- Stoop, R.** (2012). Neuromodulation by oxytocin and vasopressin. *Neuron* **76**, 142-159. doi:10.1016/j.neuron.2012.09.025
- Szente, M. B. and Baranyi, A.** (1989). Properties of depolarizing plateau potentials in aminopyridine-induced ictal seizure foci of cat motor cortex. *Brain Res.* **495**, 261-270. doi:10.1016/0006-8993(89)90220-5
- Trujillo-Cenóz, O., Lorenzo, D. and Bertolotto, C.** (1993). Identification of neuronal types in the medullary electromotor nucleus of *Gymnotus carapo*. *J. Comp. Physiol. A* **173**, 750.
- Voskuyl, R. A. and Albus, H.** (1985). Spontaneous epileptiform discharges in hippocampal slices induced by 4-aminopyridine. *Brain Res.* **342**, 54-66. doi:10.1016/0006-8993(85)91352-6
- Westby, M. G. W.** (1974). Assessment of the signal value of certain discharge patterns in the electric fish, *Gymnotus carapo*, by means of playback. *J. Comp. Physiol.* **92**, 327-341. doi:10.1007/BF00696619
- Westby, G. W. M.** (1975). Further analysis of the individual discharge characteristics predicting social dominance in the electric fish, *Gymnotus carapo*. *Anim. Behav.* **23**, 249-260. doi:10.1016/0003-3472(75)90073-1
- Zubizarreta, L., Perrone, R., Stoddard, P. K., Costa, G. and Silva, A. C.** (2012). Differential serotonergic modulation of two types of aggression in weakly electric fish. *Front. Behav. Neurosci.* **6**, 77. doi:10.3389/fnbeh.2012.00077
- Zupanc, G. K. H. H.** (2002). From oscillators to modulators: behavioral and neural control of modulations of the electric organ discharge in the gymnotiform fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *J. Physiol. Paris* **96**, 459-472. doi:10.1016/S0928-4257(03)00002-0
- Zupanc, G. K. H. and Maler, L.** (1997). Neuronal control of behavioral plasticity: the prepacemaker nucleus of weakly electric gymnotiform fish. *J. Comp. Physiol. A* **180**, 99-111. doi:10.1007/s003590050031

8. Capítulo 3: Estudio de la conectividad intrínseca del NEB

Los CGP son circuitos neuronales que producen salidas rítmicas (usualmente motoras) en ausencia de entrada rítmica (ver para revisión Cazalets, 2000; Grillner y El Manira, 2015). Independientemente de la arquitectura de red específica, se considera que la eferencia orquestada por los CGP comprende dos aspectos funcionales relevantes: el ritmo y el patrón de activación de los efectores (Dougherty y Ha, 2019). En este capítulo adoptaremos el marco conceptual propuesto por McCrea y Rybak (2008) que predice que la mayoría de los CGP involucran dos niveles funcionales interconectados (“two-layer model”). Un nivel está representado por un marcapaso central que genera la actividad rítmica y el otro nivel suele estar compuesto por un conjunto de neuronas responsables de la secuencia específica de activación de los efectores periféricos (patrón). Se ha aportado sólida evidencia que indica que la actividad de los CGP está controlada por entradas mediadas por neurotransmisores y neuromoduladores que modifican las características de la eferencia de acuerdo con las demandas ambientales (Caputi y col., 2005; Marder y col., 2014; Grillner y El Manira, 2015; Steuer y Guertin, 2019).

El NEB, núcleo origen del comando para la DOE en peces eléctricos de débil descarga, ha sido considerado el CGP del sistema electromotor (Kawasaki y Heiligenberg, 1989; Grant, 1993; Carlson, 2003; Carlson y Hopkins, 2004; Bass y Zakon, 2005). En línea con lo propuesto por McCrea y Rybak (2008), el CGP-EM puede ser concebido como un CGP de dos niveles: el nivel generador de ritmo, representado por las cMP, verdadero marcapaso integrado por osciladores celulares y el nivel responsable del patrón, que comprende a las cR y sus blancos sinápticos en la médula espinal (Lorenzo y col., 1993; Caputi y col., 2005). Como ha sido detallado en la sección de antecedentes de esta tesis, el comando rítmico se origina en la descarga sincrónica de la población de cMP y es transferido, con un alto factor de seguridad, a la población de cR, nivel que participa de las etapas iniciales de la organización del patrón. Entradas sinápticas dirigidas a las cMP serían capaces de promover cambios de la frecuencia de la DOE preservando su forma de onda (y por tanto su valor electrorreceptivo), mientras que entradas dirigidas a las cR podrían provocar cambios de la forma de onda de la DOE, señales transitorias comúnmente utilizadas en la comunicación intraespecífica. Aunque el acople electrotónico entre los distintos elementos neuronales del NEB, esto es cMP-cMP, cMP-cR y cR-cR, ha sido propuesto como una característica funcional crítica de la conectividad intranuclear, las evidencias que sustentan la existencia del acople electrotónico entre estos son escasas (Bennett y col., 1967; Moortgat y col., 2000).

En este trabajo se buscó aportar evidencias acerca de las características del acoplamiento electrotónico entre los elementos neurales del NEB utilizando técnicas electrofisiológicas y farmacológicas complementadas con el análisis del acople para colorante en rodajas de tronco encefálico de *G. omarorum*. Nos propusimos poner a prueba las siguientes hipótesis. 1- Las cMP se encuentran acopladas electrotónicamente entre sí de tal forma que el nivel generador del ritmo del CGP-EM opere como un marcapaso constituido por osciladores celulares débilmente acoplados. Este diseño le confiere la característica de marcapaso robusto cuya frecuencia puede ser modificada por influencias descendentes procedentes de ePreMP. 2- Las cMP se encuentran acopladas electrotónicamente con las cR a través de contactos axo-dendríticos o axo-somáticos, transmitiendo a las cR el comando rítmico para la DOE originado en las cMP con un alto factor de seguridad. La conexión entre el soma de las cMP y las cR debería contribuir a establecer una distancia electrotónica entre ambos tipos celulares, determinando el arreglo

temporal entre la descarga de la población de cMP y de cR, al favorecer la conducción unidireccional cMP-cR del comando rítmico. Asimismo, esta distancia también sería responsable de evitar la interferencia de entradas dirigidas a cada tipo celular, pese a encontrarse electrotónicamente acopladas. 3- las cR se encuentran acopladas electrotónicamente entre sí, contribuyendo a la generación de un comando descendente sincrónico requerido para la elaboración de la forma de onda de la DOE por parte del resto del sistema electrogenerador.

Si bien este trabajo está aún en desarrollo, los datos obtenidos sugieren que el acople electrotónico entre las neuronas del NEB (cMP-cMP, cMP-cR y cR-cR) es de escasa magnitud y mediado por contactos no rectificadores que funcionan como filtro pasa-bajos. Asimismo, los experimentos de acople para colorante y farmacológicos sugieren que el sustrato molecular del acople es a través de uniones gap. A nivel de las cMP, la hiperpolarización post-espiga y el potencial marcapaso, cambios de potencial de membrana conteniendo bajas frecuencias, constituirían los eventos electrofisiológicos sincronizadores de la descarga de estas células generando un comando rítmico robusto, pero pasible de ser modulado en frecuencia por las aferencias provenientes de ePreMP. El acople entre las cMP y las cR aseguraría la transmisión del comando rítmico a las cR con un arreglo temporal entre la descarga de ambas poblaciones neuronales que contribuiría a impedir la transmisión retrógrada del PA sincrónico de las cR hacia las cMP. Para la elaboración del comando para la DOE, este contacto operaría funcionalmente como unidireccional comportándose como filtro pasa-altos en sentido ortodrómico y pasa-bajos en sentido retrógrado. Finalmente, el acople electrotónico entre las cR, con una incidencia del 50% de los pares explorados, mostró magnitudes similares al estimado entre cMP. Los pares de neuronas acopladas nunca mostraron aposición de sus somas, por lo que podrían establecer contactos dendro-dendríticos, aunque el acople indirecto a través del axón de las cMP o de una (o varias) neuronas interpuestas, no puede descartarse. Esta última posibilidad es poco probable a juzgar por los resultados de los experimentos de acople para colorante. Este nivel funcional del CGP-EM parece aportar significativamente al sincronismo del comando descendente requerido para la elaboración de la forma de onda de la DOE.

En conjunto, nuestros hallazgos revelan características de la conectividad intrínseca del NEB que posibilitan: i.- su papel como núcleo marcapaso robusto, comando del sistema electromotor para la generación de la DOE como eferencia especie específica del sistema electrosensorial activo y ii.- la modulación de la frecuencia y de la forma de onda de la DOE por parte de aferentes al núcleo para la emisión de señales eléctricas en respuesta a las condiciones cambiantes del entorno físico y a las demandas sociales.

a. Metodología específica

i. Obtención de las rodajas

Los individuos (N=28) fueron anestesiados por inmersión en una solución de metanosulfonato de tricaina (MS222) disuelto en agua corriente helada (0,3 mg/l, 4 °C) y colocados en una cámara de plástico sobre una esponja húmeda. Todas las áreas quirúrgicas y puntos de fijación se infiltraron con hidrocloreto de lidocaína al 2%. Durante los procedimientos quirúrgicos, la cabeza se mantuvo en posición horizontal mediante un par de barras de metal con punta de plástico unidas a la caja, en tanto que las branquias se perfundieron con la solución de anestesia. A través de una amplia craneotomía, la superficie dorsal del cerebro se expuso al tiempo que era bañada con una solución de extracción, libre de Na⁺, fría (ver más adelante en soluciones). El cerebro con una porción

de la médula espinal se extrajo rápidamente del cráneo y se sumergió en la solución de extracción fría. La pieza de cerebro se montó en una platina, y sumergida en la misma solución se obtuvieron secciones transversales del tronco encefálico (400 μm de espesor) conteniendo el NEB, utilizando un vibrátomo (Vibratome 1000 plus, The Vibratome Company, Saint Louis, MO, EEUU). Las rodajas se incubaron (~ 30 min, a temperatura ambiente, 21-23 $^{\circ}\text{C}$) en una solución conteniendo 50% de solución de extracción y 50% de solución de perfusión (ver más adelante en soluciones), para luego ir paulatinamente reemplazando la solución de extracción por la de perfusión en aproximadamente 1 hora. Las rodajas se transfirieron a una cámara de registro de 2 ml fijada a una platina de microscopio NIKON (Eclipse FN1, Nikon Company, Minato, Tokio, Japón) equipada con microscopía de video de contraste de interferencia diferencial infrarroja (DIC) y un objetivo de inmersión en agua de 40x. Las rodajas se perfundieron con la solución de perfusión burbujeada con carbógeno (95% O_2 , 5% CO_2) con una velocidad de flujo de 1,5-3 ml/min y se mantuvieron a temperatura ambiente (20-23 $^{\circ}\text{C}$). En estas condiciones experimentales, el NEB mantiene su actividad espontánea sincrónica con una frecuencia de descarga estable durante al menos 6 horas (Fig. 7).

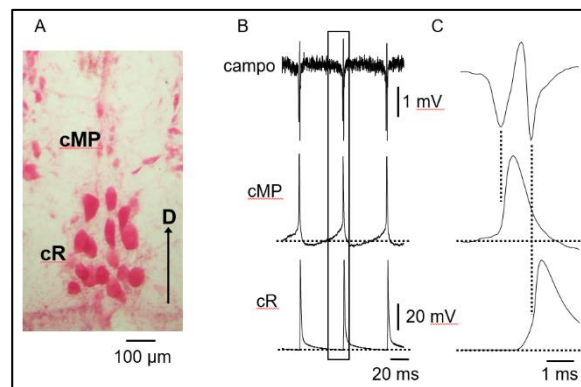


Figura 7: Actividad rítmica del NEB in vitro. **A.** Corte transversal del NEB de *Gymnotus omarorum* contrañeido con rojo de Pyronina. Se observa la localización dorsal de las células marcapaso (cMP), en tanto que las células de relevo (cR) se encuentran en el sector ventral del núcleo. D: dorsal. **B.** Registros de la actividad rítmica espontánea del NEB obtenidos a través de registros simultáneos del potencial de campo del NEB y del potencial transmembrana de una cMP o cR. El registro de campo se obtuvo en el sector dorsal del núcleo, en el centro de las cMP. Los registros fueron alineados tomando como referencia temporal al potencial de campo de cada par. Se observa el registro del potencial de campo del NEB obtenido cerca de las cMP (campo); el registro intracelular de una cMP (MP) y el registro intracelular de una cR (R). **B.** Se muestran los detalles de las descargas en A (recuadro) a una velocidad de barrido más rápida para mostrar la correlación temporal entre eventos extracelulares e intracelulares. Arriba: potencial de campo. Medio: PA de la cMP. Abajo: PA de la cR. La máxima negatividad del primer y segundo pico del registro de campo extracelular del NEB se correlaciona con la fase ascendente del potencial de acción de las cMP y cR (líneas punteadas verticales). En ambos registros, la línea punteada horizontal indica un potencial de membrana de las cMP y cR de -70 mV. (Modificado de Comas y Borde, 2010, 2021).

ii. Registro y estimulación

Se realizaron registros intracelulares somáticos con micropipetas de patch, en configuración de célula entera, en condiciones de fijación de corriente. El tipo celular registrado (MP o R) se identificó de acuerdo a las características morfológicas de su soma a la inspección con DIC, su localización en el NEB y a las características de su descarga espontánea. Los microelectrodos (5-10 $\text{M}\Omega$) se rellenaron con una solución intracelular basada en gluconato de potasio (ver más adelante en soluciones) y se ubicaron en las células de interés bajo control visual con un micromanipulador hidráulico (Narishige, Setagaya, Tokio, Japón). Las señales se acondicionaron con un filtro pasa bajo a 3.0 kHz,

se muestrearon a 10.0 kHz utilizando un conversor análogo-digital Digidata 1322A (Molecular Devices, San Jose, CA, EEUU), y se almacenaron en una computadora PC para su posterior análisis utilizando el paquete informático pClamp (Molecular Devices, San Jose, CA, EEUU).

Para el cálculo de la *resistencia de entrada* (R_{in}) de las neuronas con actividad, la estimación de los *coeficientes de acoplamiento* (CC) y de la *resistencia de transferencia* (R_{transf}) se midió la amplitud de los cambios del potencial de membrana (V_m) provocados por la inyección de una familia de pulsos cuadrados de corriente aplicados a mitad del intervalo natural de descarga de PAs (30 ms, -3 a 3 nA). En neuronas sin actividad espontánea, se utilizaron pulsos cuadrados de mayor duración (800 ms, -6 a 3 nA). En todas las maniobras, el V_m de reposo se mantuvo en el mismo valor en ambas células, a través del pasaje de corriente continua. De manera característica, las respuestas a pulsos hiperpolarizantes mostraron rectificación tiempo-dependiente y “sag” (ver p.ej. Fig. 11) indicativos de la presencia de I_h , corriente catiónica activada por hiperpolarización (Halliwell y Adams, 1982; McCormick y Pape, 1990), cuyo curso temporal fue similar al encontrado en otros tipos neuronales de esta especie (Nogueira y Caputi, 2014). En todos los casos, para estimar R_{in} , CC y R_{transf} , los cambios de V_m (ΔV_m) provocados por las corrientes inyectadas (particularmente las hiperpolarizantes) se midieron a los 30 ms del comienzo del pulso a los efectos de minimizar la eventual interferencia de I_h . En estas neuronas la constante de tiempo de activación estimada de esta corriente operada por voltaje fue >45 ms (a V_m cercanos al reposo). Para ello, en experimentos seleccionados, se ajustó la trayectoria de V_m en sentido despolarizante a una única exponencial en las respuestas a pulsos hiperpolarizantes que llevaron V_m a valores en el entorno de los -100 mV. La R_{in} se calculó a partir de la pendiente del gráfico del ΔV_m en función de la corriente inyectada (curva V/I). En los registros de pares, los ΔV_m se registraron en la misma neurona inyectada (presináptica, V_{pre}) y en la acoplada (postsináptica, V_{post}). Se construyeron gráficos de V_{post} en función de V_{pre} y se estimó CC a partir de la pendiente de regresiones lineales (Davoine y Curti, 2019). Se promediaron un total de 10 respuestas individuales para mejorar la relación señal/ruido para cada valor de corriente inyectada. Para cada uno de los pares acoplados, el CC se estimó en ambas direcciones y estas fueron identificadas como de célula 1 a célula 2 (sufijo 1-2) o de célula 2 a célula 1 (sufijo 2-1), correspondiendo la célula 1 a la célula presináptica en la primera dirección de propagación explorada. El hallazgo de que las CC 1-2 y CC 2-1 no tuvieron diferencias significativas (test de Student pareado, $P=0.46$) permitió calcular el CC medio como el promedio de los valores en ambas direcciones $(CC\ 1-2 + CC\ 2-1)/2$.

La *resistencia de transferencia* (R_{transf}) se calculó a partir de la pendiente de la relación entre la corriente inyectada en la célula presináptica (I_{pre}) y el cambio de V_m en la neurona postsináptica (ΔV_{post} en función de I). La R_{transf} del par se calculó como el promedio de los valores en ambas direcciones.

La *resistencia de la unión gap* (R_j) se estimó de acuerdo a Bennett (1966):

$$R_j = \frac{R_{in1} \cdot R_{in2} - R_{transf}}{R_{transf}}, \quad (1)$$

donde R_{in1} y R_{in2} son la resistencia de entrada de la célula 1 y 2, respectivamente, y R_{transf} es la resistencia de transferencia.

Aporte de célula individual a la descarga espontánea sincrónica. Para determinar el aporte de la neurona registrada a la descarga espontánea sincrónica, se inyectó un pulso de corriente breve (5 ms) despolarizante supraumbral precediendo a la espiga espontánea

a intervalos progresivamente decrecientes. A intervalos suficientemente breves (típicamente 1.5 - 2 ms), la refractariedad generada por el PA directo, provoca la reducción de la amplitud de la espiga espontánea subsiguiente. La espiga espontánea remanente se designó como espiga acoplada. Para comparar resultados obtenidos de varias neuronas, se calculó el porcentaje de la amplitud de la espiga acoplada respecto de la amplitud de la espiga espontánea control.

Análisis dinámico del acople electrotónico. La inyección de corriente sinusoidal de amplitud constante y frecuencia variable (denominada corriente ZAP, I_{ZAP}) fue utilizada para evidenciar la capacidad de transferencia de frecuencia de la red compuesta por las neuronas del NEB. Cuando se aplica a una neurona única, este estímulo, permite determinar la respuesta del Vm en función de la frecuencia de la corriente inyectada. La respuesta de la membrana, en términos de variación del Vm, será máxima para valores en el entorno de la frecuencia de resonancia de la neurona (Hutcheon y Yarom, 2000). Las propiedades de transferencia de las neuronas del NEB acopladas eléctricamente se determinaron inyectando ondas sinusoidales de frecuencia modulada de crecimiento lineal (de 0 a 144 Hz) de corriente (-3 a 3 nA) en una de las células acopladas, al tiempo que se registran los ΔV_m en ambas células (ver Fig. 17). La I_{ZAP} se generó por computadora de acuerdo con la siguiente fórmula (Puil y col., 1986):

$$I(t) = a \text{sen}(bt^c + d)$$

donde a es la amplitud máxima de la corriente inyectada, c y d son constantes empíricas asignadas, cuyos valores fueron elegidos de forma tal que el espectro de frecuencias de la senoide fuera relativamente suave en un rango restringido de frecuencias. La amplitud de la I_{ZAP} se ajustó para mantener la perturbación del Vm en el rango subumbral. Se calculó la transformada rápida de Fourier (FFT) para las respuestas de membrana presináptica y postsináptica. La propiedad de transferencia de frecuencia se determinó como la relación de la FFT postsináptica sobre la FFT presináptica utilizando el análisis predeterminado del programa Sigmaplot (Systat Software Inc., San Jose, CA, EEUU), usando la ventana de tipo Hamming. Luego, el resultado fue acondicionado aplicando un promedio móvil ($n=3$). A partir de estos resultados, se calculó la impedancia (Z) de acuerdo a la ecuación:

$$Z = \text{FFT voltaje de la neurona} / \text{FFT corriente ZAP} \quad (2)$$

En experimentos en los que no fue posible aplicar este protocolo a pares de neuronas (cMP p.ej.), los aspectos dinámicos del acople electrotónico se analizaron cualitativamente a través de la evaluación de la capacidad de la I_{ZAP} , inyectada en una neurona, de modular la frecuencia de descarga del NEB. Así se obtuvieron resultados indicativos de la resonancia global de la red de neuronas acopladas (ver p.ej. Fig. 18). En algunos experimentos, se realizaron registros extracelulares del potencial de campo generado por el NEB de manera complementaria a los registros intracelulares. Para ello, pipetas de patch rellenas con NaCl 154 mM se colocaron en la vecindad de las cMP o de las cR y las señales obtenidas se registraron utilizando uno de los canales del AXOCLAMP, cuya salida fue debidamente amplificada ($\times 100$ o $\times 1000$) con un acondicionador de señales para ser conectado al conversor A/D o utilizando un amplificador FL-4 (DAGAN Corp., Minneapolis, MN, EEUU)

iii. Drogas y soluciones

El contenido de la solución de perfusión fue (en mM): 124 NaCl, 3 KCl, 0,75 KH_2PO_4 , 1,2 MgSO_4 , 24 NaHCO_3 , 10 D-glucosa, 1,6 CaCl_2 , pH 7,2-7,4 después de la saturación con carbógeno (Spiro, 1997), en tanto que en la solución de extracción utilizada durante la

cirugía y la obtención de las rodajas, el NaCl se sustituyó por 213 mM de sacarosa. Los componentes de la solución intracelular contenida en las pipetas de patch fueron (en mM): 140 gluconato de K⁺, 0,2 EGTA, 4 ATP-Mg, 10 HEPES, pH 7,3. En algunos experimentos, en la solución de perfusión se agregaron 4-aminopiridina (4-AP, 30 μ M) y tetrodotoxina (TTX, 10 μ M). Se analizaron los efectos de ácido 2-(2,6-dicloro-3-metilfenil) aminobenzoico (MFA, 200 μ M) disuelto en solución de perfusión y se mantuvo en el baño durante al menos 30 minutos. Todas las sustancias se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EEUU) o alternativamente de Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido).

iv. Acoplamiento para colorante

En algunos experimentos (n=13), una cR fue registrada con un electrodo conteniendo neurobiotina (2%, disuelta en solución intracelular). Luego de 30-60 minutos de registro, se retiró la micropipeta y después de 20 minutos, la rodaja se sumergió en una solución de paraformaldehído (PFA, 4%) durante una noche. Luego del correspondiente lavado con buffer fosfato salino (PBS), la rodaja fue sometida a un proceso para el revelado utilizando el kit Vectastain ABC System (Vector Laboratories, Newark, EEUU), basados en los procedimientos estándar descritos por Horikawa y Armstrong (1988). Para ello, se bloqueó la peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno (30% en PBS), y los cortes se incubaron con un anticuerpo biotinilado con el fin de amplificar la señal. Luego la biotina se reveló utilizando la técnica de diaminobencidina potenciada con níquel durante 7-8 minutos. Los cortes se analizaron con un microscopio Nikon Optiphot y las imágenes digitales se obtuvieron utilizando una cámara Kodak MDS120.

v. Análisis estadístico

En este estudio, N representa el número de animales utilizados en tanto que n representa el tamaño de la muestra del conjunto de datos para cada condición experimental. Todos los datos se procesaron estadísticamente utilizando el software Past (Hammer y col., 2001) y se presentan como media \pm error estándar (EE). Una vez sometidos al test de normalidad de Shapiro-Wilk, los datos que pasaron el test de normalidad se analizaron con el test de Student, en tanto aquellos que no los pasaron se analizaron utilizando el test estadístico no paramétrico *U* de Mann-Whitney para variables independientes. Los niveles de significación estadística de <0.05 están marcados en las figuras con un asterisco. La ausencia de significación estadística está indicada por n.s. (no significativo). A lo largo del texto, se informan los valores P absolutos.

b. Resultados

i. Modificación del intervalo de la descarga del NEB inducida por polarización de célula única

De manera sistemática, durante la aplicación de los protocolos de corriente para la estimación de R_{in} , se observó que la polarización breve de V_m provocó cambios reversibles y de escasa amplitud en la duración del intervalo de la descarga neuronal en el cual se aplicó dicho protocolo. Un ejemplo representativo de esta observación realizada ante la aplicación del protocolo a las cMP se ilustra en la Fig. 8. El registro simultáneo de la actividad de campo del NEB (Fig. 8A) mostró que los cambios del intervalo no se limitaron al de la descarga de la célula registrada sino que se produjeron con idénticas características en la descarga del NEB (Fig. 8B). La despolarización provocó una reducción del intervalo (indicado por 1 en Fig. 8B) en tanto que la hiperpolarización provocó un incremento (indicado por 3 en Fig. 8B) Los efectos de la polarización se analizaron

correlacionando los cambios del intervalo de la descarga del NEB y de la cMP con los ΔV_m (en el estado estacionario) provocados por la aplicación de una familia de pulsos de corriente (Fig. 8C). La relación observada para el PA de la cMP y para la descarga del NEB se ajustó a una única recta ($y=ax+b$) con pendiente negativa (-0.107 ms/mV , $R^2= 0.998$). Efectos similares fueron observados en la totalidad de las cMP analizadas ($n=24$). El valor de la pendiente promedio fue de $-7.60 \times 10^{-2} \text{ ms/mV} \pm 0.010$ (Fig. 8D, $n=24$).

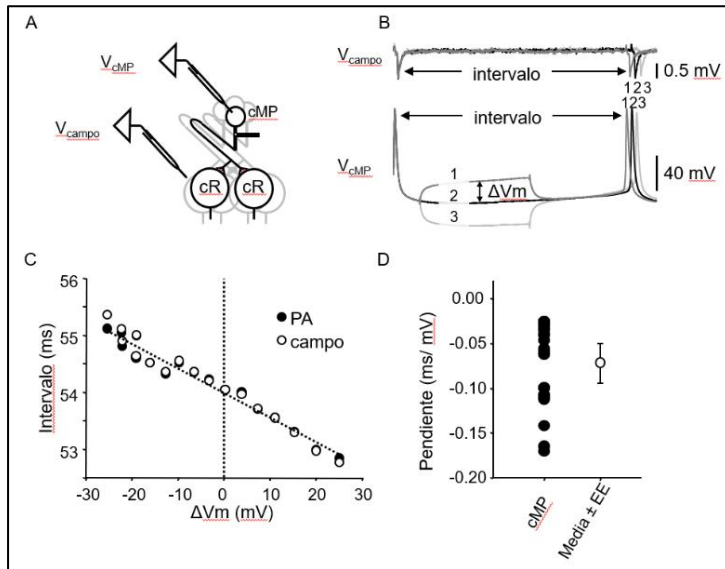


Figura 8: La polarización de una única cMP modifica la frecuencia del NEB. **A.** Esquema del diseño experimental en el que se muestra un electrodo de patch registrando una célula marcapaso (MP) en la configuración de célula entera con fijación de corriente (V_{cMP}) mientras que simultáneamente un electrodo extracelular registra el potencial de campo (V_{campo}) en las inmediaciones de las células relé (cR). **B.** Registro extracelular del potencial de campo (trazado superior) al nivel de las cR. Registro intracelular de una cMP (trazado inferior) en condiciones control (2) y durante breves pulsos de corriente (ΔV_m) despolarizante (1) e hiperpolarizante (3). Nótese el cambio de intervalo tanto en el registro intracelular

como en el registro de campo cuando se inyecta la corriente: la despolarización (1) provoca una reducción del intervalo en tanto que la hiperpolarización provoca un incremento del mismo (3). **C.** Gráfico de intervalo en función del ΔV_m de la respuesta de la cMP (círculos negros) y el potencial de campo (círculos blancos) a diferentes pulsos de corriente inyectados a la cMP. Esta relación es lineal, y la pendiente de este ejemplo es de -0.107 ms/mV . **D.** Valor de las pendientes de los intervalos en función del ΔV_m de cMP ($n=24$, círculos negros). El promedio fue de $-7.6 \times 10^{-2} \text{ ms/mV} \pm 0.010$ (círculo blanco).

Un fenómeno similar fue detectado aplicando los pulsos de corriente a las cR. Sin embargo, los cambios del intervalo observados durante la polarización de estas neuronas fueron de menor magnitud. En efecto, en el ejemplo ilustrado en la Fig. 9A, la pendiente de la recta que representa el cambio del intervalo en función del ΔV_m provocado por los pulsos de corriente fue de -0.005 ms/mV ($R^2: 0.998$); La pendiente promedio para las cR analizadas fue de $-0.96 \times 10^{-2} \text{ ms/mV} \pm 0.004$ (Fig. 9B; $n=16$), un orden de magnitud por debajo del calculado para las cMP (test *U* de Mann-Whitney, $P < 0.001$).

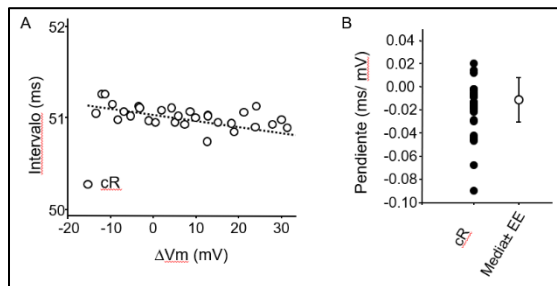


Figura 9: La polarización de una única cR también modifica la frecuencia del NEB. **A.** Gráfico de intervalo en función del ΔV_m provocado a la cR a través de pulsos crecientes de corriente. Esta relación es lineal, y la pendiente de este ejemplo es de -0.005 ms/mV . **B.** Valor de las pendientes de los intervalos en

función del ΔV_m de cR ($n=16$, círculos negros). El promedio fue de $-0.96 \times 10^{-2} \text{ ms/mV} \pm 0.004$ (círculo blanco).

Estos resultados sugieren la existencia de acople electrofónico entre cMP y entre éstas y las cR. El contacto a través del cual se produce el acople parece ser, al menos en el rango de ΔV_m explorados, de tipo bidireccional a juzgar por el hecho de que los cambios del intervalo provocados por las despolarizaciones y las hiperpolarizaciones de las

neuronas se ajustan a una única recta con índices de determinación (R^2) cercanos a la unidad. La modificación del intervalo de la descarga del NEB por polarización de las cR, menor en relación a los efectos de la polarización de las cMP, no solamente sugiere la existencia de acople entre estas y las cMP sino que además señala a las cMP como verdadero origen del ritmo en el CGP-EM.

ii. Bloqueo del aporte de neuronas únicas a la descarga espontánea rítmica de neuronas del NEB

La existencia de acople electrotrónico entre cMP o entre cR, sugiere que en los registros intracelulares, el PA espontáneo podría representar la descarga sincrónica de neuronas acopladas con la célula registrada. De acuerdo con ello, el PA espontáneo contaría con dos componentes básicos: la espiga de la neurona registrada y la espiga acoplada. Para explorar esta posibilidad se buscó bloquear el aporte de la espiga de la neurona registrada al PA espontáneo. La Figura 10A ilustra un ejemplo del protocolo utilizado en una cMP. Tomando como referencia temporal el PA espontáneo (P_{esp}) se evaluó el efecto de la refractariedad generada por una espiga provocada (espiga directa) por un pulso de corriente breve supraumbral (2 nA en el ejemplo) sobre el PA espontáneo subsiguiente (PA_{sig}). La espiga directa generada en fases tempranas del ciclo ($\Delta t_{\text{espiga directa-PA}_{\text{sig}}} > 15$ ms) no afectó la amplitud del PA_{sig} . La reducción progresiva de $\Delta t_{\text{espiga directa-PA}_{\text{sig}}}$ se acompañó de una reducción no monotónica de la amplitud de PA_{sig} que alcanzó su mínimo a un intervalo de 1.6 ms; el PA espontáneo remanente fue interpretado como espiga acoplada, propagada desde las neuronas conectadas con la célula registrada. El efecto de la espiga directa sobre la amplitud de PA_{sig} en función del intervalo entre ambas se representa gráficamente en la Fig.10B. En el ejemplo ilustrado, la amplitud de la espiga acoplada alcanza el 58% del PA_{esp} y la espiga de la neurona registrada aportaría el 42% restante. Esta interpretación asume que la espiga directa corresponde exclusivamente al PA de la neurona registrada y que su amplitud es relativamente constante a valores de $\Delta t_{\text{espiga directa-PA}_{\text{sig}}} < 15$ ms. En nuestro experimento, se constató que la amplitud de pico de la espiga directa -medida desde el nivel de V_m inmediatamente previo al comienzo del pulso despolarizante- se redujo levemente pasando de 102.5 mV a 97.5 mV (reducción de 4.8%) para una disminución del intervalo de 15 a 1.6 ms. En las fases tempranas del ciclo de descarga marcapaso, durante los primeros 8 a 10 ms luego de la descarga del PA_{esp} , el pulso de corriente no fue capaz de generar una espiga indicando un período de excitabilidad disminuida de la cMP. En la figura Fig. 10B, ese período estaría comprendido entre el instante que indica la ocurrencia del PA_{esp} y el primer punto de la serie representada. Esta reducción de la excitabilidad es particularmente marcada durante la etapa inicial de la hiperpolarización post-espiga lenta del PA_{esp} . Finalizado este período, el pulso de corriente generó una espiga de menor amplitud que alcanzó su valor máximo, rápidamente, en los siguientes barridos. Resultados similares se obtuvieron en el resto de las cMP estudiadas aunque la magnitud de la espiga acoplada mostró un gran variabilidad (rango: 11.2%-87.5%, CV: 0.32) con una amplitud promedio de $60.75 \% \pm 3.21$ ($n=36$; Fig. 10C, círculos negros).

El estudio del aporte de la espiga de una cR al PA espontáneo rítmico registrado en estas neuronas arrojó similares resultados. La amplitud de la espiga acoplada en estas células también mostró una elevada variabilidad (rango: 31.4%-93.2%; CV: 0.30) y un promedio que alcanzó el $65.05 \% \pm 4.97$ ($n=15$; Fig. 10C, círculos blancos) no mostrando diferencia estadísticamente significativa con el de la espiga acoplada en las cMP (test U de Mann-Whitney, $P= 0.542$).

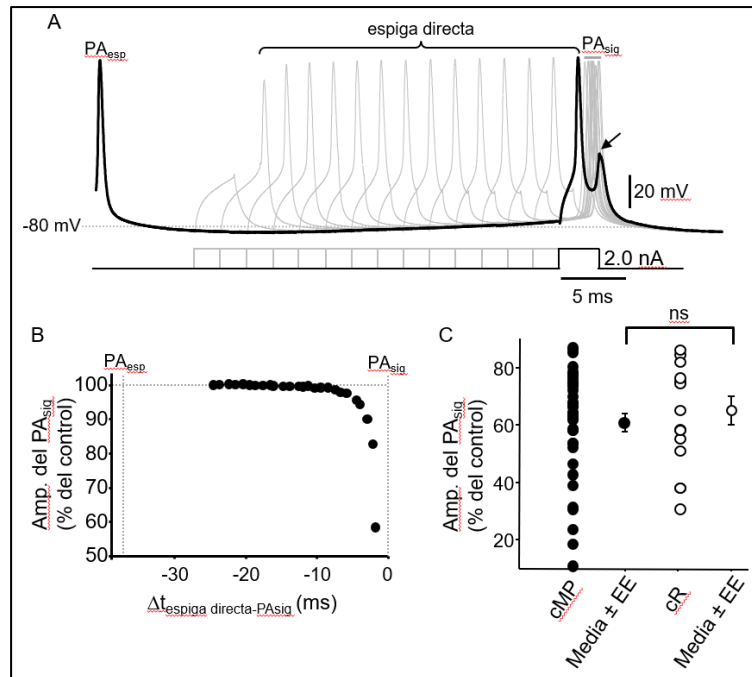


Figura 10: Aporte de célula única al potencial de acción espontáneo. La generación de la espiga directa en una célula del NEB provoca el bloqueo parcial del PA espontáneo subsiguiente (PA_{sig}). **A.** Ejemplo de una cMP (registro superior) a la que se le aplica un pulso breve de corriente despolarizante supraumbrales (3 ms, 2.0 nA, registro inferior) a intervalos crecientes respecto del PA espontáneo. Cuando la espiga directa se genera a menos de 15 ms del PA_{sig}, la amplitud de esta última comienza a reducirse hasta alcanzar un mínimo a un intervalo de 1.6 ms entre la espiga directa y el PA_{sig}, observándose la espiga acoplada (señalada por la flecha). Espigas directas: señaladas por la llave negra; PA_{sig} señalado por la barra gris superior. Para los efectos de la figura, se representa 1 de cada 2 barridos. **B.** Gráfico de la amplitud del PA_{sig}, representado como el porcentaje de la amplitud del PA control (PA espontáneo), en función del intervalo entre la espiga directa y el PA_{sig}. La amplitud del PA de población se reduce de forma no monotónica al 58% de la espiga control. **C.** La reducción de la amplitud del PA_{sig} se observa tanto en las cMP (círculos negros, promedio 60.75% ± 3.21, n=36), como en las cR (círculos blancos, 65.05% ± 4.97; n=15), y ambos tipos celulares muestran reducciones similares (test de Mann-Whitney, P= 0.542). cMP: células marcapaso, cR: células de relevo, ns: no significativo.

Estos resultados sugieren fuertemente la existencia de acople electrotónico cMP-cMP y cR-cR. En los registros intracelulares, el PA espontáneo que caracteriza la descarga rítmica de las neuronas del NEB constituye una verdadera "espiga de población" que resulta de la activación sincrónica de un grupo de neuronas acopladas electrotónicamente con la célula registrada. En nuestras condiciones de trabajo, el aporte de la espiga de una neurona única a la espiga de población representa, en promedio, el 35-40% de su amplitud.

iii. Evidencia directa de acople electrotónico entre neuronas del NEB. Registro de pares de neuronas

En conjunto, los resultados presentados en las secciones precedentes sugieren la existencia de acople electrotónico entre cMP, entre cR y entre ambos tipos celulares (cMP-cR). Los abordajes utilizados permitieron una caracterización primaria de este acople basada en la obtención de evidencias indirectas. Nos propusimos avanzar en esta caracterización a través del registro de pares de neuronas lo que permitió la obtención de evidencias directas de acople y proceder a su cuantificación a través del cálculo de parámetros como el coeficiente de acoplamiento (CC), la resistencia de transferencia (R_{transf}) y la resistencia del contacto (R_j). En primera instancia, se analizó el acople electrotónico en el estado estacionario. Se registraron 28 pares de neuronas bajo control

visual (Fig. 11A) de los cuales 27 fueron cR-cR, y uno cMP-cMP. La Rin promedio de las cR fue de $10.26 \text{ M}\Omega \pm 1.37 (n=22)$, Tabla 1) en tanto que para las cMP fue de $13.55 \text{ M}\Omega \pm 3.62 (n=2)$; Tabla 1). En la Fig. 11C se ilustran resultados representativos obtenidos en un par de cR registradas en ausencia de descarga espontánea de acuerdo al diseño ilustrado en la Fig. 11B. La inyección de un pulso de corriente hiperpolarizante (Fig. 11C1, trazado inferior) aplicado a la célula 1 (Fig. 11C1, trazado superior) provocó un cambio del mismo signo en la célula 2, aunque de menor amplitud y curso temporal más lento (Fig. 11C1, trazado medio). Similares resultados se obtuvieron cuando el pulso fue inyectado en la célula 2 (Fig. 11C2). En estas neuronas, al igual que en las cMP (no mostrado), las respuestas a pulsos hiperpolarizantes provocaron característicamente una rectificación despolarizante de voltaje (Fig. 11C, cabeza de flecha) compatible con la activación de la corriente I_h . En presencia de actividad espontánea rítmica (Fig. 11D), el registro de pares permitió constatar la descarga sincrónica de los PAs en las neuronas del par.

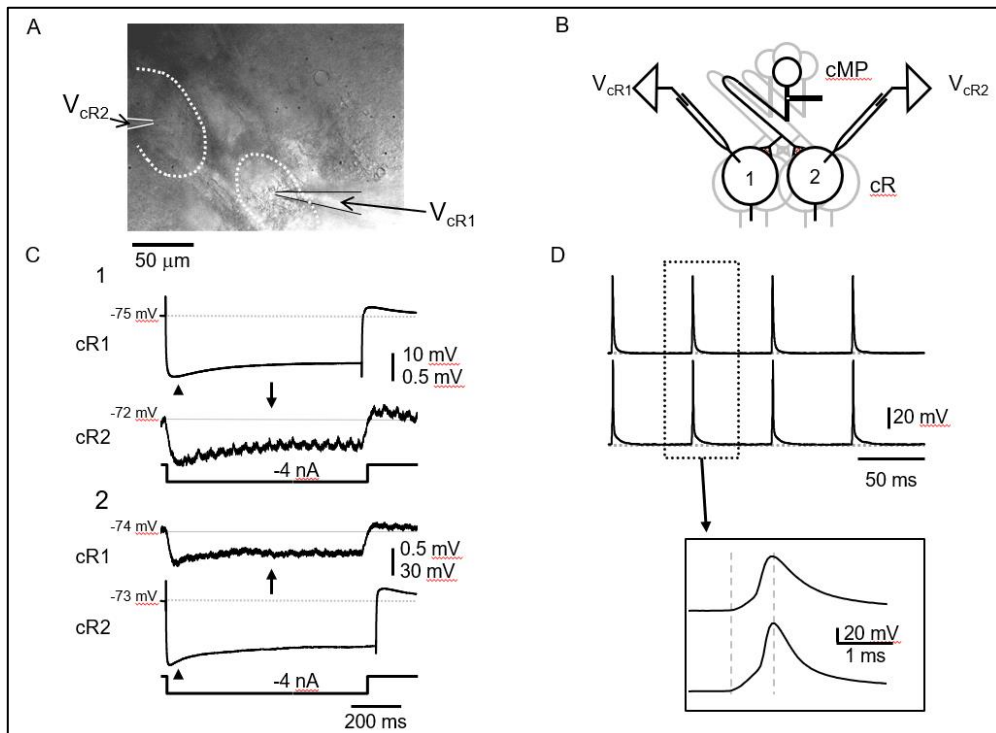


Figura 11: Acoplamiento electrotonico entre neuronas del NEB. A. Imagen de microscopía de DIC-IR de dos cR, señaladas con el contorno punteado, así como también los microelectrodos de registro (V_{cR1} y V_{cR2}). Nótese que no hay aposición de membranas somáticas entre las dos células registradas. **B.** Esquema del diseño experimental en el que se señala el registro de las cR utilizando pipetas de patch (V_{cR1} y V_{cR2}). **C.** Registro simultáneo, en configuración de registro de célula entera con fijación de corriente, de un par de cR acopladas electrotonicamente sin descarga espontánea. **1.** Respuesta de voltaje a un pulso de corriente hiperpolarizante (800 ms, 4 nA, trazado inferior) inyectado a la cR. En la cR2 se observa un cambio de potencial que coincide temporalmente con la actividad de la célula 1. **2.** Respuesta de voltaje del mismo pulso de corriente hiperpolarizante (800 ms, 4 nA, trazado inferior) inyectado a la cR2. En la cR1 se observa un cambio de potencial que coincide temporalmente con la actividad de la cR2. Nótese que las respuestas postsinápticas están representadas a mayor escala. La cabeza de flecha señala la rectificación despolarizante provocada por la activación de la I_h . **D.** Registro simultáneo de un par de cR con actividad espontánea. Los PAs en ambas neuronas coinciden temporalmente, mostrando una actividad sincrónica. Recuadro: se muestra la descarga de ambas células con mayor ganancia temporal. Las líneas punteadas señalan el pie y el pico del PA en cada célula.

En el conjunto de pares registrados ($n=28$), la incidencia de acople fue del 50% (incluye el par de cMP, Fig. 12A). Un ejemplo representativo de los resultados obtenidos en la aplicación de protocolos para la determinación del CC en un par de cR acopladas se

ilustra en la Fig. 12B. En el ejemplo, la relación entre los cambios de potencial provocados por la inyección de una familia de pulsos de corriente en la célula 1 (ΔV_{pre} , círculos blancos) y los registrados en la célula 2 (ΔV_{post}), medidos a los 30 ms desde el comienzo del pulso de corriente, fue lineal ($R^2=0.989$). El CC 1-2 obtenido a partir de la pendiente de la recta fue de 0.141. En la otra dirección (de célula 2 a célula 1, círculos negros), la relación de los cambios de ΔV_{post} en función de ΔV_{pre} también fue lineal ($R^2=0.997$) con un CC 2-1 estimado de 0.124. En la población de pares acoplados de cR, el CC promedio fue de 0.061 ± 0.014 ($n=11$). Los CC individuales para los pares de cR y el par de cMP, en ambas direcciones, se listan en la Tabla 1. Consistentemente con los hallazgos de las secciones precedentes el contacto entre cMP y cR analizado en los pares acoplados, mostró bidireccionalidad (Fig. 12C). El CC promedio (promedio de CC 1-2 y CC 2-1 de cada par) no mostró correlación con la distancia medida en el plano entre las neuronas del par (Fig. 12D). En ningún caso, los pares de neuronas acopladas más próximas entre sí (distancias $<100 \mu\text{m}$) mostraron aposición de somas. La ausencia de acople en los pares registrados tampoco se correlacionó con la distancia entre las neuronas del par (inserto de la Fig. 12D).

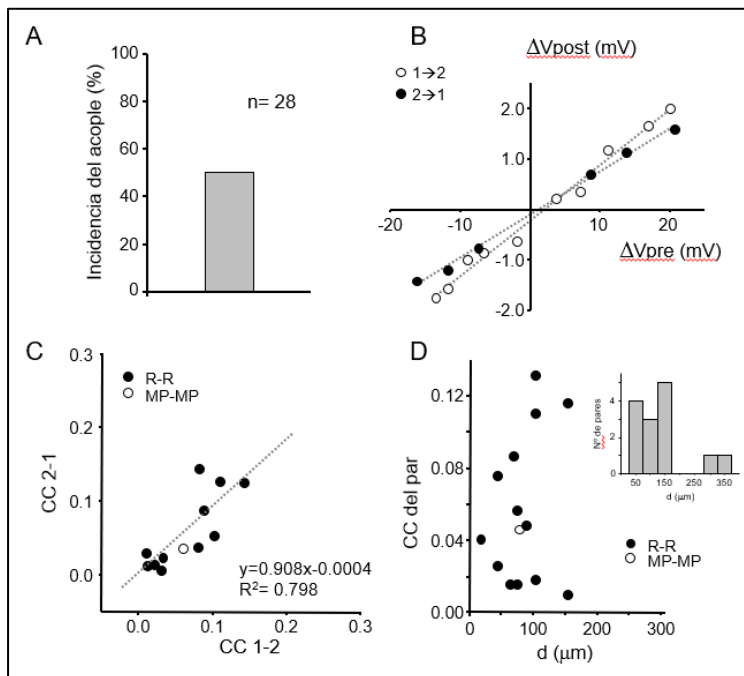


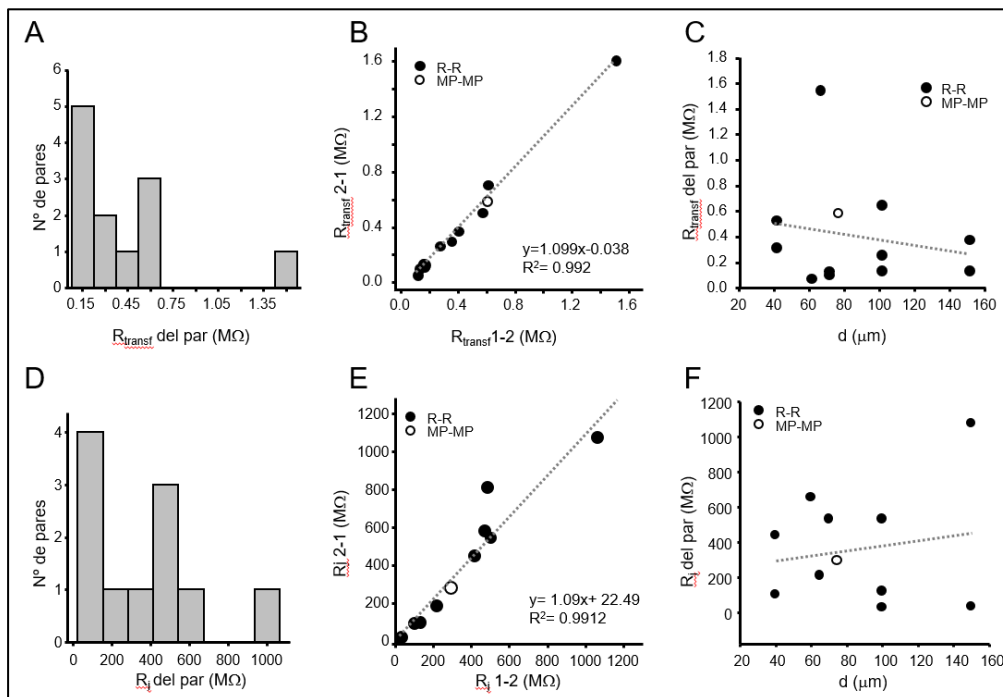
Figura 12: Características del acoplamiento en el estado estacionario entre neuronas del NEB. A. Se realizó el registro de pares de neuronas, encontrándose que la incidencia de acople electrotonico fue del 50% ($n=28$), registrando mayoritariamente pares cR-cR. **B.** Gráficos del cambio de potencial en la célula postsináptica (ΔV_{post}) en función del cambio de potencial provocado en la célula presináptica (ΔV_{pre}). Los círculos blancos muestran el ΔV en la célula 2 al inyectar pulsos de corriente en la célula 1 (1-2) y los círculos negros muestran la situación cuando la familia de pulsos de corriente se inyecta a la célula 2 (2-1). Las curvas muestran una relación lineal tanto para los pulsos hiperpolarizantes como para los despolarizantes. **C.**

Gráfico del coeficiente de acoplamiento de la célula 2 a la 1 (CC 2-1) en función del acoplamiento en el sentido inverso (célula 1 a la 2), cuyos valores fueron obtenidos a partir de la pendiente de gráficos como el mostrado en B. El ajuste de los puntos a una recta ($y=0.908x-0.0004$; $R^2=0.798$) sugiere que el acople entre los pares de neuronas es de tipo no rectificador. **D.** El CC promedio del par no mostró correlación con la distancia entre los somas del par de neuronas acopladas (rango 10-150 μm). Inserto: histograma que muestra la distancia entre somas de pares de neuronas no acopladas (rango 50-350 μm). En **C** y **D**, los pares cR-cR están representados por círculos negros, el par cMP-cMP representado por el círculo blanco.

El acople electrotonico entre pares de neuronas fue evaluado, complementariamente, a través del cálculo de la resistencia de transferencia (R_{transf}), parámetro que no depende de la compensación precisa de la resistencia del electrodo (a diferencia de CC, ver en metodología específica) ya que no implica la medida de ΔV_{pre} . El listado de valores individuales se incluye en la Tabla 1. En el conjunto de pares analizados, la R_{transf} (promedio de los valores para cada par en ambas direcciones), mostró una variabilidad relativamente elevada (Fig. 13A) con una media de $0.394 \text{ M}\Omega \pm 0.129$ ($n=11$)

y un CV de 1.085 para los pares de cR. El contacto entre neuronas de cada par evaluado a través de R_{transf} también mostró bidireccionalidad (Fig. 13B). Cabe destacar la bondad del ajuste lineal en el gráfico (mejor que para el caso del CC, ver Fig. 12B) no se diferencia estadísticamente de la línea de identidad (test de Student, $P=0.872$). La R_{transf} promedio (promedio de R_{transf} 1-2 y R_{transf} 2-1 de cada par) tampoco mostró correlación con la distancia entre las neuronas de cada par aunque el ajuste lineal ($R^2=0.036$) arrojó una leve pendiente negativa (Fig. 13C). De manera complementaria, la magnitud del acople fue estimada a través del cálculo de R_j (valores individuales listados en la Tabla 1). De manera similar a los observado con los otros parámetros característicos del acople electrotonico calculados en este estudio, los valores de R_j para los pares analizados exhibieron una gran dispersión (Fig. 13D), con un CV de 1.55 (todos los pares) y una media de $624.37 \text{ M}\Omega \pm 279.82$ para los pares de cR. El análisis de R_j en ambas direcciones descarta la rectificación del contacto (Fig 13E) y la magnitud del acople evaluada a través de este parámetro fue independiente de la distancia entre las neuronas de cada par (Fig. 13E).

Figura 13: La resistencia de transferencia permite estimar la resistencia de la unión gap. **A.** Histograma de la distribución de valores de resistencia de transferencia (R_{transf}). Se encontró una relativamente elevada dispersión en el conjunto de pares analizados. **B.** El gráfico de la R_{transf} de la célula 2 a la 1 (R_{transf} 2-1) en



función de la R_{transf} en el sentido inverso (R_{transf} 1-2) sugiere que el acople entre los pares de neuronas es de tipo no rectificador. Los datos se ajustan a la línea de identidad (R^2) sin diferencias estadísticas (test de Student, $P=0.872$). **C.** Gráfico de R_{transf} promedio en función de la distancia entre los somas del par de neuronas acoplado. Este sugiere que la R_{transf} promedio del par no muestra correlación con la distancia entre los somas del par de neuronas acopladas, aunque el ajuste tiene una leve pendiente negativa ($R^2=0.036$). **D.** Histograma de la distribución de valores de la resistencia de la unión gap (R_j , ver métodos). El gráfico sugiere que los contactos muestran distintos grados de **E.** El gráfico de la R_j de la célula 2 a la 1 (R_j 2-1) en función de la R_j en el sentido inverso (R_j 1-2) sugiere que el acople entre los pares de neuronas es de tipo no rectificador. Los datos se ajustan a la línea de identidad (R^2) sin diferencias estadísticas (test de Mann-Whitney, $P=0.478$). **F.** Gráfico de R_j promedio en función de la distancia entre los somas del par de neuronas acopladas. Este sugiere que la R_j promedio del par no muestra correlación con la distancia entre los somas del par de neuronas acopladas, aunque el ajuste tiene una leve pendiente positiva ($R^2=0.029$). En **B**, **C**, **E** y **F**, los pares cR-cR están representados por círculos negros, el par cMP-cMP representado por el círculo blanco.

En conjunto, las evidencias obtenidas en esta serie experimental confirman el acople electrofónico entre neuronas del NEB (cR-cR y cMP-cMP). A juzgar por la dispersión de los valores de los parámetros calculados (particularmente para las cR) el grado de acople es variable pero en conjunto sugieren que la magnitud del acople es relativamente baja (ver revisión Curti y col., 2022). La ausencia de aposición de membranas somáticas en los pares acoplados y la independencia de la distancia entre neuronas de cada par que muestran los parámetros indicadores de la magnitud del acople sugieren que el contacto que media el acople electrofónico se establece a nivel de las prolongaciones. Sin embargo, para el caso de las cR, no es posible descartar que este sea indirecto, con una (o más) neuronas interpuestas o a través del axón de las cMP que las inervan (ver, p.ej., esquema de diseño experimental en la Fig. 11B).

	Rin1 (MΩ)	CC 1-2	R _{transf} 1-2 (MΩ)	Rj 1-2 (MΩ)	Rin2 (MΩ)	CC 2-1	R _{transf} 2-1 (MΩ)	Rj 2-1 (MΩ)
R-R	9.62	0.032	0.341	408.34	14.51	0.022	0.305	456.66
R-R	5.32	0.101	0.561	92.50	9.86	0.052	0.512	101.45
R-R	17.00	0.088	1.499	209.71	18.58	0.087	1.611	195.06
R-R	7.76	0.020	0.153	460.54	9.10	0.013	0.120	587.47
R-R	3.24	0.081	0.261	22.46	1.89	0.142	0.269	21.76
R-R	9.45	0.141	0.600	124.53	7.97	0.124	0.712	104.78
R-R	15.96	0.009	0.150	493.76	4.65	0.029	0.134	552.84
R-R	3.44	0.109	0.390	25.81	3.04	0.125	0.379	26.59
R-R	12.69	0.011	0.144	1054.74	11.98	0.011	0.140	1084.90
R-R	3.64	0.029	0.103	477.85	13.55	0.004	0.060	821.03
R-R	13.8	0.079	0.117	3386.49	28.72	0.036	0.107	3703.07
MP-MP	9.93	0.059	0.593	286.52	17.17	0.035	0.594	286.03

Tabla 1: Resumen de los parámetros calculados para los distintos pares de neuronas registrados. Rin1: resistencia de entrada de neurona 1; Rin2: resistencia de entrada de neurona 2; CC 1-2: coeficiente de acoplamiento de neurona 1 a neurona 2; CC 2-1: coeficiente de acoplamiento de neurona 2 a neurona 1; R_{transf} 1-2: resistencia de transferencia de neurona 1 a neurona 2; R_{transf} 2-1: resistencia de transferencia de neurona 2 a neurona 1; Rj 1-2: resistencia de la unión gap de neurona 1 a neurona 2; Rj 2-1: resistencia de la unión gap de neurona 2 a neurona 1.

iv. Acoplamiento de señales transitorias

Las secciones precedentes abordaron el estudio del acople electrofónico en el estado estacionario. Aun cuando este abordaje ha provisto de información relevante acerca de la organización anátomo-funcional del NEB, en condiciones fisiológicas, las cMP y las cR presentan actividad espontánea por lo que su V_m cambia continuamente con trayectorias que contienen un amplio rango de frecuencias. Nos propusimos explorar algunos aspectos dinámicos del acople electrofónico entre neuronas del NEB, específicamente, su dependencia del contenido de frecuencias de los cambios de V_m de las neuronas en contacto. Para ello, se analizó el acople electrofónico para ΔV_m

provocados por la inyección de una corriente sinusoidal de amplitud constante pero de frecuencia creciente (I_{ZAP} , ver la sección de metodología específica).

Se presentan resultados preliminares obtenidos en neuronas del NEB con ($n=3$) y sin ($n=1$) actividad espontánea rítmica. La figura 14 ilustra el resultado obtenido en un par de cR sin actividad espontánea utilizando el diseño experimental esquematizado en A. El CC para el estado estacionario de este par (CC1-2) fue de 0.088 (Tabla 1). Los ΔV_m en la célula pre (cR1) provocados por la inyección de I_{ZAP} (frecuencia de 0 a 166 Hz; Fig. 14B trazado superior) mostraron un máximo de amplitud en el rango aproximado de frecuencias de 20 a 50 Hz (R en el trazado medio, Fig. 14B) indicando un comportamiento resonante probablemente debido al interjuego de conductancias operadas por voltaje de la cR. Sin perjuicio de ello, se observó un comportamiento global de filtro pasa-bajos, i.e.: las frecuencias bajas de I_{ZAP} provocaron ΔV_m de mayor amplitud que las altas frecuencias, de acuerdo a las propiedades pasivas de la neurona. En contraste, los ΔV_m registrados en la célula post (cR2) exhibieron un perfil diferente en relación a la frecuencia de I_{ZAP} : los cambios de V_m máximos se observaron a frecuencias más bajas que en cR1 y las respuestas con los incrementos de frecuencia mostraron un mayor grado de atenuación. El comportamiento dinámico del contacto entre ambas células, i.e.: la dependencia de la transferencia de los ΔV_m de su contenido de frecuencias, queda mejor ilustrado en la Fig. 14C en la que la amplitud de la transferencia de frecuencia se evaluó a través de la relación entre la FFT de la célula postsináptica (cR2) y la FFT de la célula presináptica (cR1). Para el contacto analizado, la transferencia fue máxima para el rango de frecuencias cercanas a 5 Hz, casi un 60% mayor que la observada a frecuencias cercanas al DC y a frecuencias >20 Hz. En los experimentos realizados en presencia de descarga espontánea, se obtuvo una caracterización primaria de la transferencia de frecuencia del contacto entre neuronas del NEB utilizando un abordaje diferente. Se obtuvieron evidencias indirectas de esta transferencia evaluando los cambios de frecuencia del NEB provocados por la inyección de I_{ZAP} a las cMP ($n=2$) y a una cR ($n=1$). Un ejemplo representativo de los resultados obtenidos en una cMP se ilustra en la Fig. 15. La frecuencia del NEB se monitorizó a través del registro de campo durante la inyección de la corriente sinusoidal (Fig. 15B). En línea con lo descrito en secciones anteriores, la polarización de la cMP provocó cambios de la frecuencia, aceleraciones durante la fase despolarizante de la sinusoide y enlentecimientos durante la fase hiperpolarizante (Fig. 15C). Sin embargo, la magnitud del cambio de frecuencia varió de manera compleja con la frecuencia de I_{ZAP} : fue máxima (± 1.5 Hz) para frecuencias en el entorno de los 11 Hz y luego se redujo para alcanzar valores cercanos a 0 en el rango 60-100 Hz para incrementarse levemente (solo aceleraciones) en el rango 100-166 Hz. Las propiedades resonantes de la membrana que resultan del repertorio de conductancias operadas por voltaje de una cMP representativa (NEB silente) se ilustran en el gráfico de la Fig. 15D. La impedancia -que se relaciona con la magnitud del ΔV_m provocado por I_{ZAP} , ver metodología específica- se mantiene en valores cercanos al máximo en el rango de frecuencias comprendido entre 3 y 80 Hz, perfil sustancialmente diferente al del cambio de frecuencia del NEB bajo el mismo protocolo de estimulación. Similar abordaje se utilizó para evaluar la transferencia de frecuencia desde las cR a las cMP (Fig. 16), aún cuando las propiedades del contacto entre cR interfieren con el análisis. En este caso, la maniobra se realizó durante un registro de pares (Fig. 16A). I_{ZAP} se inyectó en una cR (cR1) y se monitorizó la frecuencia de descarga del NEB en el registro de cR2. Tanto en cR1 como en la célula acoplada (cR2, recuadro en el trazado inferior de la Fig. 16B) se observaron ΔV_m provocados por I_{ZAP} , aunque en la cR1 fueron de mayor amplitud. La magnitud del cambio de frecuencia fue máxima para valores en el entorno de los 11 Hz (\pm

0.12 Hz) y fue indetectable para frecuencias de I_{ZAP} mayores de 40 Hz (Fig. 16C). La impedancia de una cR representativa, nuevamente mostró un perfil diferente al del cambio de frecuencia del NEB (Fig. 16D).

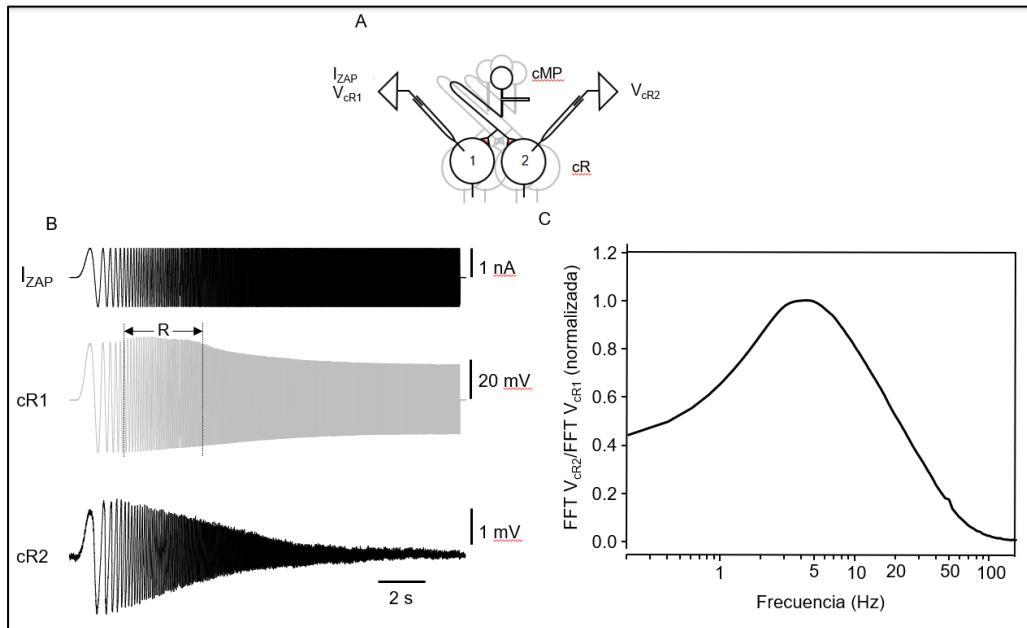


Figura 14: Acoplamiento de señales transitorias en las cR. **A.** Esquema del diseño experimental en el que se señala el registro de las cR utilizando pipetas de patch (V_{cR1} y V_{cR2}). A través de uno de los electrodos de registro se inyecta una corriente sinusoidal a una de las células (I_{ZAP}). **B.** Registros simultáneos de cR (cR1, trazado medio, y cR2, trazado inferior) durante la aplicación de una I_{ZAP} a la cR1 (trazado superior). La I_{ZAP} (1 nA; 0-155 Hz, 15 s) provoca en la cR1 cambios de voltaje sinusoidales que varía entre -100 mV a -40 mV desde su V_m de -71 mV (cR1, trazado medio). El máximo de amplitud del cambio del V_m fue en el rango aproximado de frecuencias de 20 a 50 Hz (R, líneas punteadas verticales en el trazado medio). La cR2 también responde a la I_{ZAP} aplicada a la cR1 con cambios de voltaje sinusoidales, pero de menor amplitud (-71 mV a -68 mV) a partir de su V_m de -70 mV. **C.** Gráfico de la relación entre la transformada rápida de Fourier de la célula postsináptica (FFT V_{cR2}) y la FFT de la célula presináptica (FFT V_{cR1}), normalizada, en función de la frecuencia del estímulo. La transferencia máxima del contacto electrotónico se encuentra cercano a los 5Hz.

En conjunto, estos resultados sugieren que si bien el contacto entre las neuronas del NEB muestra resonancia, el comportamiento de filtro pasa-bajos de los contactos parece dominar su comportamiento dinámico dependiente de la frecuencia. La contribución de las propiedades activas de la membrana de las cMP y cR a la transferencia de frecuencias, crucial en otros sistemas (ver p.ej. Curti y col., 2012), parece ser menor. A nivel de las cMP los componentes de frecuencia de los ΔV_m en el entorno de los 11 Hz podrían contribuir, de manera central, como sincronizadores de la descarga.

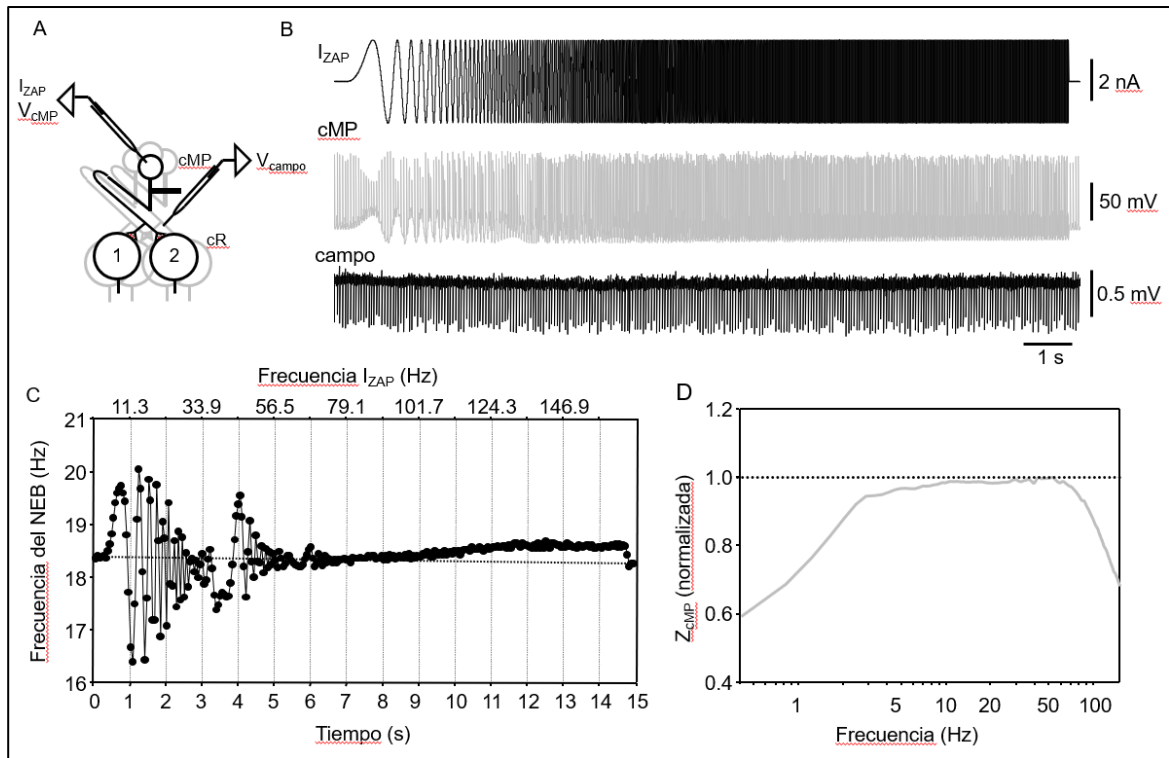


Figura 15: Acoplamiento de señales transitorias en las cMP. **A.** Esquema del diseño experimental en el que se señala el registro de una cMP (V_{cMP}) y simultáneamente el registro de campo con un electrodo cercano a las cR (V_{campo}). A través del electrodo de registro de la cMP se inyecta una corriente sinusoidal a una de las células (I_{ZAP}). **B.** Registros simultáneos de una cMP (cMP, trazado medio) y de campo (campo, trazado inferior) durante la aplicación de una I_{ZAP} a la cMP (trazado superior). La I_{ZAP} (2 nA; 0-155 Hz, 15 s) provoca en la cMP cambios de voltaje sinusoidales del potencial de membrana que varía entre -115 mV a -78 mV desde su V_m medido en el valle del PA de -95 mV (cMP, trazado medio). **C.** Gráfico de la frecuencia de descarga del NEB, medido en el registro de campo, en función del tiempo. En el eje superior del gráfico se indica la frecuencia teórica alcanzada por la I_{ZAP} . La modificación de potencial en la cMP provoca cambios de la frecuencia de descarga del NEB. La frecuencia de descarga del núcleo se modifica con aceleraciones durante la fase despolarizante de la sinusoide y enlentecimientos durante la fase hiperpolarizante. En el rango 60-100 Hz, la frecuencia de descarga no se modifica, y a partir de 100 Hz, la frecuencia se incrementa levemente hasta el final del estímulo. La zona gris marca el rango de frecuencias en las el NEB de *G. omarorum* en el animal entero suele operar en reposo. **D.** Gráfico representativo de la impedancia de una cMP (Z_{cMP}), normalizada a la impedancia máxima, en función de la frecuencia del estímulo. Las propiedades resonantes de la cMP fueron exploradas en células silentes sobre el potencial de reposo de la célula (cerca a -75 mV), y en el rango subumbral (-92 a -58 mV). Se muestra que la misma aumenta hasta llegar a un máximo en su frecuencia de resonancia para luego volver a descender. El rango de frecuencias del estímulo en que la Z está aumentada es de 3 a 80 Hz aproximadamente.

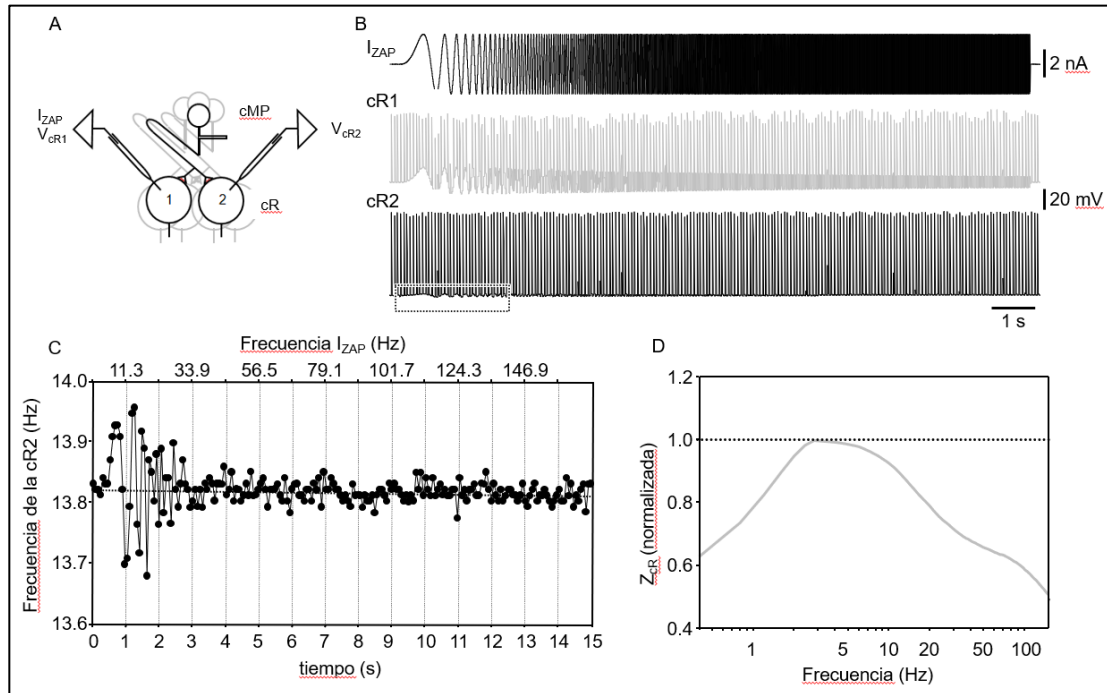


Figura 16: Resonancia del acoplamiento cR-cMP. **A.** Esquema del diseño experimental en el que se señala el registro de las cR utilizando pipetas de patch (V_{cR1} y V_{cR2}). A través de uno de los electrodos de registro se inyecta una corriente sinusoidal (I_{ZAP}) a una de las células. **B.** Registros simultáneos de cR (cR1, trazado medio, y cR2, trazado inferior) durante la aplicación de una I_{ZAP} a la cR1 (trazado superior). La I_{ZAP} (2 nA; 0-155 Hz, 15 s) provoca en la cR (célula 1) cambios de voltaje sinusoidales de su potencial de membrana que varía entre -88 mV a -68 mV desde su V_m de -76 mV (cR1, trazado medio). La cR2 también responde a la I_{ZAP} aplicada a la cR1 con cambios de voltaje sinusoidales, pero de menor amplitud (recuadro, -78 mV a -75 mV) a partir de su V_m de -76 mV. **C.** Gráfico de la frecuencia de descarga de la cR2 en función del tiempo, modulada por la I_{ZAP} aplicada a la cR1. En el eje superior del gráfico se indica la frecuencia teórica alcanzada por la I_{ZAP} . La modificación de potencial en la cR1 provoca un cambio en la frecuencia de descarga de la cR2. La frecuencia de descarga de la cR2 se modifica en forma sinusoidal, alcanzando un cambio máximo de la frecuencia de la I_{ZAP} de 11 Hz. Para frecuencias superiores a 40 Hz, la cR2 adopta una frecuencia de descarga constante, en el entorno de su frecuencia basal. **D.** Gráfico representativo de la impedancia de una cR (Z_{cR}), normalizada a la impedancia máxima, en función de la frecuencia del estímulo. Las propiedades resonantes de la cMP fueron exploradas en células silentes sobre el potencial de reposo de la célula (cerca de -80 mV), y en el rango subumbral (-120 a -50 mV). Se muestra que la misma aumenta hasta llegar a un máximo en su frecuencia de resonancia para luego volver a descender. El rango de frecuencias del estímulo en que la Z está aumentada es de 1 a 20 Hz aproximadamente.

v. Acoplamiento para colorante

La detección de un colorante de bajo peso molecular en una neurona acoplada electrotónicamente a la neurona a la cual fue inyectado es considerada una evidencia sólida del sustrato molecular de dicho acople. En efecto, la transferencia de colorante de una neurona a otra (acople para colorante) ha sido considerado como indicativo de la existencia de uniones gap entre ellas (Nagy y col., 2018). Nos propusimos explorar el acople para colorante (neurobiotina) entre las neuronas del NEB. Esta técnica fue ensayada en múltiples rodajas y se inyectó neurobiotina en una única neurona por experimento. Hasta el momento, hemos obtenido marcaje de la neurona registrada (cR) en 2 oportunidades (2/13). En uno de los experimentos (resultado ilustrado en la Fig. 17A) no se observó acople para colorante a nivel de las cR en tanto que en el experimento restante (Fig. 17B) dos cR mostraron acople. En este último caso, las neuronas acopladas se ubicaron en sectores disímiles del sector ventral del núcleo (población de cR), una dorsal

y otra ventral y lateral en relación a la cR inyectada y a distancias aproximadas de 50 y 100 μm , respectivamente. Pese a la variabilidad en la incidencia de acople para colorante entre cR, en ambos experimentos se detectó acople para colorante en las cMP. En el primer caso (Fig. 17A) se marcó una única cMP en tanto que en el restante dos cMP mostraron acople para colorante (Fig. 17B).

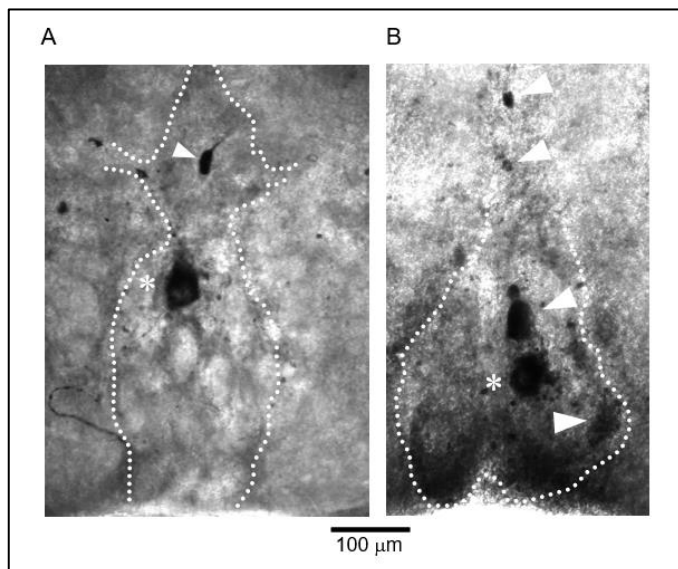


Figura 17: El acople para colorante evidencia la presencia de uniones gap. Cortes transversales del NEB de *G. omarorum*. En ambos casos, una única cR fue inyectada con neurobiotina (señalada por el asterisco). **A.** Una cMP, localizada en el sector dorsal del NEB, mostró acople para colorante (punta de flecha). **B.** En este corte se observan 2 cMP con acople para colorante (cabezas de flecha en el sector dorsal del NEB), así como también dos cR (cabezas de flecha en el sector ventral). En ninguno de los casos se observa aposición de membranas somáticas entre las cR.

vi. Efecto del bloqueo de las uniones gap sobre el desempeño del NEB

Desafortunadamente, no se dispone aún de bloqueantes de las uniones gap de alta especificidad (Juszczak y Swiergiel, 2009). Nos propusimos igualmente ensayar el efecto del ácido meclofenámico (MFA, 200 μM), inhibidor no esteroideo de la ciclooxigenasa con un IC50 en el orden de 25–40 μM destacado por su potencia (Harks y col., 2001), sobre la actividad rítmica del NEB, para evaluar el aporte de la conectividad intrínseca sobre su desempeño como marcapaso. La Fig. 18A resume el efecto de la perfusión de MFA sobre la descarga rítmica del NEB ($n=5$). En todos los casos MFA provocó un incremento progresivo del intervalo natural (reducción de la frecuencia espontánea) que comenzó a partir de los 6 minutos de iniciada la perfusión. Este aumento alcanzó un 15% por encima del intervalo control a los 45 min ($15.41\% \pm 6.06$, test *U* de Mann-Whitney, $p=0.016$, $n=5$). En algunos casos (3 de 5), la descarga espontánea del NEB cesó luego de transcurridos 50 minutos del inicio de la perfusión.

Dados los efectos inespecíficos que han sido reportados para los bloqueantes de las uniones gap (Peretz y col., 2005; Juszczak y Swiergiel, 2009), el cambio del intervalo observado en estos experimentos puede ser atribuido tanto al efecto específico de MFA sobre las uniones gap como a su capacidad de modular diversas conductancias de membrana operadas por voltaje. Para avanzar en los mecanismos implicados en los efectos de MFA sobre la actividad rítmica del NEB se analizó el efecto del bloqueante sobre el acople electrotonico de las cR en un experimento de registro de pares. En el experimento, el NEB carecía de descarga espontánea rítmica. Se analizó los cambios operados en el CC y en la Rin de la neurona presináptica provocados por la perfusión de MFA (200 μM). En la Fig. 18B se ilustran los ΔV_m en ambas células provocados por la inyección de un pulso cuadrado de corriente hiperpolarizante antes (CONTROL) y luego de 90 minutos de perfusión con el bloqueante (MFA). Antes de la aplicación de MFA, se confirmó el acople electrotonico entre las dos cR del par. En efecto, la hiperpolarización

presináptica (V1) se propagó a la célula postsináptica (V2) con un CC1-2 de 0.105, valor comprendido en el rango descrito en la sección iii para las cR. MFA incrementó sustancialmente la amplitud de la respuesta hiperpolarizante, tanto en la neurona pre como en la postsináptica, durante la cual la rectificación presumiblemente provocada por I_h , se hizo más evidente (Fig. 18B). En estas condiciones, el CC1-2 fue 0.027. En la Fig. 18C se muestra el curso temporal del efecto de MFA sobre la Rin1 y el CC1-2. MFA produjo la reducción progresiva del CC a partir de los 20 minutos de iniciada la perfusión llegando a un 26% del control a los 90 minutos. Paralelamente, se produjo un incremento progresivo de Rin1 que superó el 400% a los 90 minutos de iniciada la perfusión. Estos resultados sugieren que la reducción de la actividad del NEB provocada por MFA puede deberse al bloqueo de las uniones de gap por MFA pero no descarta la eventual modulación de conductancias de membrana implicadas en el control de la excitabilidad neuronal (Lee y Wang, 1999; Ghamari-Langroudi y Bourque, 2002; Peretz et al., 2005; Miceli y col., 2008; Huang y col., 2013).

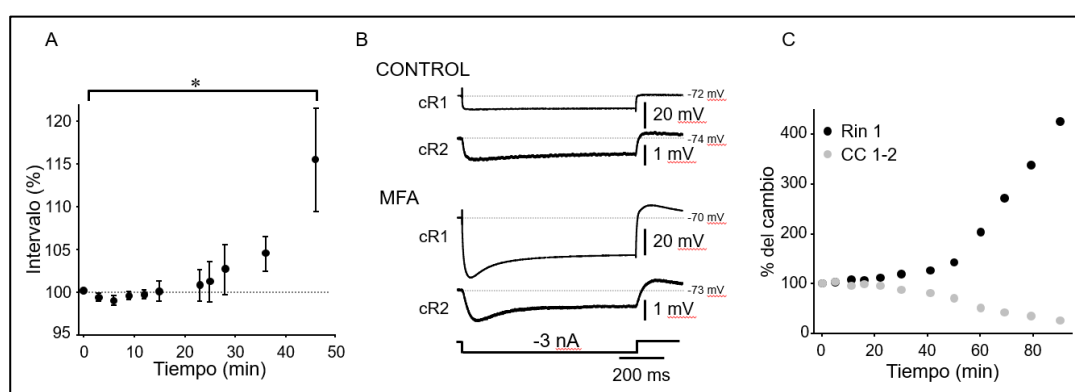


Figura 18: El bloqueo de las uniones gap afecta el desempeño del NEB. La perfusión de ácido meclofenámico (MFA 200 μ M) provocó la reducción de la frecuencia de la descarga rítmica del NEB. **A.** Gráfico del intervalo de la descarga, mostrado como el porcentaje de la descarga basal, en función del tiempo de perfusión del MFA. El efecto lento comienza a observarse a partir de los 6 minutos y el intervalo muestra un incremento significativo del 15.41 ± 6.06 % a los 45 minutos (test de Mann-Whitney, $p=0.016$, $n=5$). **B.** CONTROL: Registro simultáneo, en configuración de registro de célula entera, de un par de cR acopladas electrotónicamente sin descarga espontánea. Se observa la respuesta de ambas células (cR1 y cR2) a la aplicación de un pulso de corriente hiperpolarizante (800 ms, 3 nA, trazado inferior) a la cR1. MFA: Después de 90 minutos en presencia de MFA (200 μ M), se observó un aumento de la caída de voltaje provocada por el pulso hiperpolarizante, tanto en la cR1 como en la cR2. Asimismo, el sag provocado probablemente por la activación de la I_h se intensificó. **C.** A partir de los datos obtenidos del registro del par mostrado en **B**, se representa gráficamente el cambio de la Rin de la cR1 (como porcentaje de la Rin control, círculos negros) y del CC 1-2 (como porcentaje del CC 1-2 control, círculos grises) en función del tiempo de perfusión del MFA. La Rin aumentó progresivamente hasta superar la Rin control en un 425%. Por su parte el CC 1-2 en presencia de MFA se redujo en un 74%.

c. Discusión

En Gymnotiformes, la DOE es una salida comportamental (eferencia electromotora) rítmica y relativamente estereotipada. Su frecuencia y forma de onda determinan el desempeño del sistema electrosensorial y transmiten información acerca de la especie, del sexo, del estado fisiológico, de la madurez sexual, de la estación del año, de la hora del día e incluso del estado motivacional (Bennett, 1971; Caputi y col., 2005; Migliaro y Silva, 2016) a lo largo de toda la vida del animal. En línea con su relevancia biológica, en estas especies han evolucionado un conjunto de mecanismos celulares y circuitales que aseguran el desempeño del sistema electromotor (Crampton, 2019).

Las características de la conectividad intrínseca del NEB reveladas en nuestro estudio sustentan varias propiedades funcionales de este núcleo: i.- como generador del comando rítmico para la DOE y ii.- como integrador de influencias descendentes, responsable de la producción de modulaciones de la DOE utilizadas en la exploración sensorial del entorno o como señales de comunicación. En efecto, el contacto entre cMP contribuye a la sincronización de un conjunto de marcapasos celulares, generando un comando rítmico robusto con escasa variabilidad intrínseca pero pasible de ser modulado por ePreMP para adaptar el desempeño del NEB a distintos contextos comportamentales. Por su parte, el acople electrotónico entre cR implicaría una contribución adicional al sincronismo del comando descendente hacia la médula espinal requerido para la elaboración de la forma de onda de la DOE. La existencia de acople electrotónico cMP-cR aportaría un alto factor de seguridad para la transmisión ortodrómica del comando rítmico desde las cMP hacia las cR. Esta sección aborda la discusión de estos aspectos de la conectividad intrínseca del NEB y su aporte a un modelo de organización anatómico-funcional del núcleo adaptada a las demandas funcionales del sistema electrogenerador en Gymnotiformes.

Las primeras evidencias de acople electrotónico entre las células del NEB de peces de onda y de pulso fueron reportadas hace más de cinco décadas (Bennett y col., 1967). En un extenso trabajo, estos autores postularon la existencia de acople en los contactos cMP-cMP, cR-cR y cMP-cR, en varias especies, en base a evidencias electrofisiológicas obtenidas en experimentos in vivo y el análisis de resultados obtenidos con técnicas de microscopía electrónica. El análisis de la conectividad entre neuronas del NEB se llevó a cabo principalmente a través de la evaluación de los cambios de la frecuencia de descarga de la DOE provocados por la polarización de cMP y del aporte de las cMP y cR registradas a la descarga espontánea rítmica. En el presente trabajo, se llevó a cabo una caracterización primaria del acople electrotónico entre neuronas del NEB utilizando abordajes similares in vitro. A nivel de las cMP, el efecto de la polarización de una neurona sobre la frecuencia del NEB permitió confirmar la existencia de acople electrotónico entre cMP. Nuestro estudio permitió, además, determinar el carácter no rectificador del contacto entre estas células, así como cuantificar la eficacia de la maniobra a través del cálculo de la pendiente de la curva intervalo vs ΔV_m (Fig. 8C). Asumiendo que la magnitud de cambio del intervalo depende de la magnitud del estímulo (ΔV_m) y del número de neuronas acopladas afectadas por la polarización, se entendió que la pendiente de la curva guarda relación directa con el grado de acoplamiento entre las cMP. La dispersión de los valores de las pendientes (Fig. 8D) sugiere la variabilidad del grado de acople. Evidencias indirectas adicionales de acople electrotónico entre cMP y entre cR se obtuvieron en experimentos de bloqueo del aporte de la célula registrada a la descarga espontánea rítmica (Fig. 10). Estos experimentos, similares a los desarrollados por Bennett y col. (1967) y conceptualmente comparables al utilizado en ratas por Baker y Llinás (1971) en el estudio del acople electrotónico entre neuronas del núcleo mesencefálico del trigémino y por Connors y col. (1983) en neuronas corticales, buscaron determinar el origen del PA espontáneo registrado en una neurona del NEB. Consistentemente con la existencia de acople electrotónico, demostramos que el PA espontáneo en las neuronas del NEB tiene un doble origen: la espiga generada por las neuronas acopladas con la registrada (espiga acoplada) y la espiga generada en la célula. Este abordaje, aun cuando ofrece una estimación de la magnitud de la espiga acoplada, parámetro que depende del número de células acopladas y del grado de acople durante la espiga, no es adecuado para cuantificar

dicho acople. La amplitud relativa de la espiga acoplada fue similar para las cMP y las cR (Fig. 10C). La elevada dispersión observada para ambos tipos celulares sugiere la variabilidad del grado de acople, aunque no es posible descartar el aporte de la variabilidad en el número de neuronas acopladas (Fig. 10C).

Si bien estos abordajes aportaron valiosa evidencia indirecta en favor de la existencia de acople electrotónico entre cMP y entre cR y de algunas de sus características funcionales, no permiten avanzar en su cuantificación. El modelo *in vitro* desarrollado para este trabajo permitió la implementación de la técnica de registro de pares a través de la cual se hizo posible la confirmación del acople electrotónico entre las neuronas del par y la cuantificación del grado de acople a través del cálculo de parámetros de uso corriente en el estudio de las sinapsis eléctricas (Bennett, 1966; Connors y Long, 2004). En nuestras manos esta técnica se aplicó con relativo éxito para pares de cR (Fig. 11), habiendo logrado el registro de un único par de cMP. Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo en *Gymnotiformes* que reporta la cuantificación del acople electrotónico en el estado estacionario entre neuronas identificadas del NEB, y sistematizadas según el tipo celular (cMP-cMP o cR-cR), mediante la estimación del CC, la R_{transf} y R_j en registro de pares. Moortgat y col. (2000) dan cuenta de la utilización de esta técnica en un *Gymnotiforme* de onda, con la que estimaron el CC de la espiga mediante el bloqueo por hiperpolarización del PA en una de las neuronas del par sin discriminar, en su análisis, si los datos provienen de pares homólogos (cMP-cMP, cR-cR) o heterólogos (cMP-cR).

En conjunto, los resultados derivados del registro de pares en nuestro modelo mostraron una incidencia del acople cercana al 50%. En virtud de que los parámetros calculados CC, R_{transf} y R_j para el par de cMP se ubicaron a mitad de rango de los calculados para los pares de cR, en lo que sigue en esta sección se hará referencia a valores promedio obtenidos de todos los pares registrados. A juzgar por la dispersión de los valores de los parámetros de acople (particularmente para R_{transf} y R_j , Fig. 13A,D), el grado de acople entre pares de neuronas homólogos del NEB es variable pero en conjunto (CC ~ 0.060 , $R_{transf} \sim 411$ k Ω y $R_j \sim 424.1$ M Ω) sugieren que la magnitud del acople es relativamente baja (ver revisión Curti y col., 2022). El hecho de que en nuestras estimaciones en los pares registrados $R_j \gg R_{in}$ apunta en la misma dirección (Pereda y col., 2013; Curti y col., 2022). La independencia de la magnitud del acople con la distancia entre las neuronas del par (Fig. 12D y Fig. 13 C,F) y la dispersión de las cR que mostraron acople para colorante (Fig. 17B) sugiere un patrón de conectividad entre cR, al menos en el plano transversal, tendiente a promover el sincronismo entre neuronas dispersas en el sector ventral del NEB y no entre grupos compactos como ocurre en otros sistemas (Curti y col., 2012). La dispersión de neuronas conectadas conjuntamente con los bajos valores de los parámetros de acople sugieren que los contactos entre neuronas acopladas se establecen a nivel de sus prolongaciones (Devor y Yarom, 2002; Venance y col., 2004; Christie y col., 2005; Russo y col., 2013).

Consistentemente con los hallazgos de los experimentos de polarización de célula única (ver más arriba) el contacto entre cMP y cR analizado en los pares acoplados, mostró bidireccionalidad (Fig. 12B,C y Fig.13B) a través de contactos no rectificadores (13E). La unidireccionalidad de los contactos eléctricos entre neuronas, i.e.: la asimetría en la capacidad de conducir cambios de potencial mostrando un sentido de propagación preferente (Connors, 2017; Miller y Pereda, 2017), suele ser atribuido a asimetrías en las propiedades electrofisiológicas pasivas y activas de las células en contacto (membrana extrasináptica) aunque puede que las características conductivas de los canales intercelulares -debido a la composición molecular asimétrica- puede representar un factor

adicional (Rash y col. 2013; O'Brien, 2014). En nuestro modelo experimental los contactos entre cMP y entre cR son esencialmente simétricos probablemente debido a que implican la comunicación entre tipos neuronales homólogos (cMP o cR) con propiedades electrofisiológicas similares. Si bien no es estrictamente el caso de los contactos entre cMP y cR, la linealidad de los cambios del intervalo de descarga del NEB provocados por la polarización de las cR en sentido despolarizante o hiperpolarizante (Fig. 9) sugieren la bidireccionalidad en estos contactos. La eventual asimetría derivada de los factores reseñados más arriba no sería cuantitativamente importante. La realización de registros de pares entre estos dos tipos celulares conectados permitiría confirmar la ausencia de rectificación y avanzar en la caracterización de estos contactos.

El análisis dinámico primario de los contactos entre neuronas del NEB revela su comportamiento con selectividad de frecuencia aunque con preferencia a funcionar como filtro pasa-bajos (Figs. 14, 15 y 16). Aun cuando las propiedades pasivas de las neuronas en contacto parecen dominar la transferencia de frecuencias (Bennett, 1977), el perfil de esta transferencia en el contacto cR-cR (Fig. 14C) sugiere el aporte de conductancias operadas por voltaje de la membrana extrasináptica (Curti y col., 2012). A nivel de las cMP, la transferencia preferente de frecuencias en el entorno de los 11 Hz sugerida por nuestros experimentos de polarización sugiere que en esta población de neuronas la hiperpolarización post-espiga lenta jugaría un papel crítico en la sincronización. En efecto, el curso temporal de este evento electrofisiológico característico de las cMP y de su repertorio de conductancias de membrana, se ajusta razonablemente a la fase negativa de una senoide de 12 Hz (Fig. 19), frecuencia cercana al valor de la frecuencia resonante en la población de cMP. A juzgar por el comportamiento resonante pero con preferencia a las bajas frecuencias revelado en los experimentos de polarización, la espiga de población, con probable contenido de frecuencias mucho mayores (~800 Hz, Fig. 19), tendría un efecto sincronizador mucho menos relevante. Aún cuando el contenido de frecuencias de los cambios de V_m característicos de las cMP queda aún por confirmarse a través de análisis específicos (Fourier, p.ej.), el acople electrotónico cumpliría un papel central no solamente en el sincronismo de esta población de neuronas del NEB, rol característico de estos contactos en poblaciones neuronales (Getting, 1974; Moortgat y col, 2000; Galarreta y Hestrin, 2001; Veruki y Hartveit, 2002; Bennett y Zukin, 2004; Curti y col., 2012; Chagnaud y col., 2021), sino que podría aportar de manera crítica al establecimiento del ritmo al facilitar la propagación de la hiperpolarización post-espiga lenta. El aporte relativo del acople electrotónico y de las propiedades electrofisiológicas activas así como de su interacción dinámica en el comportamiento marcapaso de este grupo de neuronas queda aún por resolverse (Connors, 2017). Acercarse a la resolución definitiva de este punto, como tantos otros en el campo de la neurobiología de las sinapsis eléctricas, espera por el desarrollo de métodos rápidos, efectivos, selectivos, no tóxicos y reversibles para bloquear los canales de las uniones gap (Connors, 2012; Verselis y Srinivas, 2013). El contacto entre cR, por su parte, muestra resonancia pero opera con preferencia al pasaje de bajas frecuencias (Fig. 20). Como se mencionara, nuestros resultados no permiten determinar si el acople electrotónico se establece entre cR o si se establece a través del axón de las cMP que las inervan (o ambas). Este último concepto, fue planteado originalmente por Bennett y col (1967) como hipótesis interpretativa de un conjunto de datos ultraestructurales y electrofisiológicos. Las evidencias electrofisiológicas consideradas en su momento por estos autores, y obtenidas por activación antidrómica de las cR por estímulos espinales, fueron interpretadas erróneamente al desconocer la existencia del M-ARDOE, modulación todo o nada desencadenada por la activación de la célula de

Mauthner por ese mismo tipo de estímulos (Falconi y col., 1997). En cualquier caso es razonable postular que el acople electrotónico entre cR contribuya en alguna medida a la descarga sincrónica de este tipo celular requerida para la generación de la forma de onda de la DOE por parte del resto del sistema electrogenerador (Caputi y col., 2005). En este sentido sería de interés determinar el contenido de frecuencias de la espiga acoplada y, de acuerdo al perfil de transferencia de frecuencias estimado (Fig. 14), evaluar en qué medida el PA ejerce un efecto sincronizador adicional.

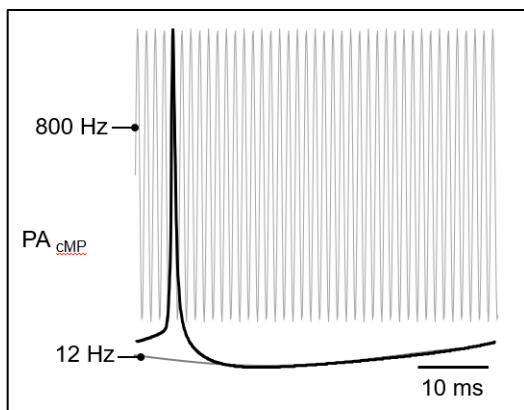


Figura 19: Modelo representativo del contenido de frecuencias del PA de las cMP. La aplicación de la transformada rápida de Fourier a un potencial de acción muestra el contenido de frecuencias del mismo. El pico del PA de la cMP (PA_{cMP}) se encuentra dominado por altas frecuencias, con un componente predominante de 800 Hz representada (trazo gris claro, 800 Hz), en tanto que la hiperpolarización post-espiga está dominada por bajas frecuencias (trazo gris oscuro, 12 Hz).

En qué medida la magnitud del acople entre cMP determina su comportamiento como oscilador robusto pero a la vez modulable por influencias externas capaces de adaptar la referencia rítmica a las cambiantes condiciones del entorno, es un tema de interés actual para el área de los osciladores biológicos. Diversos modelos computacionales han permitido avanzar en las características de una red neuronal con estas propiedades. Gu y col. (2014), por ejemplo, exploran estos aspectos en un modelo de núcleo supraquiasmático. Estos autores encuentran que tanto el grado de acople entre las neuronas como la proporción de neuronas afectadas sincrónicamente por el estímulo externo son determinantes de la magnitud (y curso temporal) del cambio de ritmo provocados por ese estímulo. Reportan asimismo que cuando el estímulo se distribuye en el 100% de las neuronas, los incrementos del grado de acople reducen marcadamente la magnitud de la respuesta. Si el estímulo se distribuye solamente en el 10% de las neuronas, los incrementos del grado de acople se acompañan inicialmente de un incremento de la magnitud de la respuesta hasta alcanzar un máximo. Aumentos ulteriores del grado de acople provocan la reducción progresiva de la respuesta. Para lograr estabilidad y robustez en la generación del ritmo combinado con la capacidad de responder de manera óptima es esperable que el diseño implique valores intermedios de ambas variables. Para el caso de las cMP, probablemente el grado de acople relativamente bajo se ubique en el óptimo para lograr el máximo de respuesta a las entradas procedentes de las ePreMP para lo cual estas entradas deben distribuirse (y activarse sincrónicamente) a un número óptimo de neuronas (Getting, 1974).

El contacto entre cMP y cR parece desempeñar un papel central en la organización anatomo-funcional del NEB asegurando la transmisión del comando rítmico (y sincrónico) generado en las cMP a las cR. Nuestros resultados sugieren el acople electrotónico entre ambos tipos celulares (Fig. 9 y Fig. 16). Este contacto opera de forma bidireccional y como filtro pasa-bajo en el sentido retrógrado (Fig. 20). En efecto, la polarización de la cR es capaz de modificar el intervalo de la descarga espontánea generada en las cMP de manera específica según la polaridad del cambio de V_m : despolarizaciones reducen el intervalo (aceleran) en tanto que las hiperpolarizaciones tienen el efecto contrario y esa transmisión

es óptima para señales con contenidos de frecuencia en el entorno de los 11 Hz. Frecuencias mayores a 40Hz, como las contenidas en el PA espontáneo de la cR p.ej., no generan, aparentemente, ningún efecto sobre la descarga espontánea del NEB. La magnitud de la modificación del intervalo de la descarga del NEB por polarización de las cR ronda el 12% (relación de pendientes promedio cR/cMP= 12.6%) de la producida por polarización de las cMP, confirmando a este tipo celular como verdadero origen del comando rítmico. Este dato sugiere además que el soma de la cR polarizada se encontraría a una distancia electrotonica aparente superior a una constante de espacio del sitio de generación del ritmo en las cMP. El recorrido extranuclear de 300-400 μm del axón de la cMP descrito por Kawasaki y Heiligenberg (1990) para especies emparentadas (reportado para *G. omarorum* por Lorenzo y Trujillo-Cenóz, comunicación personal) podría dar cuenta, al menos en parte, de esa distancia electrotonica aparente. En contraste con el comportamiento de filtro pasa-bajo de la conducción retrógrada (de cR a cMP), en condiciones fisiológicas, se favorece la conducción ortodrómica (de cMP a cR) del PA generado en las cMP por sobre los cambios lentos de potencial en estas células. En efecto, el V_m entre PAs en las cR muestra trayectorias diferentes de la que muestran las cMP (post-potencial despolarizante lento vs hiperpolarización post-espiga lenta-potencial marcapaso). Probablemente, la transmisión electrotonica del PA de las terminales del axón de la cMP (presináptico) contribuya a la espiga acoplada (postsináptica) registrada en las cR en los experimentos de colisión. Es preciso avanzar en el estudio de este contacto evaluando: i. las características del axón y su distribución en las cR en experimentos de marcaje, ii. en la cuantificación de los parámetros del acople electrotonico en estado estacionario entre ambos tipos celulares y iii. el análisis de la transferencia de frecuencia del contacto. En cualquier caso, en sentido ortodrómico, y con un criterio funcional, la transmisión de cMP a cR simularía un filtro pasa-alto pero con gran eficiencia y, en sentido retrógrado, como filtro pasa-bajo con importante atenuación (Fig. 20). Este diseño es funcional a la segregación efectiva de entradas sinápticas a las neuronas del NEB. Los efectos de las entradas sinápticas restringidas a la cMP tienden a provocar exclusivamente cambios de frecuencia de la DOE en tanto el efecto de entradas supraumbrales a las cR queda restringido a estas células.

En suma, aunque parte de nuestros resultados son aún de carácter preliminar, en conjunto sostienen el modelo ilustrado en la Fig. 20. Las características de la conectividad intrínseca representadas parecen funcionalmente adaptadas al diseño del NEB como generador robusto del comando rítmico para la DOE pero pasible de ser modulado de manera específica para generar comportamientos electromotores utilizados tanto en la exploración sensorial del entorno o en la comunicación intraespecífica. Junto con la frecuencia, la forma de onda de la DOE determina el desempeño del sistema electrosensorial y transmite información acerca de la especie, del sexo, del estado fisiológico, de la madurez sexual, de la estación del año, de la hora del día e incluso del estado motivacional (Bennett, 1971; Caputi y col., 2005; Migliaro y Silva, 2016). La forma de onda de la DOE depende de manera crítica del reclutamiento adecuado de las EMns en la ME por parte de un comando descendente sincrónico elaborado a nivel de las cR. Mecanismos de sincronización adicionales a nivel de las cMP y dependientes de la distribución del comando generado a las cR, parecen haber sido seleccionados en estas especies para asegurar el valor biológico de la DOE (Crampton, 2019).

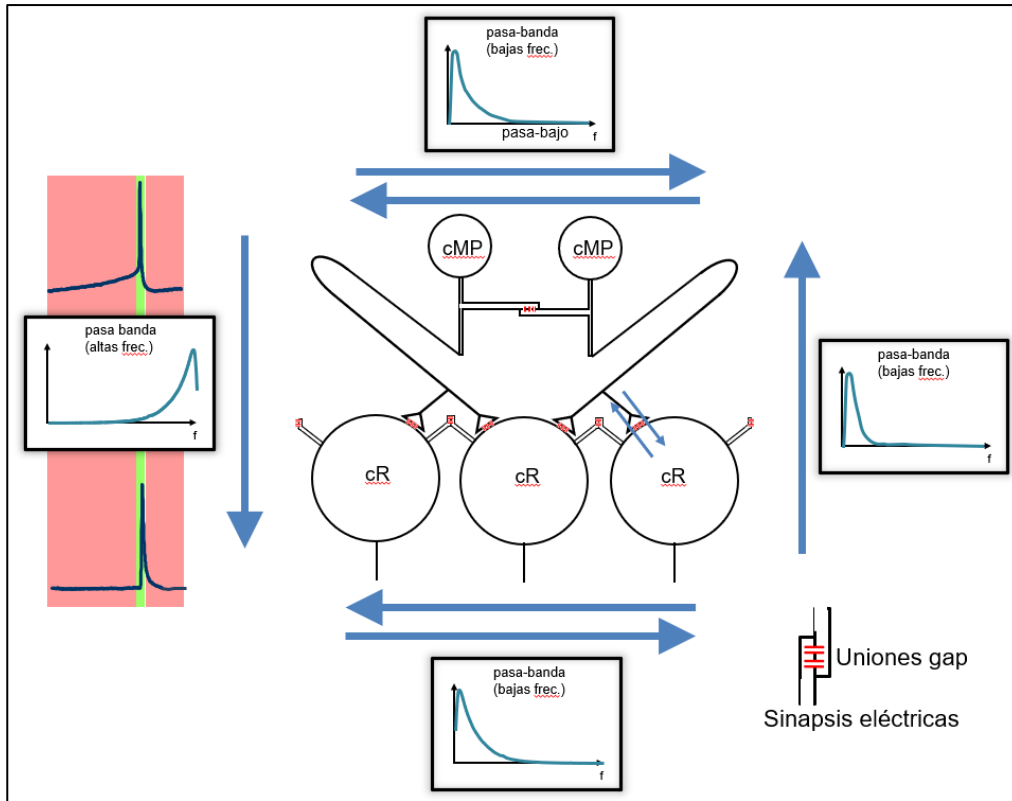


Figura 20: Modelo de conectividad intrínseca del NEB. Los detalles de los componentes funcionales del modelo se discuten en el texto. La organización citoarquitectural se apoya en las características del NEB descritas para *G. omarorum* (Curti y col, 2006) y para especies de Gymnotiformes de pulso emparentadas (Kawasaki y Heiligenberg, 1990). El esquema muestra las células marcapaso (cMP) conectadas entre si a través de uniones gap que funcionan como un filtro pasa-banda bidireccional, con preferencia a las bajas frecuencias. Por su parte, la conexión entre las células de relevancia (cR) podría ser a través de los axones de las cMP y/o a través de sus prolongaciones. Este contacto también funciona como filtro pasa-banda. La transmisión eléctrica entre las cMP y las cR presentaría propiedades de filtro pasa-banda, pero funcionan emulando un filtro pasa-alto, en tanto que en el sentido inverso, es decir desde las cR a las cMP, es tipo pasa-bajo.

9. Discusión general y perspectivas

El NEB puede considerarse como un nodo de convergencia cuya actividad ha evolucionado como un compromiso entre dos funciones vitales en peces eléctricos (Fig. 21): la electrorrecepción activa, que requiere una DOE estereotipada y regular para su uso como portador de energía para la percepción; y la electrocomunicación, que requiere una salida electromotora flexible capaz de permitir el diálogo eléctrico entre individuos de la misma especie en diversos contextos comportamentales (Field y col., 2019; Lucas y col., 2019; Comas y col., 2019). La organización anátomo-funcional del NEB debe efectivamente asegurar ambos regímenes de funcionamiento, y se basa en la conectividad intrínseca del NEB a través de uniones gap y la existencia de dos grupos celulares encargados de la generación del ritmo (cMP) y de la forma de onda (cR) de la DOE.

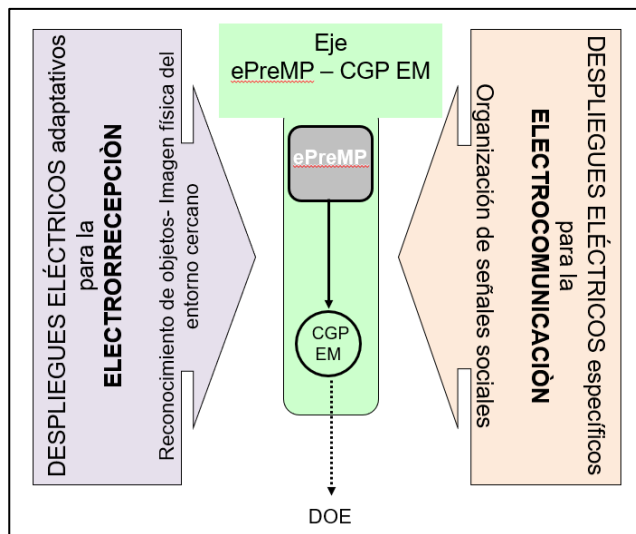


Figura 21: Esquema conceptual de la función del CGP-EM. El NEB (el CGP-EM) es un nodo sobre el que convergen dos funciones vitales: la electrorrecepción activa, para lo cual es necesario una DOE estereotipada y regular; y la electrocomunicación, para lo cual es necesaria una descarga cuya forma de onda pueda ser modulable. Ambas funciones compiten por una sola salida comportamental (DOE). El CGP-EM integra la información proveniente de las ePreMP y comanda la eferencia, modificando la frecuencia y/o la forma de onda adaptándose a las demandas del entorno.

En este trabajo cuantificamos el acoplamiento electrotónico, a través de uniones gap, entre las neuronas del NEB, mostrando que se trata de contactos débiles bidireccionales. De acuerdo a nuestros datos, las características del acoplamiento entre pares homólogos difieren de los contactos cMP-cR respecto a la capacidad de transmisión de señales eléctricas con distintos contenidos de frecuencia. Es así que las cMP funcionan como un verdadero subnúcleo encargado de la generación del comando rítmico y sincronizado del CGP-EM. Como consecuencia de las propiedades de filtro pasa-bajo, el evento sincronizador podría ser el potencial post-espiga (Fig. 19). Por su parte, la consecuencia del acoplamiento entre las cR es la sincronización entre estas neuronas, generando la proyección de un comando que recluta ordenadamente al resto del sistema electromotor. Estas células están acopladas probablemente a nivel de sus prolongaciones, aunque nuestros resultados no pueden descartar que el acople sea a través de los axones de las cMP. El reclutamiento de las cR por parte de las cMP es a través de un contacto electrotónico que simula el funcionamiento de un filtro pasa-altos (Fig. 20). En efecto, los PA generados en las cMP reclutan a las cR con alta eficacia, asegurando la transmisión del comando rítmico, y como consecuencia, un PA en las cMP provoca un PA en las cR. Asimismo, el contacto retrógrado (cR-cMP) presenta características de filtro pasa-bajos. Las características del axón de las cMP podrían estar en la base del arreglo temporal resultante entre la descarga sincrónica de ambas poblaciones (alrededor de 1 ms) y contribuiría a impedir la transmisión retrógrada del PA sincrónico de las cR, favoreciendo además la segregación efectiva de entradas sinápticas a las cMP y cR, de forma tal que la

actividad supraumbrales en las cR no afecta la actividad rítmica de las cMP. Además de otorgarle al NEB la capacidad de funcionar como un CGP coordinado para la generación de la DOE, las características del acople permiten la segregación funcional de los dos subnúcleos -cMP y cR-, favoreciendo que las modulaciones de ritmo y forma de onda puedan ser generadas de forma independiente.

Durante décadas, la investigación en Gymnotiformes arrojó abundante evidencia experimental indicando que el patrón de inervación del NEB era responsable exclusivo del repertorio electromotor en una especie dada. En esta tesis aportamos evidencia que sugiere que la estrategia neural para la generación del repertorio electromotor en estas especies incluye la modulación de la excitabilidad de las neuronas del NEB. Nuestro aporte se apoya en los siguientes elementos:

a. Ausencia de receptores glutamatérgicos en las cR: En *G. omarorum* confirmamos la ausencia de receptores glutamatérgicos en las cR en dos situaciones experimentales diferentes: i- en una preparación in vitro del NEB, y ii- en animales in vivo que fueran sometidos a un desafío comportamental.

En la preparación in vitro, la ausencia de receptores glutamatérgicos se evidenció a través de la aplicación de glutamato o sus agonistas de forma yuxtacelular a las cR. En estas condiciones no se observaron evidencias que sugiriera la presencia de estos receptores. En los registros intracelulares de cR, la presencia de glutamato no modificó el potencial de membrana de las células ni la frecuencia de descarga, cambios observados en otras especies de Gymnotiformes. Se ha descrito que la acción de glutamato sobre los rNMDA media las interrupciones, provocando la despolarización de tipo meseta en las cR. Durante este potencial, las cR no generan PAs. Por su parte, la activación de los rAMPA en estas células provoca su descarga repetitiva, asociada a los “chirps”. Tampoco se observó modificación de la frecuencia de descarga de la DOE cuando la aplicación de glutamato se realizó en las inmediaciones de las cR en los animales con desafío comportamental. Este desafío consistió en encuentros agonísticos en los cuales los animales emitieron señales de sumisión (“chirps” e interrupciones) durante el desafío, minutos antes de la aplicación de glutamato. Estos resultados sugieren fuertemente que la expresión transitoria de receptores glutamatérgicos promovido por el desafío comportamental no es una estrategia presente en esta especie. En ninguna de las dos preparaciones se observó, en presencia de glutamato, variabilidad del potencial mínimo de membrana (in vitro) o del potencial inter-DOE (in vivo), que caracteriza la descarga durante los “chirps” (Comas y col., 2019).

b. Modulación de la excitabilidad neuronal para la producción del chirp: En este trabajo, proponemos que la modulación de la excitabilidad de las neuronas del NEB es un mecanismo que debe ser considerado al analizar las estrategias para la generación de comportamientos electromotores. Esta propuesta se basa en los resultados obtenidos al bloquear canales de K^+ sensibles a la 4-AP, bloqueante de conductancias de K^+ de la familia de las corrientes de tipo I_A . En la preparación de NEB in vitro, en presencia de bajas concentraciones de 4-AP, las cR aumentan su excitabilidad y se despolarizan, generando un potencial meseta y brotes de PAs, que alcanzan frecuencias similares a las observadas durante el “chirp”. Adicionalmente, cuando se inyectó 4-AP en las inmediaciones de las cR in vivo, observamos que la probabilidad de una descarga tipo chirp aumentó al emular el ataque del pez dominante a través de la estimulación del ALLn.

c. *Primera evidencia de la existencia de contactos glutamatérgicos de tipo AMPA-NMDA en Gymnotiformes*: Si bien esta evidencia no implica un cambio de estrategia para la generación de comportamientos electromotores, la evidencia de la existencia de contactos glutamatérgicos de tipo AMPA-NMDA agrega un nuevo mecanismo, hasta el momento no descrito. A través de la estimulación de aferentes glutamatérgicas al NEB y utilizando bloqueantes específicos para receptores de tipo AMPA y NMDA de manera secuencial, se evidenció la existencia de un componente NMDA dependiente de la activación de rAMPA. Las maniobras experimentales permitieron confirmar también la existencia de contactos solo NMDA, pero no se obtuvieron evidencias que pudieran confirmar la presencia de contactos solo AMPA. Las maniobras experimentales realizadas también permitieron confirmar la presencia de receptores glutamatérgicos metabotrópicos en las cMP, siendo en *G. omarorum* en la única en las que se han descrito hasta el momento. La combinación de los diferentes tipos de receptores con diferentes cinéticas aporta a la diversidad de comportamientos electromotores.

d. *La interrupción durante la conducta agonística depende de la activación de receptores GABAérgicos*: Si bien en otras especies de Gymnotiformes se ha descrito la presencia de receptores GABAérgicos en las cMP, en este trabajo se presenta la primera evidencia de su presencia en *G. omarorum*. En efecto, en experimentos in vivo, la aplicación de GABA en las vecindades de las cMP provoca interrupciones de la DOE. El curso temporal del cese de la descarga y el reinicio de la misma es comparable al medido en las interrupciones registradas durante la interacción con un pez dominante.

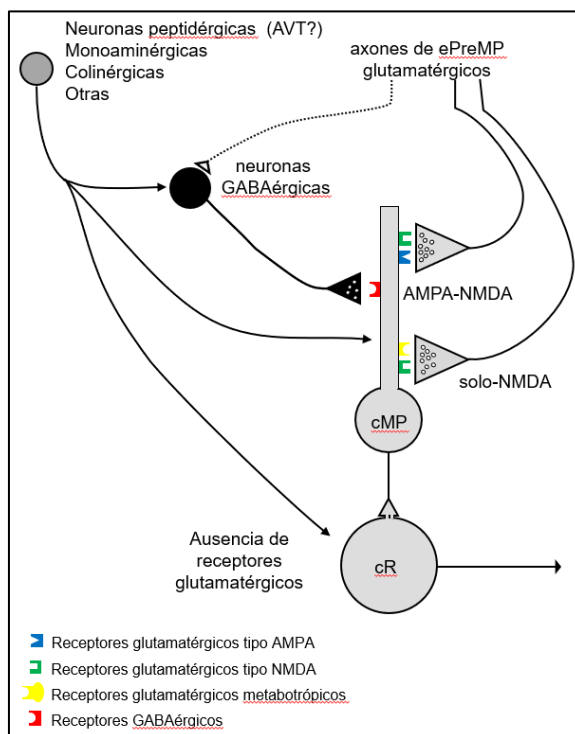


Figura 22: Resumen esquemático actualizado del patrón de inervación del NEB de *Gymnotus omarorum*. En esta especie, las células de relevo (cR) carecen de receptores glutamatérgicos. Las células marcapaso (cMP) expresan receptores glutamatérgicos ionotrópicos de tipo AMPA y NMDA, y metabotrópicos, así como también GABAérgicos. En el contexto de diferentes comportamientos electromotores, las aferentes glutamatérgicas provenientes de ePreMP hacen sinapsis con las cMP a través de contactos que reclutan diferentes combinaciones de estos receptores. La activación de la célula de Mauthner tiene como consecuencia el reclutamiento de receptores de tipo NMDA y metabotrópicos (sólo-NMDA). Otras aferentes contactan las cMP activando conjuntamente receptores de tipo AMPA y NMDA. Las señales de sumisión en el contexto de encuentros agonísticos, las ePreMP podrían reclutar interneuronas GABAérgicas que proyectan sobre las cMP. Asimismo, la acción de neuromoduladores (neuronas peptidérgicas, monoaminérgicas, colinérgicas u otras) estarían involucrados en la modulación de las propiedades intrínsecas de las cMP así como también de las cR. Estas neuronas podrían ser responsables del reclutamiento de las interneuronas GABAérgicas. Se ilustran los diversos receptores involucrados según la clave incluida abajo a la derecha. (De acuerdo a Falconi y col., 1997 y Curti y col., 1999; Comas y col., 2018, 2019; Comas y Borde, 2021).

también de las cR. Estas neuronas podrían ser responsables del reclutamiento de las interneuronas GABAérgicas. Se ilustran los diversos receptores involucrados según la clave incluida abajo a la derecha. (De acuerdo a Falconi y col., 1997 y Curti y col., 1999; Comas y col., 2018, 2019; Comas y Borde, 2021).

De acuerdo a los hallazgos aquí mencionados, la visión actual del control del CPG-EM se diagrama en la Fig. 22. En el resumen se observan los dos tipos neuronales acoplados electrotonicamente, representados por cMP y cR, y distintas proyecciones sobre

ellas. Por un lado, las ePreMP glutamatérgicas que contactan únicamente a las cMP, a través de contactos de tipo solo-NMDA (con receptores de tipo NMDA y de tipo metabotrópicos) y contactos AMPA-NMDA. Asimismo, se especula que las ePreMP podrían reclutar interneuronas GABAérgicas que proyectan sobre las cMP, donde activan receptores GABAérgicos. Por otro lado, neuronas peptidérgicas, monoaminérgicas, colinérgicas u neurohormonas podrían ser responsables de la liberación de neuromoduladores que modificarían las propiedades intrínsecas de las neuronas del NEB. Esta tesis amplía la perspectiva original basada exclusivamente en el patrón de innervación del núcleo por parte de ePreMP como determinante del repertorio de modulaciones de la DOE.

Si bien estos resultados aportan significativamente al conocimiento de la organización anátomo-funcional de un núcleo marcapaso del SNC de vertebrados (el NEB), a la conectividad intrínseca del núcleo y a la modulación de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas del NEB como elementos que contribuyen centralmente a la estrategia neural para la organización de comportamientos electromotores en Gymnotiformes, es necesario avanzar en el conocimiento de la conectividad, aportando datos a través de:

- el registro de pares cMP-cMP, para cuantificar la magnitud del acoplamiento entre estas células.
- el registro de pares cMP-cR, fundamental para caracterizar el acoplamiento heterólogo para el estado estacionario y el análisis de transferencia de frecuencia.
- este estudio fue hecho en rodajas coronales del NEB. La conectividad entre regiones rostrales y caudales del NEB en rodajas horizontales debe ser aún explorada.
- el acople indirecto entre las cR, esto es a través de axones de cMP, podría explicar el bajo CC. Alternativamente, el bajo CC se podría explicar por la cantidad de neuronas que se acoplan a una célula. Otra posible explicación, no excluyente de la anterior, es la existencia de neuronas interpuestas entre las dos cR registradas. Para poder aportar evidencias contundentes acerca de la manera en que las cR se contactan electrotónicamente se deben realizar experimentos complementarios, como la utilización de colorantes en las pipetas de registro.
- la utilización de colorantes para conocer las características del axón de las cMP y su distribución sobre las cR. Además, la utilización de un marcador fluorescente de bajo peso molecular en pipetas de registro permitiría conocer el patrón de conexión entre las neuronas del NEB, esto es la cantidad de neuronas homólogas y heterólogas se contacta un tipo celular del NEB.
- la inmunohistoquímica para conocer la naturaleza molecular de las uniones gap. La Cx35, proteína homóloga a la Cx36 ampliamente distribuida en el cerebro de mamíferos y restringida a las uniones gap neuronales, podría estar presente en las neuronas del NEB. Existen evidencias de su amplia distribución en el SNC de peces teleósteos. Asimismo se deben analizar las diferencias moleculares entre la pre y post-sinapsis, utilizando distintos anticuerpos contra las diferentes conexas. Estos experimentos asociados con la aplicación de colorantes de alto peso molecular, podría aportar información acerca de la conectividad entre las cR.

Además, este trabajo deja abiertas líneas de trabajo en el contexto del patrón de innervación del NEB, que guiarán el trabajo a futuro, tales como:

- la generación de chirps en *G. omarorum* parece depender de la modulación de la excitabilidad de las cR. El registro intracelular de cR durante su estimulación con pulsos de corriente de amplitud creciente para analizar un posible cambio de excitabilidad en la preparación in vivo de peces control y subordinados aportaría información en este sentido. Asimismo, es fundamental caracterizar las conductancias de membrana presentes en las cR. El desarrollo de un preparado con células aisladas que admita la posibilidad de registros de fijación de voltaje de estas células para poder aislar las conductancias de membrana es un camino en el que se debe avanzar.
- la generación de brotes de PAs en las cR depende aparentemente de la despolarización masiva de las cMP. ¿Cuál es el mecanismo responsable de esta despolarización? Una posibilidad es que el mismo neuromodulador que aumenta la excitabilidad en las cR también sea responsable de modular las propiedades intrínsecas de las cMP. También podría modular las propiedades de la unión gap, favoreciendo el pasaje de señales lentas desde las cMP que faciliten la meseta en las cR. En cualquiera de los casos, un objetivo es determinar la naturaleza del modulador de las propiedades intrínsecas de las células del NEB.
- el control GABAérgico también ha sido poco explorado en el NEB de Gymnotiformes. El mecanismo responsable de la interrupción de la DOE como señal de sumisión parece depender de la acción GABAérgica sobre las cMP. Sin embargo, la interrupción de la DOE no es instantánea, sino que está precedida de una disminución de la frecuencia de descarga. Un mecanismo posible sería un efecto desacoplante de las cMP.
- siendo las cMP, blanco de entrada sinápticas que modulan la frecuencia de la DOE, ¿de qué manera las propiedades del contacto entre cMP (filtro pasa-bajo, sin rectificación) contribuyen a las características de las respuestas a esas entradas?
- los rAMPA en las cMP son activados por aferentes de las ePreMP, sin embargo aún queda por conocer los posibles contextos en los cuales estos receptores son activados. Asimismo, aunque confirmamos la existencia de contactos AMPA-NMDA, queda por determinar la existencia de contactos sólo-AMPA.
- la ganancia de los contactos glutamatérgicos solo-NMDA -que generan respuestas postsinápticas lentas- podría ser mayor que la ganancia de contactos solo-AMPA o AMPA-NMDA con cinéticas de las corrientes postsinápticas más rápidas. La magnitud de los cambios de frecuencia de la DOE podría variar con el grado de sincronismo con que las cMP son activadas por las aferentes glutamatérgicas. ¿Es esperable el acople electrotónico entre neuronas de las ePreMP para optimizar su efecto modulador sobre la actividad de las cMP del NEB?

10. Bibliografía

- Aguilera, P. A., Caputi, A. A. (2003). Electroreception in *G. carapo*: Detection of changes in waveform of the electrosensory signals. *Journal of Experimental Biology*, 206(6), 989–998.
<https://doi.org/10.1242/jeb.00198>
- Alcamí, P., Pereda, A. E. (2019). Beyond plasticity: the dynamic impact of electrical synapses on neural circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(5), 253–271. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0133-5>
- Alves-Gomes, J. A. (2019). Evolution and physiology of electroreceptors and electric organs in neotropical fish. In *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish* (pp. 115–145).
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815872-2.00006-3>
- Antal, M., Fukazawa, Y., Eördögh, M., Muszil, D., Molnár, E., Itakura, M., Takahashi, M., Shigemoto, R. (2008). Numbers, Densities, and Colocalization of AMPA- and NMDA-Type Glutamate Receptors at Individual Synapses in the Superficial Spinal Dorsal Horn of Rats. *Journal of Neuroscience*, 28(39), 9692–9701. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1551-08.2008>
- Asztely, F., Erdemli, G., Kullmann, D. M. (1997). Extrasynaptic glutamate spillover in the hippocampus: Dependence on temperature and the role of active glutamate uptake. *Neuron*, 18(2), 281–293.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80268-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80268-8)
- Baillet-Derbin, C. (1988). Motoneuron organization in the spinal cord of three teleost fishes, *Gymnotus carapo* (Gymnotidae), *Gnathonemus petersii* (Mormyridae) and *Salmo trutta* (Salmonidae). *Archives d'anatomie Microscopique et de Morphologie Expérimentale*, 1.4, 160–170.
- Baker, R., Llinás, R. (1971). Electrotonic coupling between neurones in the rat mesencephalic nucleus. *The Journal of Physiology*, 212(1), 45–63. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1971.sp009309>
- Barrio, L. C., Caputi, A., Crispino, L., Buño, W. (1991). Electric organ discharge frequency modulation evoked by water vibration in *Gymnotus carapo*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 100(3), 555–562. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(91\)90369-N](https://doi.org/10.1016/0300-9629(91)90369-N)
- Bass, A. H., Zakon, H. H. (2005). Sonic and electric fish: at the crossroads of neuroethology and behavioral neuroendocrinology. *Hormones and Behavior*, 48(4), 360–372.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.05.022>
- Bastian, J. (1981). Electrolocation - I. How the electroreceptors of *Apteronotus albifrons* code for moving objects and other electrical stimuli. *Journal of Comparative Physiology A*, 144(4), 465–479.
<https://doi.org/10.1007/BF01326832/METRICS>
- Bastian, J. (1986). Gain control in the electrosensory system: a role for the descending projections to the electrosensory lateral line lobe. *Journal of Comparative Physiology A*, 158(4), 505–515.
<https://doi.org/10.1007/BF00603796/METRICS>
- Batista, G., Zubizarreta, L., Perrone, R., Silva, A. (2012). Non-sex-biased dominance in a sexually monomorphic electric fish: fight structure and submissive electric signalling. *Ethology*, 118(4), 398–410.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2012.02022.x>
- Bennett, M. V. L. (1966). Physiology of electrotonic junctions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 137(2 Biological Me), 509–539. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1966.tb50178.x>
- Bennett, M.V.L. (1971). Electric Organs. In W. S. Hoar & D. Randall (Eds.), *Fish Physiology* (Vol. 5, Issue C, pp. 347–491). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60051-5](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60051-5)
- Bennett, M. V. L. (1977). Cellular biology of neurons. In J. M. Brookhart & V. B. Mountcastle (Eds.), *Handbook of Physiology* (Vol. 1, pp. 357–416). American Physiological Society
- Bennett, M. V. L., Pappas, G. D., Giménez, M., Nakajima, Y. (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>
- Bennett, M. V. L., Zukin, R. S. (2004). Electrical coupling and neuronal synchronization in Mammalian brain. *Neuron*, 41, 495–511.
- Black-Cleworth, P. (1970). The role of electrical discharges in the non-reproductive social behaviour of *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Pisces). *Animal Behaviour Monographs*, 3, 1-IN1.
[https://doi.org/10.1016/S0066-1856\(70\)80001-2](https://doi.org/10.1016/S0066-1856(70)80001-2)
- Borde, M., Curti, S., Comas, V., Rivero, C. (2004). Modulación central de un sistema sensorial por un comando motor. Una intención con dos resultados. *Revista De Neurología*, 38(3), 253–260.
- Briggman, K. L., Kristan, W. B. (2008). Multifunctional pattern-generating circuits. *Annual Review of Neuroscience*, 31(1), 271–294. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125552>
- Briggman, Kevin L, Kristan, W. B. (2006). Imaging dedicated and multifunctional neural circuits generating distinct behaviors. *The Journal of Neuroscience*, 26(42), 10925 LP – 10933.
<http://www.jneurosci.org/content/26/42/10925.abstract>

- Bullock, T. H. (1979). Identifiable and addressed neurons in vertebrates. In D. S. Faber & H. Korn (Eds.), *Neurobiology of the Mauthner cell* (pp. 1–12). Raven Press.
- Bullock, T. H., Hamstra, R. H., Scheich, H. (1972). The jamming avoidance response of high frequency electric fish. *J. Comp. Physiol.*, 77, 1–22.
- Calabrese, R. L. (1998). Cellular, synaptic, network, and modulatory mechanisms involved in rhythm generation. *Current Opinion in Neurobiology*, 8(6), 710–717. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(98\)80112-8](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(98)80112-8)
- Capurro, A., Reyes-Parada, M., Ardanaz, J. L., Silveira, R., Macadar, O. (1994). Serotonergic control of electric organ discharge in *Gymnotus carapo*. Role of 5-HT_{2A/2c} receptor subtypes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 109(3), 583–591. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(94\)90197-X](https://doi.org/10.1016/0300-9629(94)90197-X)
- Capurro, A., Reyes-Parada, M., Olazabal, D., Perrone, R., Silveira, R., Macadar, O. (1997). Aggressive behavior and jamming avoidance response in the weakly electric fish *Gymnotus carapo*: Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 118(3), 831–840. [https://doi.org/10.1016/S0300-9629\(97\)00132-1](https://doi.org/10.1016/S0300-9629(97)00132-1)
- Caputi, A. A. (1999). The electric organ discharge of pulse Gymnotiforms: the transformation of a simple impulse into a complex spatio-temporal electromotor pattern. *Journal of Experimental Biology*, 202, 1229–1241.
- Caputi, A. A., Aguilera, P. A., Castelló, M. E. (2003). Probability and amplitude of novelty responses as a function of the change in contrast of the reafferent image in *G. carapo*. *Journal of Experimental Biology*, 206(6), 999–1010. <https://doi.org/10.1242/jeb.00199>
- Caputi, A. A., Castelló, M. E., Aguilera, P. A., Pereira, C., Nogueira, J., Rodríguez-Cattaneo, A., Lezcano, C. (2008). Active electroreception in *Gymnotus omari*: imaging, object discrimination, and early processing of actively generated signals. *Journal of Physiology, Paris*, 102(4–6), 256–271. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2008.10.005>
- Caputi, A. A., Trujillo-Cenóz, O. (1994). The spinal cord of *Gymnotus carapo*: The electromotoneurons and their projection patterns. *Brain, Behavior and Evolution*, 44(3), 166–174. <https://doi.org/10.1159/000113588>
- Caputi, A. A., Carlson, B. A., Macadar, O. (2005). Electric organs and their control. In T. H. Bullock, C. D. Hopkins, A. N. Popper, R. R. Fay (Eds.), *Electroreception* (Vol. 21, pp. 410–451). Springer Science+Business Media. https://doi.org/doi:10.1007/0-387-28275-0_14
- Carlson, B. A. (2002). Electric signaling behavior and the mechanisms of electric organ discharge production in mormyrid fish. *Journal of Physiology, Paris*, 96(5–6), 405–419. [https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(03\)00019-6](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(03)00019-6)
- Carlson, B. A. (2003). Single-unit activity patterns in nuclei that control the electromotor command nucleus during spontaneous electric signal production in the mormyrid *Brienomyrus brachyistius*. *Journal of Neuroscience*, 23(31), 10128–10136. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-31-10128.2003>
- Carlson, B. A., Hopkins, C. D. (2004). Central control of electric signaling behavior in the mormyrid *Brienomyrus brachyistius*: Segregation of behavior-specific inputs and the role of modifiable recurrent inhibition. *Journal of Experimental Biology*, 207(7), 1073–1084. <https://doi.org/10.1242/jeb.00851>
- Carr, C. E., Maler, L., Taylor, B. (1986). A Time-Comparison Circuit in the Electric Fish Midbrain. II Functional Morphology. *The Journal of Neuroscience*, 6(5), 1372–1383.
- Castelló, M. E., Caputi, A. A., Trujillo-Cenóz, O. (1998). Structural and functional aspects of the fast electrosensory pathway in the electrosensory lateral line lobe of the pulse fish *Gymnotus carapo*. *The Journal of Comparative Neurology*, 401(4), 549–563. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9826277>
- Cazalets, J. R. (2000). Organization of the spinal locomotor network in neonatal rat. In *Neurobiology of Spinal Cord Injury* (pp. 89–111). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-200-5_4
- Chagnaud, B. P., Perelmuter, J. T., Forlano, P. M., Bass, A. H. (2021). Gap junction-mediated glycinergic inhibition ensures precise temporal patterning in vocal behavior. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.59390>
- Christie, J. M., Bark, C., Hormuzdi, S. G., Helbig, I., Monyer, H., Westbrook, G. L. (2005). Connexin36 mediates spike synchrony in olfactory bulb glomeruli. *Neuron*, 46(5), 761–772. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2005.04.030>
- Clark, B. A., & Cull-Candy, S. G. (2002). Activity-dependent recruitment of extrasynaptic NMDA receptor activation at an AMPA receptor-only synapse. *Journal of Neuroscience*, 22(11), 4428–4436. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-11-04428.2002>

- Comas, V., Borde, M. (2010). Neural substrate of an increase in sensory sampling triggered by a motor command in a gymnotid fish. *Journal of Neurophysiology*, 104(4), 2147–2157. <https://doi.org/10.1152/jn.00076.2010>
- Comas, V., Langevin, K., Silva, A., & Borde, M. (2018). Non-glutamatergic mechanisms of chirps in *Gymnotus omarorum*. 9th Electric Fish Satellite Meeting, International Congress of Neuroethology, 22–22
- Comas, V., Langevin, K., Silva, A., Borde, M. (2019). Distinctive mechanisms underlie the emission of social electric signals of submission in *Gymnotus omarorum*. *The Journal of Experimental Biology*, 222(11), jeb.195354. <https://doi.org/10.1242/jeb.195354>
- Comas, V., Pino, E., Borde, M. (2012). Estrategia neural para la modulación de la actividad de un núcleo marcapaso del sistema nervioso central. XIV Jornadas de La Sociedad Uruguaya de Biociencias.
- Comas, V., Borde, M. (2021). Glutamatergic control of a pattern-generating central nucleus in a gymnotiform fish. *Journal of Neurophysiology*, 125(6), 2339–2355. <https://doi.org/10.1152/jn.00584.2020>
- Connors, B. W. (2012). Tales of a dirty drug: carbenoxolone, gap junctions, and seizures. *Epilepsy Currents*, 12(2), 66–68. <https://doi.org/10.5698/1535-7511-12.2.66>
- Connors, B. W. (2017). Synchrony and so much more: Diverse roles for electrical synapses in neural circuits. *Developmental Neurobiology*, 77(5), 610–624. <https://doi.org/10.1002/dneu.22493>
- Connors, B. W., Benardo, L. S., Prince, D. A. (1983). Coupling between neurons of the developing rat neocortex. *Journal of Neuroscience*, 3(4), 773–782. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.03-04-00773.1983>
- Connors, B. W., Long, M. A. (2004). Electrical synapses in the mammalian brain. *Annual Review of Neuroscience*, 27, 393–418. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131128>
- Copenhagen, D. R., Owen, W. G. (1980). Current-voltage relations in the rod photoreceptor network of the turtle retina. *The Journal of Physiology*, 308(1), 159–184. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1980.sp013466>
- Cottrell, J. R., Dubé, G. R., Egles, C., Liu, G. (2000). Distribution, density, and clustering of functional glutamate receptors before and after synaptogenesis in hippocampal neurons. *Journal of Neurophysiology*, 84(3), 1573–1587. <https://doi.org/10.1152/jn.2000.84.3.1573>
- Crampton, W. G. R. (2019). Electroreception, electrogenesis and electric signal evolution. *Journal of Fish Biology*, 95(1), 92–134. <https://doi.org/10.1111/jfb.13922>
- Curti, S., Falconi, A., Morales, F. R., Borde, M. (1999). Mauthner cell-initiated electromotor behavior is mediated via NMDA and metabotropic glutamatergic receptors on medullary pacemaker neurons in a gymnotid fish. *Journal of Neuroscience*, 19(20), 9133–9140. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-20-09133.1999>
- Curti, S. (2007). Papel de la corriente de sodio persistente en la modulación del acople eléctrico y la descarga repetitiva neuronal. Facultad de Medicina, UdelaR, PEDECIBA.
- Curti, S., Comas, V., Rivero, C., Borde, M. (2006). Analysis of behavior-related excitatory inputs to a central pacemaker nucleus in a weakly electric fish. *Neuroscience*, 140(2), 491–504. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.02.037>
- Curti, S., Hoge, G., Nagy, J. I., Pereda, A. E. (2012). Synergy between electrical coupling and membrane properties promotes strong synchronization of neurons of the mesencephalic trigeminal nucleus. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(13), 4341–4359. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6216-11.2012>
- Curti, Sebastian, Davoine, F., Dapino, A. (2022). Function and plasticity of electrical synapses in the mammalian brain: role of non-junctional mechanisms. *Biology*, 11(1), 1–24. <https://doi.org/10.3390/biology11010081>
- Davoine, F., Curti, S. (2019). Response to coincident inputs in electrically coupled primary afferents is heterogeneous and is enhanced by H-current (IH) modulation. *Journal of Neurophysiology*, 122(1), 151–175. <https://doi.org/10.1152/jn.00029.2019>
- Delcomyn, F. (1980). Neural basis of rhythmic behavior in animals. *Science*, 210(4469), 492–498. <https://doi.org/10.1126/science.7423199>
- Devor, A., Yarom, Y. (2002). Electrotonic coupling in the inferior olivary nucleus revealed by simultaneous double patch recordings. *Journal of Neurophysiology*, 87(6), 3048–3058. <https://doi.org/10.1152/jn.00399.2001>
- Dickinson, P. S. (2006). Neuromodulation of central pattern generators in invertebrates and vertebrates. *Current Opinion in Neurobiology*, 16(6), 604–614. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2006.10.007>
- DiDomenico, R., Eaton, R. C. (1988). Seven principles for command and the neural causation of behavior. *Brain, Behavior and Evolution*, 31(3), 125–140. <https://doi.org/10.1159/000116580>

- Dougherty, K. J., Ha, N. T. (2019). The rhythm section: An update on spinal interneurons setting the beat for mammalian locomotion. *Current Opinion in Physiology*, 8, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2019.01.004>
- Dunlap, K. D., Silva, A. C., Smith, G. T., Zakon, H. H. (2017). Weakly Electric Fish: Behavior, Neurobiology, and Neuroendocrinology. In D. W. Pfaff & M. Joëls (Eds.), *Hormones, Brain and Behavior: Third Edition* (Vol. 2, pp. 69–98). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803592-4.00019-5>
- Dye, J., Heiligenberg, W. (1987). Intracellular recording in the medullary pacemaker nucleus of the weakly electric fish, *Apteronotus*, during modulatory behaviors. *Journal of Comparative Physiology A*, 161, 187–200. <http://link.springer.com.proxy.timbo.org.uy:443/article/10.1007/BF00615240>
- Dye, J., Heiligenberg, W., Keller, C. H., Kawasaki, M. (1989). Different classes of glutamate receptors mediate distinct behaviors in a single brainstem nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(22), 8993–8997. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.22.8993>
- Dye, John. (1991). Ionic and synaptic mechanisms underlying a brainstem oscillator: An in vitro study of the pacemaker nucleus of *Apteronotus*. *Journal of Comparative Physiology A*, 168(5), 521–532. <https://doi.org/10.1007/BF00215074>
- Eaton, R C, Lee, R. K. K., Foreman, M. B. (2001). The Mauthner cell and other identified neurons of the brainstem escape network of fish. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 63, Issue 4, pp. 467–485). [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(00\)00047-2](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00047-2)
- Eaton, Robert C, DiDomenico, R. (1985). Command and the neural causation of behavior: a theoretical analysis of the necessity and sufficiency paradigm. *Brain Behav. Evol.*, 27, 149–164.
- Eccles, J. C., Fatt, P., Koketsu, K. (1954). Cholinergic and inhibitory synapses in a pathway from motor-axon collaterals to motoneurons. *The Journal of Physiology*, 126(3), 524–562. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1954.sp005226>
- Elekes, K., Szabo, T. (1981a). Synaptology of the command (pacemaker) nucleus in the brain of the weakly electric fish, *Sternarchus (Apteronotus) albifrons*. *Neuroscience*, 6(3), 443–460. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(81\)90137-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(81)90137-8)
- Elekes, K., Szabo, T. (1981b). Comparative synaptology of the pacemaker nucleus in the brain of weakly electric fish (Gymnotidae). In *Sensory Physiology of Aquatic Lower Vertebrates* (pp. 107–127). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-027352-5.50013-6>
- Elekes, K., Szabo, T. (1982). Synaptic organization in the pacemaker nucleus of a medium-frequency weakly electric fish, *Eigenmannia* sp. *Brain Research*, 237(2), 267–281. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)90441-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90441-3)
- Elekes, K., Szabo, T. (1985). The mormyrid brainstem-III. Ultrastructure and synaptic organization of the medullary “pacemaker” nucleus. *Neuroscience*, 15(2), 431–443. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(85\)90224-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(85)90224-6)
- Ellis, D. B., Szabo, T. (1980). Identification of different cell types in the command (pacemaker) nucleus of several gymnotiform species by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Neuroscience*, 5(11), 1917–1929. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(80\)90039-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(80)90039-1)
- Elsen, F. P., Shields, E. J., Roe, M. T., Vandam, R. J., Kelty, J. D. (2008). Carbenoxolone induced depression of rhythmogenesis in the pre-Bötzing Complex. *BMC Neuroscience*, 9, 46. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-9-46>
- Falconi, A., Borde, M., Hernández-Cruz, A., Morales, F. R. (1995). Mauthner cell-initiated abrupt increase of the electric organ discharge in the weakly electric fish *Gymnotus carapo*. *Journal of Comparative Physiology A*, 176(5), 679–689. <https://doi.org/10.1007/BF01021588>
- Falconi, A., Lorenzo, D., Curti, S., Morales, F. R., Borde, M. (1997). Mauthner cell-evoked synaptic actions on pacemaker medullary neurons of a weakly electric fish. *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 181(2), 143–151. <https://doi.org/10.1007/s003590050101>
- Falgairolle, M., de Seze, M., Juvin, L., Morin, D., Cazalets, J. R. (2006). Coordinated network functioning in the spinal cord: An evolutionary perspective. *Journal of Physiology Paris*, 100(5–6), 304–316. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2007.05.003>
- Faumont, S., Combes, D., Meyrand, P., Simmers, J. (2005). Reconfiguration of multiple motor networks by short- and long-term actions of an identified modulatory neuron. *European Journal of Neuroscience*, 22(10), 2489–2502. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04442.x>
- Fernandes, C. C., Nogueira, A., Alves-Gomes, J. A. (2014). *Procerusternarchus pixuna*, a new genus and species of electric knifefish (Gymnotiformes: Hypopomidae, Microsternarchini) from the Negro River, South America. 163(1), 95–118. <https://doi.org/10.1635/053.163.0107>

- Ferrari, M. B., McAnelly, M. L., Zakon, H. H. (1995). Individual variation in and androgen-modulation of the sodium current in electric organ. *Journal of Neuroscience*, 15(5), 4023–4032. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-05-04023.1995>
- Field, C. E., Petersen, T. A., Alves-Gomes, J. A., Braun, C. B. (2019). A JAR of chirps: the gymnotiform chirp can function as both a communication signal and a jamming avoidance response. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 13(October), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fnint.2019.00055>
- Friesen, W. O. (1994). Reciprocal inhibition: A mechanism underlying oscillatory animal movements. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 18(4), 547–553. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(94\)90010-8](https://doi.org/10.1016/0149-7634(94)90010-8)
- Friesen, W. O., Kristan, W. B. (2007). Leech locomotion: swimming, crawling, and decisions. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 17, Issue 6, pp. 704–711). Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.01.006>
- Galarreta, M., Hestrin, S. (2001). Spike transmission and synchrony detection in networks of GABAergic interneurons. *Science*, 292(5525), 2295–2299. <https://doi.org/10.1126/science.1061395>
- Getting, P. A. (1989). Emerging principles governing the operation of neural networks. *Annual Review of Neuroscience*, 12, 185–204. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.12.1.185>
- Getting, P. A., Willows, A. O. (1974). Modification of neuron properties by electrotonic synapses. II. Burst formation by electrotonic synapses. *J Neurophysiol*, 37(5), 858–868. <https://doi.org/10.1152/jn.1974.37.5.858>
- Ghamari-Langroudi, M., Bourque, C. W. (2002). Flufenamic acid blocks depolarizing afterpotentials and phasic firing in rat supraoptic neurones. *Journal of Physiology*, 545(2), 537–542. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.033589>
- Giora, J., Malabarba, L. R., Crampton, W. (2008). *Brachyhypopomus draco*, a new sexually dimorphic species of Neotropical electric fish from southern South America (Gymnotiformes: Hypopomidae). *Neotropical Ichthyology*, 6(2), 159–168. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252008000200002>
- Goodenough, D. A., Paul, D. L. (2009). Gap junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(1), 1–19. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002576>
- Grant, K. (1993). Motor control of signal generation compared in mormyrid and gymnotiform fish. *Journal of Comparative Physiology - A*, 173(6), 729–731.
- Grillner, S., El Manira, A. (2015). The intrinsic operation of the networks that make us locomote. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 31, pp. 244–249). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.01.003>
- Grillner, S., Wallén, P. (1985). Central pattern generator for locomotion, with special reference to vertebrates. *Annu Rev Neurosci*, 8, 233–261.
- Gu, C., Ramkisoensing, A., Liu, Z., Meijer, J. H., Rohling, J. H. T. (2014). The proportion of light-responsive neurons determines the limit cycle properties of the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Biological Rhythms*, 29(1), 16–27. <https://doi.org/10.1177/0748730413516752>
- Hagedorn, M. (1986). The ecology, courtship, and mating of gymnotiform electric fish. In T. Bullock & W. Heiligenberg (Eds.), *Electroreception* (pp. 497–525). Wiley.
- Halliwel, J. V., Adams, P. R. (1982). Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Research*, 250(1), 71–92. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)90954-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90954-4)
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., Ryan, P. D. (2001). Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 1–9.
- Harks, E. G. A., De Roos, A. D. G., Peters, P. H. J., De Haan, L. H., Brouwer, A., Ypey, D. L., Van Zoelen, E. J. J., Theuvenet, A. P. R. (2001). Fenamates: A novel class of reversible gap junction blockers. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298(3), 1033–1041. <https://jpet.aspetjournals.org/content/298/3/1033.short>
- Harris-Warrick, R. M., Marder, E. (1991). Modulation of Neural Networks for Behavior. *Annual Review of Neuroscience*, 14(1), 39–57. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.14.030191.000351>
- Heiligenberg, W., Bastian, J. (1984). The electric sense of weakly electric fish. *Annual Review of Physiology*, VOL. 46, 561–583. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.46.030184.003021>
- Heiligenberg, W. (1991). The neural basis of behavior: a neuroethological view. *Annual Review of Neuroscience*, 14(1), 247–267. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.14.1.247>
- Heiligenberg, Walter, Baker, C., Bastian, J. (1978). The jamming avoidance response in gymnotoid pulse-species: A mechanism to minimize the probability of pulse-train coincidence. *Journal of Comparative Physiology A*, 124(3), 211–224. <https://doi.org/10.1007/BF00657053>
- Hooper, S. L. (2004). Behavioral Plasticity: Modulation Occurs across Time. *Current Biology*, 14(5), R190–R191. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2004.02.018>

- Horikawa, K., Armstrong, W. E. (1988). A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *Journal of Neuroscience Methods*, 25(1), 1–11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3146670>
- Huang, C., Hung, T., Liao, Y., Hsu, M., Wu, S. (2013). Underlying mechanism of regulatory actions of diclofenac, a nonsteroidal anti-inflammatory agent, on neuronal potassium channels and firing: an experimental. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 269–280.
- Hutcheon, B., Yarom, Y. (2000). Resonance, oscillation and the intrinsic frequency preferences of neurons. *Trends in Neurosciences*, 23(5), 216–222. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01547-2](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01547-2)
- Isaac, J. T. R., Nicoll, R. A., Malenka, R. C. (1995). Evidence for silent synapses: Implications for the expression of LTP. *Neuron*, 15(2), 427–434. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90046-2](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90046-2)
- Juranek, J., Metzner, W. (1997). Cellular characterization of synaptic modulations of a neuronal oscillator in electric fish. *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 181(4), 393–414. <https://doi.org/10.1007/s003590050124>
- Juranek, J., Metzner, W. (1998). Segregation of behavior-specific synaptic inputs to a vertebrate neuronal oscillator. *Journal of Neuroscience*, 18(21), 9010–9019. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-21-09010.1998>
- Juszczak, G. R., Swiergiel, A. H. (2009). Properties of gap junction blockers and their behavioural, cognitive and electrophysiological effects: Animal and human studies. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(2), 181–198. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2008.12.014>
- Kalmijn, A. J. (1974). The detection of electric fields from inanimate and animate sources other than electric organs. In A. Fessard (Ed.), *Electroreceptors and other specialized receptors in lower vertebrates* (pp. 147–200). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-65926-3_5
- Kalmijn, A. J. (1988). Detection of weak electric fields. In J. Atema, R. Fay, A. Popper, & W. Tavolga (Eds.), *Sensory biology of aquatic animals* (pp. 151–186). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3714-3_6
- Kawasaki, M., Heiligenberg, W. (1988). Individual pacemaker neurons can modulate the pacemaker cycle of the gymnotiform electric fish, *Eigenmannia*. *Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 162(1), 13–21. <https://doi.org/10.1007/BF01342699>
- Kawasaki, M., Heiligenberg, W. (1989). Distinct mechanisms of modulation in a neuronal oscillator generate different social signals in the electric fish *Hypopomus*. *Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 165(6), 731–741. <https://doi.org/10.1007/BF00610872>
- Kawasaki, M., Heiligenberg, W. (1990). Different classes of glutamate receptors and GABA mediate distinct modulations of a neuronal oscillator, the medullary pacemaker of a gymnotiform electric fish. *Journal of Neuroscience*, 10(December), 3896–3904. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-12-03896.1990>
- Kawasaki, M., Maler, L., Rose, G. J., Heiligenberg, W. (1988). Anatomical and functional organization of the pacemaker nucleus in gymnotiform electric fish: The accommodation of two behaviors in one nucleus. *Journal of Comparative Neurology*, 276(1), 113–131. <https://doi.org/10.1002/cne.902760108>
- Keller, C. H., Kawasaki, M., Heiligenberg, W. (1991). The control of pacemaker modulations for social communication in the weakly electric fish *Sternopygus*. *Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 169(4), 441–450. <https://doi.org/10.1007/BF00197656>
- Kennedy, G., Heiligenberg, W. (1994). Ultrastructural evidence of GABA-ergic inhibition and glutamatergic excitation in the pacemaker nucleus of the gymnotiform electric fish, *Hypopomus*. *Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 174(3), 267–280. <https://doi.org/10.1007/BF00240210>
- Kirschbaum, F., Schwassmann, H. (2008). Ontogeny and evolution of electric organs in gymnotiform fish. *Journal of Physiology-Paris*, 102(4–6), 347–356. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2008.10.008>
- Kleppe, I. C., & Robinson, H. P. C. (1999). Determining the Activation Time Course of Synaptic AMPA Receptors from Openings of Colocalized NMDA Receptors. *Biophysical Journal*, 77(3), 1418–1427. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)76990-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)76990-0)
- Lamb, C., Lamb, D. G., Calabrese, R. L. (2011). Neural circuits controlling behavior and autonomic functions in medicinal leeches. *Neural Systems & Circuits 2011 1:1*, 1(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/2042-1001-1-13>
- Lee, Y. T., Wang, Q. (1999). Inhibition of hKv2.1, a major human neuronal voltage-gated K⁺ channel, by meclofenamic acid. *European Journal of Pharmacology*, 378(3), 349–356. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00485-9](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00485-9)
- Lewis, J. E. (2014). Active electroreception: Signals, sensing, and behavior. In D. H. Evans, J. B. Claiborne, & S. Currie (Eds.), *The Physiology of Fishes*, Fourth Edition (4th ed., pp. 375–390). CRC Press, Taylor and Francis Group.

- Liao, D, Hessler, N. A., & Malinow, R. (1995). Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature*, 375(6530), 400–404. <https://doi.org/10.1038/375400a0>
- Liao, Dezhi, Scannevin, R. H., Hugarir, R. (2001). Activation of Silent Synapses by Rapid Activity-Dependent Synaptic Recruitment of AMPA Receptors. *Journal of Neuroscience*, 21(16), 6008–6017. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-16-06008.2001>
- Libouban, S., Szabo, T., Ellis, D. (1981). Comparative study of the medullary command (pacemaker) nucleus in species of the four weakly electric fish families. In T. Szabó & G. Czéh (Eds.), *Sensory physiology of aquatic lower vertebrates* (Vol. 31, pp. 95–106). Pergamon
- Lieske, S. P., Ramirez, J.-M. (2006). Pattern-Specific Synaptic Mechanisms in a Multifunctional Network. I. Effects of Alterations in Synapse Strength. *Journal of Neurophysiology*, 95(3), 1323–1333. <https://doi.org/10.1152/jn.00505.2004>
- Lin, J. W., Faber, D. S. (1988). Synaptic transmission mediated by single club endings on the goldfish Mauthner cell. I. Characteristics of electrotonic and chemical postsynaptic potentials. *Journal of Neuroscience*, 8(4), 1302–1312. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-04-01302.1988>
- Lissmann, H. (1958). On the function and evolution of electric organs in fish. *Journal of Experimental Biology*, 35(1), 156–191.
- Lissmann, H. W. (1951). Continuous electrical signals from the tail of a fish, *gymnarchus niloticus* Cuv. *Nature*, 167(4240), 201–202. <https://doi.org/10.1038/167201a0>
- Lissmann, H. W., Machin, K. E. (1958). The mechanism of object location in *Gymnarchus niloticus* and similar fish. *Journal of Experimental Biology*, 35(2), 451–486. <https://doi.org/10.1242/jeb.35.2.451>
- Lorenzo, D., Sierra, F., Silva, A., Macadar, O. (1993). Spatial distribution of the medullary command signal within the electric organ of *Gymnotus carapo*. *Journal of Comparative Physiology A*, 173, 221–226.
- Lorenzo, D., Silva, A., Macadar, O. (2006). Electrocommunication in *Gymnotiformes*: jamming avoidance and social signals during courtship. In F. Ladich, S. P. Collin, P. Moller, & B. G. Kapoor (Eds.), *Communication in fishes 2* (Vol. 2, pp. 753–779). Science Publishers.
- Lucas, K. M., Warrington, J., Lewis, T. J., & Lewis, J. E. (2019). Neuronal Dynamics Underlying Communication Signals in a Weakly Electric Fish: Implications for Connectivity in a Pacemaker Network. *Neuroscience*, 401(January), 21–34. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.01.004>
- Marder, E. (1988). Modulating a neuronal network. In *Nature* (Vol. 335, Issue 6188, pp. 296–297). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/335296a0>
- Marder, E., Goeritz, M. L., Otopalik, A. G. (2015). Robust circuit rhythms in small circuits arise from variable circuit components and mechanisms. *Current Opinion in Neurobiology*, 31, 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.10.012>
- Marder, E., O’Leary, T., Shruti, S. (2014). Neuromodulation of circuits with variable parameters: single neurons and small circuits reveal principles of state-dependent and robust neuromodulation. *Annual Review of Neuroscience*, 37(1), 329–346. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071013-013958>
- Markham, M. R. (2013). Electrocyte physiology: 50 years later. In *Journal of Experimental Biology* (Vol. 216, Issue 13, pp. 2451–2458). <https://doi.org/10.1242/jeb.082628>
- McCormick, D. A., Pape, H. C. (1990). Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *The Journal of Physiology*, 431(1), 291–318. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.1990.SP018331>
- McCrea, D. A., Rybak, I. A. (2008). Organization of mammalian locomotor rhythm and pattern generation. *Brain Research Reviews*, 57(1), 134–146. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.08.006>
- Metzner, W. (1993). The jamming avoidance response in *Eigenmannia* is controlled by two separate motor pathways. *The Journal of Neuroscience*, 13(5), 1862–1878. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-05-01862.1993>
- Miceli, F., Soldovieri, M., Martire, M., Tagliatalata, M. (2008). Molecular pharmacology and therapeutic potential of neuronal Kv7-modulating drugs. *Current Opinion in Pharmacology*, 8, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2007.10.003>
- Migliaro, A., Silva, A. (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), 232–241. <https://doi.org/10.1159/000445494>
- Miller, A. C., Pereda, A. E. (2017). The electrical synapse: Molecular complexities at the gap and beyond. *Developmental Neurobiology*, 77(5), 562–574. <https://doi.org/10.1002/dneu.22484>
- Moortgat, K T, Bullock, T. H., Sejnowski, T. J. (2000). Precision of the pacemaker nucleus in a weakly electric fish: network versus cellular influences. *Journal of Neurophysiology*, 83(2), 971–983. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10669509>

- Moortgat, K T, Keller, C. H., Bullock, T. H., & Sejnowski, T. J. (1998). Submicrosecond pacemaker precision is behaviorally modulated: The gymnotiform electromotor pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 95(April), 4684–4689.
- Nagy, J. I., Pereda, A. E., Rash, J. E. (2018). Electrical synapses in mammalian CNS: Past eras, present focus and future directions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1860(1), 102–123. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2017.05.019>
- Nakayama, K., Kiyosue, K., Taguchi, T. (2005). Diminished neuronal activity increases neuron-neuron connectivity underlying silent synapse formation and the rapid conversion of silent to functional synapses. *Journal of Neuroscience*, 25(16), 4040–4051. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4115-04.2005>
- Nogueira, J., Caputi, A. (2014). Pharmacological study of the one spike spherical neuron phenotype in *Gymnotus omarorum*. *Neuroscience*, 258, 347–354. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2013.11.021>
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, 307(5950), 462–465. <https://doi.org/10.1038/307462a0>
- O'Brien, J. (2014). The ever-changing electrical synapse. *Current Opinion in Neurobiology*, 29, 64–72. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2014.05.011>
- Palacios-Prado, N., Huetteroth, W., Pereda, A. E. (2014). Hemichannel composition and electrical synaptic transmission: Molecular diversity and its implications for electrical rectification. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(OCT), 324. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2014.00324/BIBTEX>
- Paoletti, P. (2011). Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *European Journal of Neuroscience*, 33(8), 1351–1365. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07628.x>
- Pereda, A. E., Curti, S., Hoge, G., Cachope, R., Flores, C. E., Rash, J. E. (2013). Gap junction-mediated electrical transmission: regulatory mechanisms and plasticity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1828(1), 134–146. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.05.026>
- Pereda, A. E., Faber, D. S. (2011). Physiology of the Mauthner Cell : Discovery and Properties. In A. P. Farrell (Ed.), *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment (Vol. 1)*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-1237-4553-8.00007-1>
- Pereira, A. C., Aguilera, P., Caputi, A.A. (2012). The active electrosensory range of *Gymnotus omarorum*. *Journal of Experimental Biology*, 215(18), 3266–3280. <https://doi.org/10.1242/jeb.070813>
- Peretz, A., Degani, N., Nachman, R., Uziyel, Y., Gibor, G., Shabat, D., Attali, B. (2005). Meclofenamic acid and diclofenac, novel templates of KCNQ2/Q3 potassium channel openers, depress cortical neuron activity and exhibit anticonvulsant properties. *Molecular Pharmacology*, 67(4), 1053–1066. <https://doi.org/10.1124/mol.104.007112>
- Perrone, R., Batista, G., Lorenzo, D., Macadar, O., Silva, A. (2010). Vasotocin actions on electric behavior: interspecific, seasonal, and social context-dependent differences. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 4(August), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00052>
- Perrone, R., Macadar, O., Silva, A. (2009). Social electric signals in freely moving dyads of *Brachyhyopomus pinnicaudatus*. *Journal of Comparative Physiology A*, 195(5), 501–514. <https://doi.org/10.1007/s00359-009-0427-6>
- Perrone, R., Migliaro, A., Comas, V., Quintana, L., Borde, M., Silva, A. (2014). Local vasotocin modulation of the pacemaker nucleus resembles distinct electric behaviors in two species of weakly electric fish. *Journal of Physiology, Paris*, 108(2–3), 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.07.007>
- Perrone, R., Silva, A. C. (2018). Status-dependent vasotocin modulation of dominance and subordination in the weakly electric fish *Gymnotus omarorum*. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12(January). <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00001>
- Pfeuty, B., Mato, G., Golomb, D., Hansel, D. (2003). Electrical synapses and synchrony: the role of intrinsic currents. *Journal of Neuroscience*, 23(15), 6280–6294. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-15-06280.2003>
- Pouso, P., Quintana, L., Bolatto, C., Silva, A. C. (2010). Brain androgen receptor expression correlates with seasonal changes in the behavior of a weakly electric fish, *Brachyhyopomus gauderio*. *Hormones and Behavior*, 58(5), 729–736. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.07.005>
- Puil, E., Gimbarzevsky, B., Miura, R. M. (1986). Quantification of membrane properties of trigeminal root ganglion neurons in guinea pigs. *Journal of Neurophysiology*, 55(5), 995–1016. <https://doi.org/10.1152/jn.1986.55.5.995>

- Qian, A., Buller, A. L., Johnson, J. W. (2005). NR2 subunit-dependence of NMDA receptor channel block by external Mg²⁺. *The Journal of Physiology*, 562(Pt 2), 319–331. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.076737>
- Quintana, L., Harvey-Girard, E., Lescano, C., Macadar, O., Lorenzo, D. (2014). Sex-specific role of a glutamate receptor subtype in a pacemaker nucleus controlling electric behavior. *Journal of Physiology, Paris*, 108, 155–166. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.04.004>
- Quintana, L., Pouso, P., Fabbiani, G., Macadar, O. (2011a). A central pacemaker that underlies the production of seasonal and sexually dimorphic social signals: anatomical and electrophysiological aspects. *Journal of Comparative Physiology. A, Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 197(1), 75–88. <https://doi.org/10.1007/s00359-010-0588-3>
- Quintana, L., Sierra, F., Silva, A., Macadar, O. (2011b). A central pacemaker that underlies the production of seasonal and sexually dimorphic social signals: Functional aspects revealed by glutamate stimulation. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 197(2), 211–225. <https://doi.org/10.1007/s00359-010-0603-8>
- Rash, J. E., Curti, S., Vanderpool, K. G. G., Kamasawa, N., Nannapaneni, S., Palacios-Prado, N., Flores, C. E. E., Yasumura, T., O'Brien, J., Lynn, B. D. D., Bukauskas, F. F., Nagy, J. I. I., Pereda, A. E. E. (2013). Molecular and functional asymmetry at a vertebrate electrical synapse. *Neuron*, 79(5), 957–969. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.06.037>
- Rash, J., Kamasawa, N., Vanderpool, K., Yasumura, T., O'Brien, J., Nannapaneni, S., Pereda, A. E., Nagy, J. I. (2015). Heterotypic gap junctions at glutamatergic mixed synapses are abundant in goldfish brain. *Neuroscience*, 285, 166–193. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.10.057>
- Reiner, A., Levitz, J. (2018). Glutamatergic signaling in the central nervous system: ionotropic and metabotropic receptors in concert. *Neuron*, 98(6), 1080–1098. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2018.05.018>
- Rela, L., Szczupak, L. (2004). Gap Junctions: Their importance for the dynamics of neural circuits. *Molecular Neurobiology*, 30(3), 341–358. <https://doi.org/10.1385/MN:30:3:341>
- Renshaw, B. (1941). Influence of discharge of motoneurons upon excitation of neighboring motoneurons. *Journal of Neurophysiology*, 4(2), 167–183. <https://doi.org/10.1152/jn.1941.4.2.167>
- Russo, G., Nieuwenhuis, T. R., Maggi, S., Taverna, S. (2013). Dynamics of action potential firing in electrically connected striatal fast-spiking interneurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 6(NOV), 209. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2013.00209/ABSTRACT>
- Sachdev, R. N. S., Krause, M. R., Mazer, J. A. (2012). Surround suppression and sparse coding in visual and barrel cortices. *Frontiers in Neural Circuits*, 6, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fncir.2012.00043>
- Sanguinetti-Scheck, J. I., Pedraja, E. F., Cilleruelo, E., Migliaro, A., Aguilera, P., Caputi, A. A., Budelli, R. (2011). Fish geometry and electric organ discharge determine functional organization of the electrosensory epithelium. *PLoS ONE*, 6(11), e27470. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027470>
- Selverston, A. I. (2010). Invertebrate central pattern generator circuits. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1551), 2329–2345. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0270>
- Silva, A., Perrone, R., Macadar, O. (2007). Environmental, seasonal, and social modulations of basal activity in a weakly electric fish. *Physiology & Behavior*, 90(2–3), 525–536. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.11.003>
- Silva, A., Quintana, L., Perrone, R., Sierra, F. (2008). Sexual and seasonal plasticity in the emission of social electric signals. Behavioral approach and neural bases. *Journal of Physiology, Paris*, 102(4–6), 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2008.10.016>
- Sîrbulescu, R. F., Ilieș, I., Zupanc, G. K. H. (2014). Quantitative analysis reveals dominance of gliogenesis over neurogenesis in an adult brainstem oscillator. *Developmental Neurobiology*, 74(9), 934–952. <https://doi.org/10.1002/DNEU.22176>
- Smith, G. T. (2005). Pharmacological characterization of ionic currents that regulate high-frequency spontaneous activity of electromotor neurons in the weakly electric fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *Journal of Neurobiology*, 66(1), 1–18. <https://doi.org/10.1002/NEU.20202>
- Smith, G. T., Lu, Y., Zakon, H. H. (2000). Parvocells: A novel interneuron type in the pacemaker nucleus of a weakly electric fish. *The Journal of Comparative Neurology*, 439(March), 427–439.
- Smith, G. T., Zakon, H. H. (2000). Pharmacological characterization of ionic currents that regulate the pacemaker rhythm in a weakly electric fish. *Journal of Neurobiology*, 42(2), 270–286. [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)
- Spiro, J., Brose, N., Heinemann, S., Heiligenberg, W. (1994). Immunolocalization of NMDA receptors in the central nervous system of weakly electric fish: functional implications for the modulation of a neuronal

- oscillator. *The Journal of Neuroscience*, 14(10), 6289–6299. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-10-06289.1994>
- Spiro, J. E. (1997). Differential activation of glutamate receptor subtypes on a single class of cell enables a neural oscillator to produce distinct behaviors. *Journal of Neurophysiology*, 78(2), 835–847. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.78.2.835>
- Spiro, J., Heiligenberg, W. (1992). Possible ionic mechanism underlying the control of pacemaking in the weakly electric fish *Hypopomus*. *Soc Neurosci Abstr* 18, 348.
- Steuer, I., & Guertin, P. A. (2019). Central pattern generators in the brainstem and spinal cord: an overview of basic principles, similarities and differences. *Reviews in the Neurosciences*, 30(2), 107–164. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0102>
- Stoddard, P. K. (2002). Electric signals: predation, sex, and environmental constraints. *Advances in the Study of Behavior*, 31, 201–242. [https://doi.org/10.1016/S0065-3454\(02\)80009-2](https://doi.org/10.1016/S0065-3454(02)80009-2)
- Szoboszlay, M., Lőrincz, A., Lanore, F., Vervaeke, K., Silver, R. A., Nusser, Z. (2016). Functional properties of dendritic gap junctions in cerebellar golgi cells. *Neuron*, 90(5), 1043–1056. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.029>
- Takumi, Y., Ramírez-León, V., Laake, P., Rinvik, E., Ottersen, O. P. (1999). Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. *Nature Neuroscience*, 2(7), 618–624. <https://doi.org/10.1038/10172>
- Tokunaga, A., Akert, K., Sandri, C., Bennett, M. V. L. (1980). Cell types and synaptic organization of the medullary electromotor nucleus in a constant frequency weakly electric fish, *Sternarchus albifrons*. *The Journal of Comparative Neurology*, 192(3), 407–426. <https://doi.org/10.1002/cne.901920304>
- Traub, Roger D., Whittington, M. A., Maier, N., Schmitz, D., Nagy, J. I. (2020). Could electrical coupling contribute to the formation of cell assemblies? *Reviews in the Neurosciences*, 31(2), 121–141. <https://doi.org/https://doi.org/10.1515/revneuro-2019-0059>
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., Hansen, K. B., Yuan, H., Myers, S. J., Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological Reviews*, 62(3), 405–496. <https://doi.org/10.1124/pr.109.002451>
- Urban, N. N. (2002). Lateral inhibition in the olfactory bulb and in olfaction. *Physiology and Behavior*, 77(4–5), 607–612. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(02\)00895-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(02)00895-8)
- Vandecasteele, M., Deniau, J. M., Glowinski, J., Venance, L. (2007). Electrical synapses in basal ganglia. *Reviews in the Neurosciences*, 18(1), 15–35. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.2007.18.1.15/MACHINEREADABLECITATION/RIS>
- Venance, L., Glowinski, J., Giaume, C. (2004). Electrical and chemical transmission between striatal GABAergic output neurones in rat brain slices. *The Journal of Physiology*, 559(1), 215–230. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2004.065672>
- Verselis, V. K., Srinivas, M. (2013). Connexin channel modulators and their mechanisms of action. *Neuropharmacology*, 75, 517–524. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.03.020>
- Veruki, M. L., Hartveit, E. (2002). All (rod) amacrine cells form a network of electrically coupled interneurons in the mammalian retina. *Neuron*, 33(6), 935–946. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00609-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00609-8)
- Vitar, M. (2019). *El núcleo marcapaso de *Gymnotus omarorum*: caracterización de la variabilidad de un modelo de oscilador neural en vertebrados* [Udelar. FC]. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/23866>
- Volman, V., Perc, M., Bazhenov, M. (2011). Gap junctions and epileptic seizures – two sides of the same coin?. *PLoS ONE*, 6(5), e20572. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0020572>
- von Békésy, G. (1967). Mach Band Type Lateral Inhibition in Different Sense Organs. *Journal of General Physiology*, 50(3), 519–532. <https://doi.org/10.1085/JGP.50.3.519>
- von der Emde, Gerhard. (2006). Electoreception: Object Recognition in African Weakly Electric Fish. In T. J. Hara & B. S. Zielinski (Eds.), *Fish Physiology* (Vol. 25, pp. 307–336). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(06\)25007-6](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(06)25007-6)
- von der Emde, Gerhard. (1999). Active electrolocation of objects in weakly electric fish. *Journal of Experimental Biology*, 202(10), 1205–1215. <https://doi.org/10.1242/JEB.202.10.1205>
- Voronin, L. L., Cherubini, E. (2004). “Deaf, mute and whispering” silent synapses: their role in synaptic plasticity. *The Journal of Physiology*, 557(1), 3–12. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.058966>
- Waddell, J. C., Rodríguez-Cattáneo, A., Caputi, A. A., Crampton, W. G. R. (2016). Electric organ discharges and near-field spatiotemporal patterns of the electromotive force in a sympatric assemblage of Neotropical electric knifefish. *Journal of Physiology Paris*, 110(3), 164–181. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2016.10.004>

- Waxman, S. G., Pappas, G. D., Bennett, M. V. L. (1972). Morphological correlates of functional differentiation of nodes of ranvier along single fibers in the neurogenic electric organ of the knife fish *Sternarchus*. *Journal of Cell Biology*, 53(1), 210–224. <https://doi.org/10.1083/jcb.53.1.210>
- Yamamoto, T., Maler, L., Hertzberg, E. L., Nagy, J. I. (1989). Gap junction protein in weakly electric fish (*Gymnotidae*): immunohistochemical localization with emphasis on structures of the electrosensory system. *The Journal of Comparative Neurology*, 289(3), 509–536. <https://doi.org/10.1002/cne.902890314>
- Yang, L., Ling, D. S. F. (2007). Carbenoxolone modifies spontaneous inhibitory and excitatory synaptic transmission in rat somatosensory cortex. *Neuroscience Letters*, 416(3), 221–226.
- Zakon, H. H. (1995). Chapter 11 Electric organs: structure, physiology, hormone-sensitivity, and biochemistry. In P. W. Hochachka & T. P. Mommsen (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* (Vol. 4, Issue C, pp. 259–277). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1873-0140\(06\)80014-7](https://doi.org/10.1016/S1873-0140(06)80014-7)
- Zakon, H. H. (1996). Hormonal modulation of communication signals in electric fish. *Developmental Neuroscience*, 18(1–2), 115–123. <https://doi.org/10.1159/000111399>
- Zakon, H. H., Smith, G. T. (2002). Weakly Electric Fish. In *Hormones, Brain and Behavior* (pp. 349–374). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-012532104-4/50026-3>
- Zakon, H., Oestreich, J., Tallarovic, S., Triefenbach, F. (2002). EOD modulations of brown ghost electric fish: JARs, chirps, rises, and dips. *Journal of Physiology, Paris*, 96(5–6), 451–458. [https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(03\)00012-3](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(03)00012-3)
- Zhou, Q., Xiao, M. Y., Nicoll, R. A. (2001). Contribution of cytoskeleton to the internalization of AMPA receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(3), 1261–1266. <https://doi.org/10.1073/PNAS.98.3.1261>
- Zucker, R. S., Kennedy, D., Selverston, A. I. (1971). Neuronal circuit mediating escape responses in crayfish. *Science*, 173(3997), 645–650. <https://doi.org/10.1126/science.173.3997.645>
- Zupanc, G. K. H., & Maler, L. (1997). Neuronal control of behavioral plasticity: the prepacemaker nucleus of weakly electric gymnotiform fish. *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 180(2), 99–111. <https://doi.org/10.1007/s003590050031>
- Zupanc, G. 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), 459–472. [https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(03\)00002-0](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(03)00002-0)

11. Anexo

En la revisión “Hormone-mediated modulation of the electromotor CPG in pulse-type weakly electric fish. Commonalities and differences across species” publicada en la revista *Developmental Neurobiology* 80(1-2) 70-80 en el año 2020 se comparan los diferentes mecanismos neurales divergentes que han evolucionado en dos especies de Gymnotiformes de pulso para la modulación del CGP-EM. A pesar de mostrar características similares en cuanto a su organización anátomo-funcional, *Gymnotus omarorum* y *Brachyhypopomus gauderio* han desarrollado estrategias divergentes para modificar la salida del CGP-EM a través de entradas descendentes utilizando neurotransmisores rápidos para generar señales de comunicación. Asimismo, se muestran dos ejemplos en los que es posible analizar por separado los efectos de los neuropéptidos (modulación a mediano plazo) y las hormonas esteroideas gonadales (modulación a largo plazo) sobre el CGP-EM. El modelo de agresión territorial no reproductiva representado por *G. omarorum* ha permitido analizar la modulación dependiente de estado de la excitabilidad de los componentes neuronales del CPG por vasotocina. Por otro lado, las señales de cortejo estacionales y con dimorfismo sexual de *B. gauderio* han sido útiles para comprender los efectos de los esteroides sexuales en respuesta a las entradas glutamatérgicas al NEB. Aunque el CPG-EM funciona en un régimen que protege la forma de onda de la DOE, la influencia de las estructuras premarcapaso y la modulación hormonal generan una enorme versatilidad y permiten que la DOE se modifique adaptando la emisión de la eferencia rítmica del NEB a los desafíos derivados de la interacción social y de las condiciones físicas cambiantes del entorno.

REVIEW ARTICLE

Hormone-mediated modulation of the electromotor CPG in pulse-type weakly electric fish. Commonalities and differences across species

Michel Borde ¹ | Laura Quintana² | Virginia Comas ¹ | Ana Silva ^{2,3}

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

²Unidad Bases Neurales de la Conducta, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

³Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Correspondence

Ana Silva, Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Ciencias, Iguá 4225, Montevideo 11400, Uruguay.
Email: asilva@fcien.edu.uy

Abstract

Like stomatogastric activity in crustaceans, vocalization in teleosts and frogs, and locomotion in mammals, the electric organ discharge (EOD) of weakly electric fish is a rhythmic and stereotyped electromotor pattern. The EOD, which functions in both perception and communication, is controlled by a two-layered central pattern generator (CPG), the electromotor CPG, which modifies its basal output in response to environmental and social challenges. Despite major anatomic-functional commonalities in the electromotor CPG across electric fish species, we show that *Gymnotus omarorum* and *Brachyhypopomus gauderio* have evolved divergent neural processes to transiently modify the CPG outputs through descending fast neurotransmitter inputs to generate communication signals. We also present two examples of electric behavioral displays in which it is possible to separately analyze the effects of neuropeptides (mid-term modulation) and gonadal steroid hormones (long-term modulation) upon the CPG. First, the nonbreeding territorial aggression of *G. omarorum* has been an advantageous model to analyze the status-dependent modulation of the excitability of CPG neuronal components by vasotocin. Second, the seasonal and sexually dimorphic courtship signals of *B. gauderio* have been useful to understand the effects of sex steroids on the responses to glutamatergic inputs in the CPG. Overall, the electromotor CPG functions in a regime that safeguards the EOD waveform. However, pacemaker influences and hormonal modulation enable an enormous versatility and allows the EOD to adapt its functional state in a species-, sex-, and social context-specific manners.

KEYWORDS

GABAergic inputs, glutamatergic inputs, Gymnotiformes, pacemaker nucleus, steroid hormones, vasotocin

1 | INTRODUCTION

Central pattern generators (CPGs) are neural circuits that produce rhythmic outputs in the absence of rhythmic input. This concept was historically linked to the production of rhythmic motor activity such as the locust flight CPG (Wilson, 1961).

Later, it was also found in the crustacean stomatogastric ganglion (STG) network activity which drives foregut movements associated with feeding (Figure 1a, Heinzel, Weimann, & Marder, 1993; Marder, Bucher, Schulz, & Taylor, 2005), the leech swimming and heart beat networks (Kristan, Calabrese, & Friesen, 2005; Mullins, Hackett, Buchanan, &

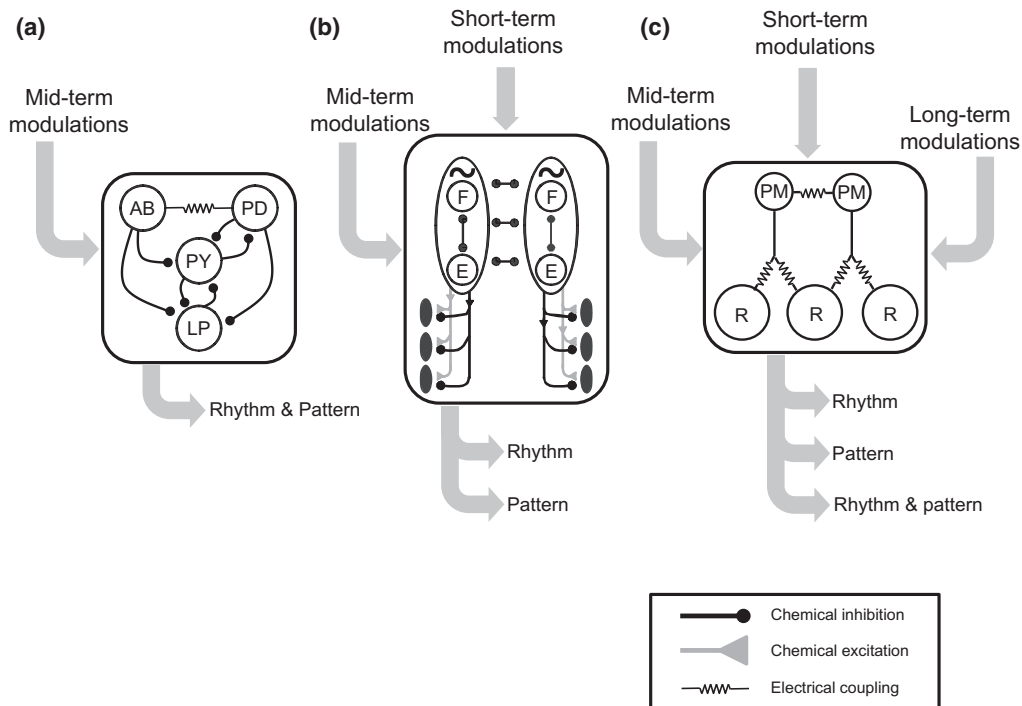


FIGURE 1 Examples of CPGs across species. (a) Simplified connectivity diagram of the pyloric circuit of the stomatogastric ganglion. Anterior burster (AB) and pyloric dilator (PD) neurons are coupled electrotonically. AB neurons have inhibitory cholinergic connections to the lateral pyloric (LP) and pyloric (PY) neurons, while PD neurons inhibit them via glutamatergic connections. LP and PY neurons reciprocally inhibit each other *via* cholinergic connections, while LP neurons inhibit PD neurons. Mid-term modulations are responsible for the different outputs of the CPG (modified from Marder & Bucher, 2007). (b) Simplified diagram of the spinal locomotor circuit. The oval in the upper part of each hemispinal cord represents the networks organizing flexor (F) and extensor (E) alternation. They are reciprocally inhibited via glycinergic connections, and each network drives the activity of caudal motoneurons via glycinergic and glutamatergic acid aminergic connections. Rhythm and pattern are affected by both short and mid-term modulations (modified from Cazalets, 2000). (c) Schematic diagram of the gymnotiform fish pacemaker nucleus (PN). Pacemaker cells (PM) are located in the dorsal region and relay cells (R) are ventral. The PM-cells are electrotonically coupled between them and to R-cells. The activity of the PN is modified by short-, mid- and long-term modulations

Friesen, 2011), nonmammalian vertebrate swimming networks (Grillner & El Manira, 2015), mammalian locomotion (Figure 1b, Cazalets, 2000; Kiehn, 2006), and respiration networks (Ramirez, Tryba, & Peña, 2004; Ramirez et al., 2012).

Regardless of the specific network architecture, the components of rhythmic outputs orchestrated by CPGs are often separated into rhythm and pattern. Rhythm refers to the timing of the neural oscillations or output. Pattern applies to the coordinated recruitment of effector neurons in sequence (Dougherty & Ha, 2019). In this review, we hold to the conceptual framework raised by McCrea and Rybak (2008) that predicts that most CPGs involve two interconnected functional levels (two-layer model). One level is represented by a central pacemaker that generates the rhythmic activity and the other level is usually composed by a set of neurons responsible for the specific patterned sequence of activation of peripheral effectors.

Extensive experimental evidence in leech (Briggman & Kristan, 2008; Puhl & Mesce, 2008), STG (Marder, O'Leary, & Shruti, 2014), sonic fish (Bass, 2008; Goodson & Bass, 2001), weakly electric fish (Caputi, Carlson, & Macadar,

2005; Dunlap, Silva, Smith, & Zakon, 2017), frog (Zornik and Kelley, 2011), lamprey (Grillner & El Manira, 2015), and mammals lumbar locomotor CPG (Guertin, 2013; Steuer & Guertin, 2019) indicate that the activity of CPGs is controlled by various modulators that modify the behavioral outputs according to different environmental demands. Based on the nature of the modulator and to the duration of its effects, three main categories of CPG modulations can be recognized.

1.1 | Short-term modulations

This category includes the effects mediated by classical fast ionotropic neurotransmitters (e.g., GABA, glutamate, glycine) on various cellular components of the CPG. Although a tonic glutamatergic drive has been associated with the initiation of rhythmic activity in several vertebrate CPGs (see e.g., Cazalets, 2000; Grillner, 2003), fast transmitter inputs can also trigger short-term modulations (milliseconds to seconds) of both the rhythm and the pattern to cope with a fast-changing environment. In general, these synaptic inputs

derive from the neural processing of external relevant sensory cues (Rossignol, Dubuc, & Gossard, 2006). Inputs to the rhythm generator level induce changes in the rate of the rhythmic output, while inputs to the pattern formation level shape the specific sequence of effector activation (McCrea & Rybak, 2008).

1.2 | Mid-term modulations

This category comprises the modulation of CPGs by neuropeptides, acetylcholine, amines, and other neuromodulators that act locally and whose effects can last for minutes to hours (Dickinson, 2006). Although usually associated with local effects within the CPG, these modulators can diffuse considerable distances from their release sites (volume transmission) and exert their effects over a relatively large population of neurons (Agnati, Zoli, Strömberg, & Fuxe, 1995). Neuromodulators can initiate the activity of CPGs or modify their ongoing activity via the modulation of electrical properties of the CPG neuronal components and the strength of their synaptic connections (Gettings, 1989; Marder, 2012; Marder & Thirumalai, 2002). Thus, neuromodulators can switch the activity between stable states of network operation; for example, from pyloric to gastric coordinated motor patterns and *vice versa* in the STG (Daur, Nadim, & Bucher, 2016). Modulations of circuit dynamics induced by neuromodulators usually involve coordinated changes in the rhythm and pattern of the CPG output. This kind of modulation has been extensively characterized, especially in small circuits, and represents one of the best-known examples of network re-configuration (Gettings, 1989; Marder, 2012).

1.3 | Long-term modulations

Gonadal steroid hormones drive seasonal behavioral plasticity by acting in a concerted manner; that is, the same steroid hormone that regulates gamete maturation causes changes in motor systems, effectors, and sensory systems which are necessary for mating or aggressive behavior (reviewed in Adkins-Regan, 2005; Forlano, Sisneros, Rohmann, & Bass, 2015). Steroid hormones can directly modify the CPG network dynamics by changing neuronal properties and synaptic physiology through stimulating the transcription of voltage-dependent channels and neurotransmitter receptors (Remage-Healey, 2014; Zornik & Kelley, 2011). Steroid hormones can also act indirectly by affecting peptidergic pathways involved in the modulation of CPGs (Goodson & Bass, 2001). Therefore, gonadal steroid hormones are involved (directly or via neuromodulatory inputs) in the control of seasonal changes and sexual dimorphism of the electrophysiological properties of neurons and their connections within a CPG

(Rhodes, Yu, & Yamaguchi, 2007). The fact that neuromodulatory systems and steroid hormones can interact dynamically depending on behavioral context and may even share some basic neural mechanisms poses a challenge for experimentally identifying the specific neural mechanisms attributed to each category of CPG modulators.

In this review, we first describe neural mechanisms underlying the effects of fast neurotransmitter inputs to the electromotor CPG that drives the electric organ discharge (EOD) of weakly electric fish. We compare distinct neural strategies that two phylogenetically distant gymnotiform species—*Brachyhyppomus gauderio* and *Gymnotus omarorum* (Crampton, 2011; Hopkins, 2009)—display in the fast neurotransmitter inputs which cause the electromotor CPG to generate very similar transient communication signals. Then, we present a well-characterized behavioral electric display in each species, demonstrating a clear-cut example in which one can separate the effects of either neuropeptides (mid-term modulation) or gonadal steroid hormones (long-term modulation) on the CPG.

2 | THE ELECTROMOTOR CENTRAL PATTERN GENERATOR IN GYMNOTIFORMES

Electric fish have long fascinated humans, and they have been known centuries before the discovery of electricity. However, it was only in 1951 when Lissmann finally demonstrated that some fish produce weak electric fields that are used for active sensing and communication (reviewed in Markham, 2013). South American weakly electric fish, Gymnotiformes, constitute a highly diverse group that comprises over 170 species within approximately 30 genera distributed among five families (Crampton, 2011). These fish broadcast their behavioral states by modulating both the rhythm and waveform pattern of the EOD. These modulations allow fish to adapt to environmental and social demands while preserving the ability to use the EOD to distinguish objects in the environment (Stoddard, 2006). According to the duration of the EOD and its timing, two main groups of gymnotiforms can be recognized (Caputi et al., 2005). In wave-type fish, the discharge interval is regular and similar to the duration of the EOD. The electromotor output therefore has a continuous sine wavelike shape. In pulse-type fish, in contrast, the interval between EODs is much larger than its duration and the electric discharge consists of a series of discrete, rhythmic and stereotyped beats. The functional division of gymnotiform into pulse and wave types is likely associated with ancient divergences in niche occupancy that shaped the evolution of signal diversity among this group (Crampton, 2019). However, phylogenetic analysis of morphological and molecular data indicate that pulse- and wave-type families can be more closely related

than families of pulse-type fish (Crampton, 2011). For example, the pulse-type family Hypopomidae (which includes the genus *Brachyhypopomus*) is closer to the wave-type family Sternopygidae (which includes the genus *Eigenmania*) than to the pulse-type family Gymnotidae (which includes the genus *Gymnotus*).

EOD rate is determined by the pacemaker nucleus (PN) located in the brainstem. The PN has a pivotal role in the electromotor system integrating superior prepacemaker incoming influences into its own synchronized and spontaneous discharge and largely fulfills the major criteria for being considered a CPG (Figure 1c). By the late 1980s, the concept of CPG was applied to describe both the rhythmicity of the electromotor command in one species of African Mormyriiformes (Teysseire & Boudinot, 1987) and the modulation mechanisms of the PN in the context of social communication in one species of South American Gymnotiformes (Kawasaki & Heiligenberg, 1989). More recently, the concept of CPG was expanded to the electromotor system of several other species of weakly electric fish (Bass & Zakon, 2005; Carlson, 2003; Carlson & Hopkins, 2004; Grant, 1993).

In pulse Gymnotiformes, the PN contains two neuronal types that are spatially segregated (Figure 2, first row). Actual pacemaker cells (PM-cells) are grouped dorsally in the PN and set the pace of the whole CPG. Relay cells (R-cells) are grouped ventrally, project to the spinal cord, and ultimately translate the command drive to the peripheral electric organ, producing a species-specific EOD waveform pattern (Figure 2, second row; reviewed in Caputi et al., 2005). The command for each EOD is initiated by the PM-cells and then transmitted 1:1 to R-cells. PM-cells are electrotonically coupled with each other and with R-cells (Bennett, 1971; Bennett, Pappas, Giménez, & Nakajima, 1967) and they form a rather simple circuit with exclusive feedforward connections. The PN can thus be considered a two-layered model CPG, the electromotor CPG. The rhythmic layer is represented by the PM-cells. The patterning layer comprises the R-cells and their synaptic targets at the spinal cord; that is, a topographically distributed population of electromotor neurons. The EOD waveform depends on the synchronous firing of R-cells (Caputi, 1999; Caputi & Trujillo-Cenóz, 1994; Caputi et al., 2005; Lorenzo, Sierra, Silva, & Macadar, 1993; Trujillo-Cenóz, Echagüe, & Macadar, 1984). Any disruption of this synchrony will be translated into modulations of both EOD rhythm and waveform (Comas, Langevin, Silva, & Borde, 2019). In contrast to most vertebrate CPGs, in which the rhythmic activity requires an activating tonic descending input, the electromotor CPG is autorhythmic. In fact, its rhythmic activity persists even in *in vitro* preparations, isolated from any descending input (Comas et al., 2019; Perrone et al., 2014; Quintana, Harvey-Girard, Lescano, Macadar, & Lorenzo, 2014; Smith & Zakon, 2000; Spiro, 1997).

2.1 | Short-term modulation of the electromotor CPG: species-specific actions of glutamatergic and GABAergic inputs

Pulse-type electric fish species use similar (if not identical) EOD modulations as behavioral displays, but their meaning is species specific and context dependent. The electrical signaling used in both the courtship behavior of *B. gauderio* and agonistic behavior of *G. omarorum* are good examples to illustrate this issue.

Brachyhypopomus gauderio (Giora & Malabarba, 2009) is considered a “champion species” in electric signaling as it has a diverse repertoire of signals that has made it an advantageous model system to explore seasonal and sexual plasticity of the central nervous system. Its breeding behavior, and particularly the electric dialogue displayed during courtship, has been comprehensively studied in the wild as well as in laboratory settings (Perrone, Macadar, & Silva, 2009). Only during breeding, *B. gauderio* produce transient, sexually dimorphic social electric signals in addition to the regular emission of their EODs. Females interrupt their EOD emission (Figure 2 third row) while males produce chirps (Figure 2 fourth row) and accelerations (Silva, Quintana, Perrone, & Sierra, 2008). Male chirps are short-duration modulations (25–260 ms) in both CPG rhythm and pattern that involve an increase in EOD rate (up to 500 Hz) with EOD amplitude dips, while accelerations are gradual and smaller increases in EOD rate (up to 80–100 Hz) with almost no distortion of EOD amplitude. A sophisticated electric dialogue synchronizes spawning: the male stops at the spawning site chirping profusely, while the female approaches adopting an on–off–on pattern of its EOD and spawns near the male.

Gymnotus omarorum (Richer-de-Forges, Crampton, & Albert, 2009) displays the best understood example of pure territorial aggression among teleosts (Quintana et al., 2016). During the nonbreeding season, when gonads are regressed and no reproductive motivation drives competition, males and females fiercely defend territories in intrasexual and intersexual encounters. Dyads of nonbreeding adults (males or females) placed in a plain arena engage in rapid agonistic encounters from which a clear dominant–subordinate status emerges in ~ 3 min (Batista, Zubizarreta, Perrone, & Silva, 2012). Near the end of the struggle, subordinates retreat and signal their surrender by: (1) interrupting their EOD to hide from the dominant (Figure 2 third row), (2) emitting chirps (Figure 2 fourth row), and (3) adopting a lower postresolution EOD basal rate than dominants (Perrone & Silva, 2018).

Despite the rigid and conserved wiring of the PN among species, the cellular mechanisms underlying the production of comparable social electric signals are species specific. Chirps and interruptions, understood as rhythm and pattern

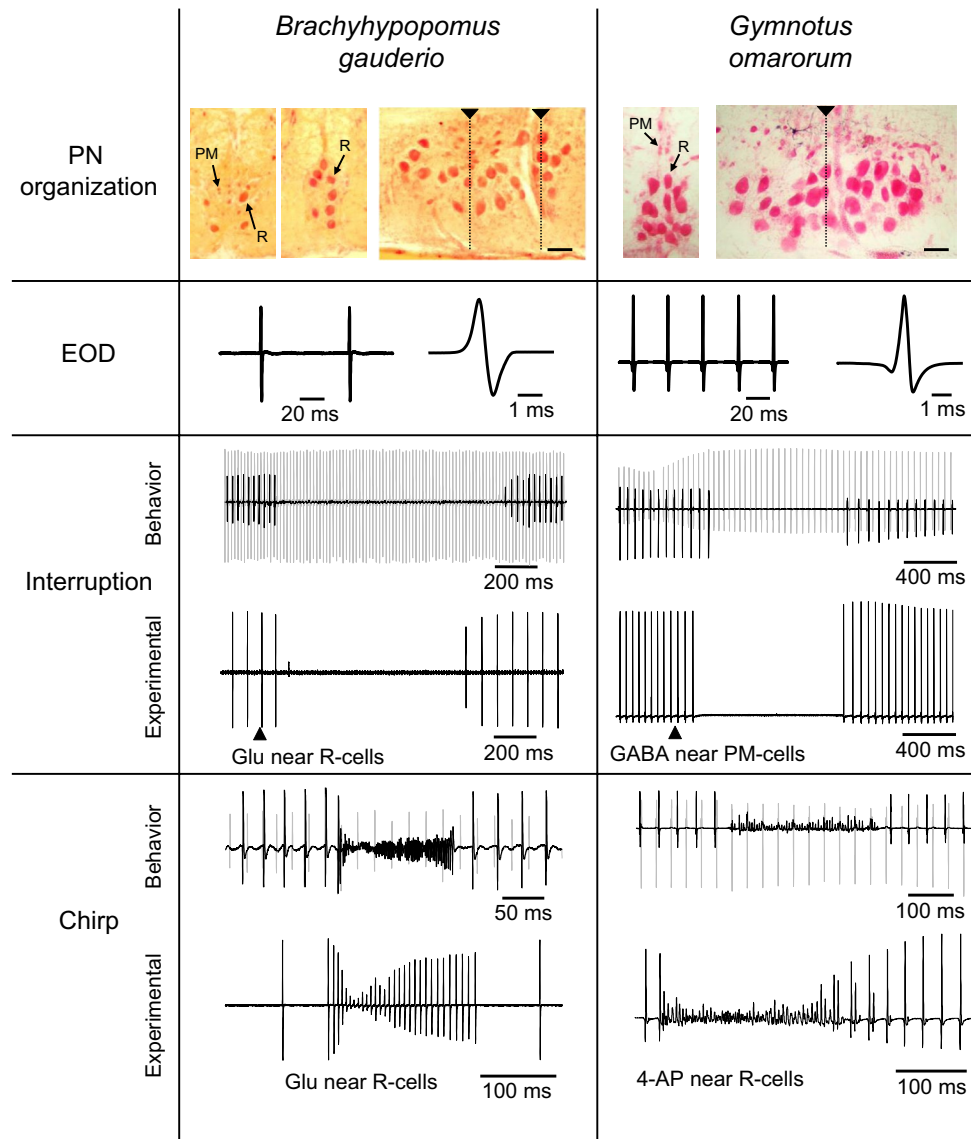


FIGURE 2 The electromotor CPG of *Brachyhypopomus gauderio* (left column) and *Gymnotus omarorum* (right column). PN organization: *B. gauderio*: transverse sections (two left micrographs, 10 μ m sections at two positions along the rostro-caudal axis indicated by arrowheads in the sagittal section) and sagittal section (right micrograph, 60 μ m section) with triple stain of Cajal-Gallego. The overall anatomy of the PN is indistinguishable across seasons and between sexes. *G. omarorum*: transverse section (left micrograph, 75 μ m section at the position indicated by the arrowhead in the sagittal section) and sagittal section (right micrograph, 75 μ m section) stained with Pyronin-Y Red. PM: pacemaker cells; R: relay cells. Calibration bars: 100 μ m (modified from Borde, Curti, Comas, & Rivero, 2004; Curti and Borde, unpublished results; Quintana, Pouso, et al., 2011). EOD: Both rhythm and pattern show differences between species. *B. gauderio* emits a biphasic EOD at 15 Hz, while *G. omarorum* emits a triphasic EOD at 37.5 Hz. (modified from Borde et al., 2004; Silva, Quintana, Galeano, Errandonea, & Macadar, 1999). Interruption, behavior: EOD recordings of male–female dyads of *B. gauderio* in a lab setting. While the male maintains its discharge (gray trace), the female produces a transient interruption (black trace; modified from Perrone et al., 2009). Post-resolution dyadic EOD recordings of *G. omarorum* individuals show that the submissive individual interrupts its EOD (black trace, above) while the dominant fish maintains its regular rate (gray trace; modified from Comas et al., 2019). Interruption, experimental: EOD interruption evoked by the injection of a microvolume of glutamate (arrowhead, Glu 10 mM) in the vicinity of the R-cells in an *in vivo* preparation of immobilized individuals of *B. gauderio* (modified from Quintana, Sierra, et al., 2011). EOD interruption evoked by the injection of a microvolume of GABA (arrowhead, 1 mM) in the vicinity of PM-cells in an *in vivo* preparation of immobilized individuals of *G. omarorum* (modified from Comas et al., 2019). Chirp, behavior: EOD recordings of male–female dyads of *B. gauderio* in a lab setting. While the female steadily discharges (gray trace), the male emits chirps (black trace; modified from Perrone et al., 2009). Post-resolution dyadic EOD recordings of *G. omarorum* individuals show that the submissive individual chirps (black trace) while the dominant keeps its regular discharge (gray trace; modified from Comas et al., 2019). Chirp, experimental: Chirp evoked by the injection of a microvolume of glutamate (Glu 10 mM) in the vicinity of the R-cells in an *in vivo* preparation of immobilized individuals of *B. gauderio* (modified from Quintana, Sierra, et al., 2011). Chirp evoked by the injection of a microvolume of 4-aminopyridine (4-AP, 10 mM) in the vicinity of R-cells in an *in vivo* preparation of immobilized individuals of *G. omarorum* (modified from Comas et al., 2019) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

modulations of the electromotor CPG, depend not only on the specific prepacemaker structures being activated, but also on the cellular target of prepacemaker inputs within the PN and the neurotransmitter receptors involved (Figure 2). Early electrophysiological studies unraveled the neural mechanisms underlying social modulations in the genus *Brachyhyopomus* (Kawasaki and Heiligenberg, 1989, 1990; Spiro, 1997). EOD interruptions are produced by prepacemaker inputs which cause a large sustained depolarization mediated through NMDA receptors that inactivates R-cells (Figure 2 third row). By contrast, in *G. omarorum*, in which no glutamatergic actions have been ever demonstrated on the R-cells (Curti, Comas, Rivero, & Borde, 2006; Curti, Falconi, Morales, & Borde, 1999), interruptions of subordinates are caused by prepacemaker GABAergic inputs to PM-cells (Figure 2 third row; Comas et al., 2019). Chirping activity of *Brachyhyopomus* relies on the activation of glutamatergic prepacemaker inputs on R-cells via AMPA receptors (AMPA) that cause their repetitive discharge independently of PM-cells inputs (Figure 2 third row; Kawasaki & Heiligenberg, 1989; Spiro, 1997). In contrast, chirping activity in subordinate *G. omarorum* can be evoked by the enhancement of R-cell excitability by the blockade of an I_A -type potassium current but not by glutamate administration (Figure 2 fourth row; Comas et al., 2019). This bursting activity is likely to be initially driven by the passive depolarization of R-cells in response to PM-cell-sustained depolarization (Comas et al., 2019).

In summary, it is valuable to compare short-term modulations produced by descending synaptic inputs on the PN across pulse-type species to confirm the highly conserved wiring of the electromotor CPG. Despite the phylogenetic distance between these two species, short-term modulations yield similar EOD rhythm and pattern displays. On the other hand, it is interesting to confirm that different species-specific mechanisms have evolved to underlie identical displays. The EOD interruption is mediated by different synaptic inputs, glutamatergic on R-cells for *Brachyhyopomus* and GABAergic on PM-cells for *Gymnotus*. In a more subtle way, although chirping activity depends on the sustained depolarization of R-cells in both species, this depolarization is achieved by different operational mechanisms.

2.2 | Mid-term modulation of the electromotor CPG: neuropeptide regulation of the submissive electric signaling of *Gymnotus omarorum*

The hypothalamic neuropeptide arginine vasotocin (AVT) and its mammalian homologue, arginine vasopressin (AVP) are key modulators of social behavior in vertebrates and

exert their effects in a context-dependent manner between species, sexes, physiological states, phenotypes, and social scenarios (Albers, 2015; Caldwell, 2017; Godwin & Thompson, 2012; Goodson & Bass, 2001; Goodson & Kabelik, 2009; Insel & Young, 2000; Johnson & Young, 2017). However, the precise mechanisms of AVT/AVP actions in the brain remain elusive mainly due to the nature of neuropeptidergic actions (Parker & Bloom, 2012). Agonistic behavior is a very advantageous example of social behavior to explore context-dependent actions of the AVT system because of the asymmetry in the behavioral displays of dominants and subordinates. AVT is an excellent candidate to be mediating the plastic context-dependent neural control by which each phenotype arises. Moreover, the nonbreeding territorial aggression of *G. omarorum* offers the possibility of evaluating CPG neuropeptidergic modulation in the absence of the confounding effects of high circulating sexual steroid hormones.

The agonistic behavior of *G. omarorum* presents a clear example of status-dependent actions of AVT (Perrone & Silva, 2018). While the administration of AVT to subordinates enhances their submissive electric signaling (Figure 3a), the same pharmacological manipulation applied to dominants does not induce any change in their electric behavior (Perrone & Silva, 2018). This clear status-dependent behavioral actions of AVT encouraged the search for underlying mid-term neuropeptidergic modulations of the electromotor CPG. Local AVT application to the PN evoked immediate small amplitude chirp-like discharges (Figure 3b; Comas et al., 2019). When applied near R-cells, AVT evoked bursts of high rate discharges, but when applied near the PM-cells, it caused chirp-like discharges with a longer delay (Comas et al., 2019). Given that AVT fibers actually reach the proximity of the electromotor CPG (Perrone et al., 2014; Pouso, Radmilovich, & Silva, 2017), these observations suggest that AVT acts as a direct modulator of R-cell excitability during contests. This modulation would favor, only in subordinates, an increase in excitability of the specific group of AVT-sensitive R-cells required for the display of submissive behavioral chirps.

2.3 | Long-term modulation of the electromotor CPG: steroid hormonal regulation of the seasonal and sexual dimorphism of the reproductive electric signaling in *Brachyhyopomus gauderio*

The seasonal and sexually dimorphic courtship signaling of *B. gauderio* is a valuable model in which it is possible to trace differences in behavior to differences in the brain. Specifically, it has enabled the analysis of short-term modulations of the electromotor CPG under the long term influence

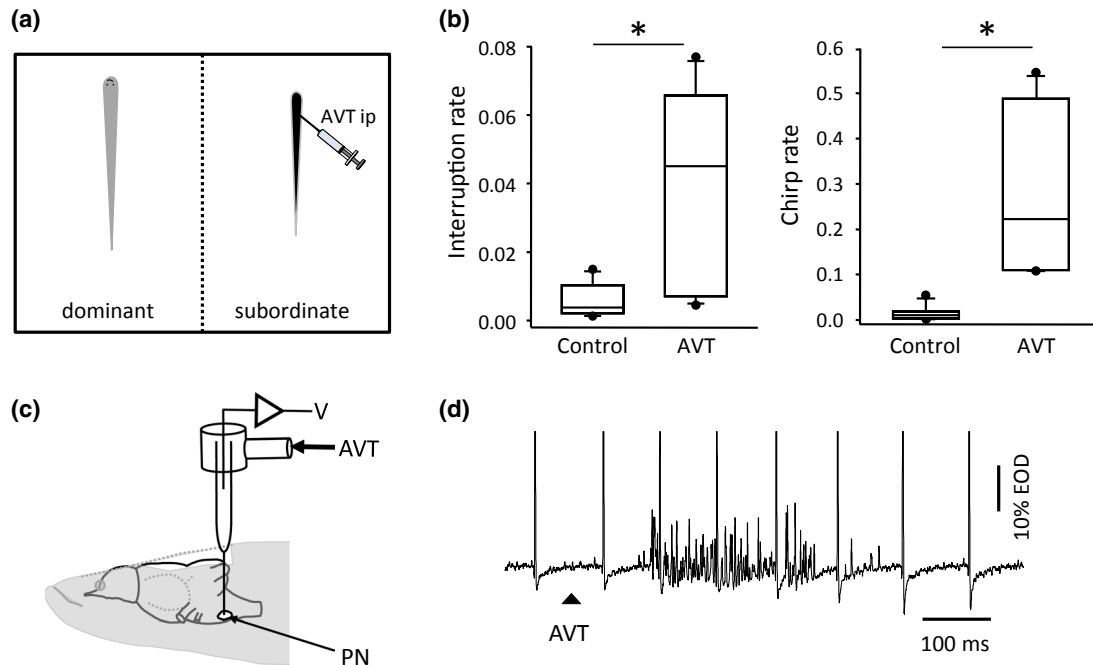


FIGURE 3 AVT enhances submissive electrical signals emission. (a) Schematic drawing of the arena used for dyadic EOD recordings of *G. omarorum* individuals, showing size asymmetry of potential dominant (gray fish) and subordinate (black fish) contenders. The smaller fish received, previous to the agonistic encounter, an intraperitoneal injection of arginine-vasotocin (AVT ip, 1 $\mu\text{g}/\text{g}$ body weight of a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ solution, controls, and potential dominants, received saline solution). (b) Box plots of control vs. AVT post-resolution interruption rate (left). AVT administered to subordinates increases interruption rate (Mann–Whitney U -test, $P = .03$, $n_{\text{control}} = 7$, $n_{\text{AVT}} = 7$). Box plots of control vs. AVT post-resolution chirp rate (right) of subordinate fishes. AVT administered to subordinates increases chirp rate (Mann–Whitney U -test, $P = .04$, $n_{\text{control}} = 7$, $n_{\text{AVT}} = 6$). * $P < .05$; modified from Perrone & Silva, 2018). (c) Schematic drawing of a lateral view of the fish's head including the brain and part of the spinal cord. A micropipette for extracellular recording (V) and pressure AVT application (AVT) lowered to the pacemaker nucleus (PN) is depicted. (d) Small-amplitude chirp-like discharge evoked by the injection of a microvolume of 1 mM AVT (arrowhead) near R-cells. The EOD maintains its regular rate. The peak of the regular full EODs is truncated at 10% (modified from Comas et al., 2019) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

of seasonally changing sex hormones. This has been carried out through the study of the electrophysiological response to glutamate stimulation of the PN in fish under different reproductive conditions (breeding or nonbreeding, Quintana, Pouso, Fabbiani, & Macadar, 2011; Quintana, Sierra, Silva, & Macadar, 2011).

The PN field potential can be easily recorded and has been used as a guide for glutamate stimulation in different locations. The internal distribution of neurons (dorsal PM-cells, ventral R-cells, Figure 2) is reflected in the waveform of the field potential, which shows consistent differences in distinct sites of the PN. When males and females are subjected to glutamate injections near PM-cells in *in vivo* settings, gradual increases in EOD rate are observed across sexes and seasons. In contrast, glutamate stimulation near the R-cell area differs across seasons. In ventral sites, non-breeding adults, as well as breeding females respond with EOD interruptions. On the other hand, breeding males respond to this stimulation by adding another signal: chirps. These glutamate induced chirps are strikingly similar to those recorded both in the natural habitat and behaviorally recorded in the lab (Quintana, Sierra, et al., 2011). Male

chirping activity is paralleled by the expression of androgen receptors in the electromotor CPG, only during the breeding season (Pouso, Quintana, Bolatto, & Silva, 2010). These receptors bind different androgens (e.g., testosterone and 11-ketotestosterone; Diotel et al., 2011; Pouso et al., 2010), and their expression can be induced by experimental increases in circulating androgens. This suggests that naturally occurring seasonal increases of this gonadal androgen may upregulate receptor expression and trigger events that promote the acquisition of R-cell properties underlying chirps (Figure 4).

During the breeding season, males and females produce their different courtship communication signals with parallel functional differences in the electromotor CPG. The isolated PN in brainstem slices shows spontaneous and regular activity, which reflects the response of the whole EO. Consistent with the aforementioned *in vivo* studies, *in vitro* glutamate stimulation of the PN provoked rate increases and interruptions in both sexes and chirp-like responses only in males (Quintana et al., 2014). A closer look at the mechanisms underlying this sexually dimorphic response was achieved by analyzing the effect of glutamate receptor

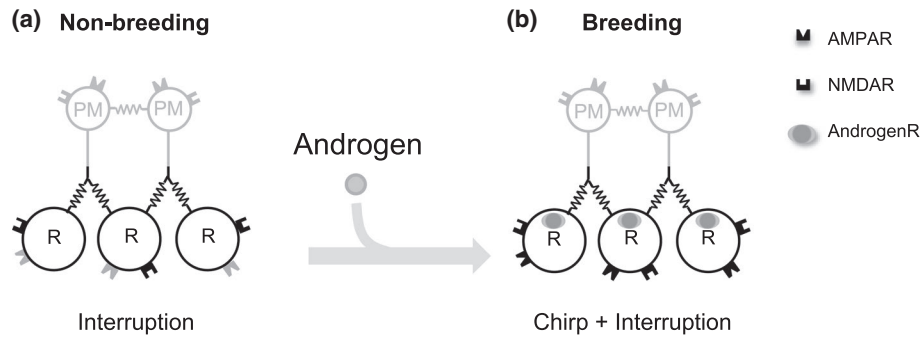


FIGURE 4 Effects of glutamate on the PN activity are modified in the breeding season. (a) Schematic drawing of the PN of male *B. gauderio* during the non-breeding season, males interrupt their EOD when glutamate is applied near the R-cells, which are endowed with functional NMDA receptors (NMDAR) and AMPA receptors with an unknown function that are represented as gray membrane glutamate receptors (AMPA, modified from Quintana, Sierra, et al., 2011). (b) During the breeding season, under the effects of long-lasting high concentrations of Androgens, the R-cells express androgen receptors (AndrogenR) and functional NMDA and AMPA receptors (now represented as black membrane receptors). Glutamate applied near R-cells evoke AMPA mediated chirps and NMDA mediated interruptions (modified from Pouso et al., 2010; Quintana et al., 2014)

agonists NMDA and AMPA on PN activity. Stimulation of NMDAR provoked both rate increases and interruptions in males and females. AMPA, on the other hand, produced sexually dimorphic responses: rate increases and interruptions in females, and an additional chirp-like response in males. AMPA-induced chirps were robustly produced in long-lasting bouts. Intracellular recordings show that during this chirp-like activity, R-cells discharge in response to PM-cells, but also produce high-frequency bursts of action potentials, uncoupled from the incoming regular PM-cell activation.

These results suggest that AMPAR might be expressed differentially in males and females. However, in situ hybridization of GluR2B, which codes for an AMPAR subunit that controls key biophysical properties of the receptor function, did not reveal sex differences in PN neurons (Quintana et al., 2014). Therefore, it can be speculated that AMPA-mediated sexually dimorphic responses may be accounted for by differences in posttranscriptional modifications of the GluR2B RNA or by a differential expression of the other GluR genes that can provide AMPAR with functional diversity. It is also possible that in *B. gauderio* sexual dimorphism in these responses may be residing in differences in AMPAR subunit combinations. Finally, there also may be seasonal and sexual differences in modulation of AMPAR localization, the ratio between AMPAR and other glutamatergic receptors, the downstream intracellular processes after receptor activation or the intrinsic properties of R-cells.

3 | CONCLUDING REMARKS

The electromotor CPG can be considered as a convergence node whose activity has evolved as a compromise between two vital functions in weakly electric fish. Active electroreception

requires a stereotyped and regular EOD for use as an energy carrier for perception. Electrocommunication requires a flexible electromotor output to make the electric dialogue species, sex, and context specific. This is probably why the dramatic changes between stable functional network configurations observed in classical CPGs are unlikely to occur in the electromotor CPG. Conversely, the hard-wired electromotor CPG seems to work in a rather stable regime in which the EOD waveform is almost always safeguarded. However, the electromotor CPG in pulse Gymnotiformes is still capable of an enormous functional versatility due to the activation of descending synaptic inputs and the modulation (by neuropeptides and hormones) of those inputs and of neuronal intrinsic properties. Acting at different time scales (from milliseconds to days) these influences efficiently adapt the CPG functional state of each species in a sex and social context-dependent manner to cope with environmental and social challenges.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors want to thank Lidia Szczupak for her generous comments on a preliminary version of this article, and X-ONG_a for inspiration and support.

ORCID

Michel Borde  <https://orcid.org/0000-0002-5729-8616>

Virginia Comas  <https://orcid.org/0000-0002-7227-5607>

Ana Silva  <https://orcid.org/0000-0003-2890-0353>

REFERENCES

- Adkins-Regan, E. (2005). *Hormones and animal social behavior*. Princeton: Princeton University Press.
- Agnati, L. F., Zoli, M., Strömberg, I., & Fuxe, K. (1995). Intercellular communication in the brain: Wiring versus volume transmission. *Neuroscience*, 69(3), 711–726. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00308-6](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00308-6)

- Albers, H. E. (2015). Species, sex and individual differences in the vasotocin/vasopressin system: Relationship to neurochemical signaling in the social behavior neural network. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *36*, 49–71. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.07.001>
- Bass, A. H. (2008). Steroid-dependent plasticity of vocal motor systems: Novel insights from teleost fish. *Brain Research Reviews*, *57*(2), 299–308. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.04.006>
- Bass, A. H., & Zakon, H. H. (2005). Sonic and electric fish: At the crossroads of neuroethology and behavioral neuroendocrinology. *Hormones and Behavior*, *48*(4), 360–372. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.05.022>
- Batista, G., Zubizarreta, L., Perrone, R., & Silva, A. (2012). Non-sex-biased dominance in a sexually monomorphic electric fish: Fight structure and submissive electric signalling. *Ethology*, *118*(4), 398–410. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2012.02022.x>
- Bennett, M. V. L. (1971). Electric organs. *Fish Physiology*, *5*(C), 347–491. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60051-5](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60051-5)
- Bennett, M. V. L., Pappas, G. D., Giménez, M., & Nakajima, Y. (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>
- Borde, M., Curti, S., Comas, V., & Rivero, C. (2004). Modulación central de un sistema sensorial por un comando motor. Una intención con dos resultados. *Revista De Neurologia*, *38*(3), 253–260 <https://doi.org/10.33588/rn.3803.2004006>.
- Briggman, K. L., & Kristan, W. B. (2008). Multifunctional pattern-generating circuits. *Annual Review of Neuroscience*, *31*(1), 271–294. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125552>
- Caldwell, H. K. (2017). Oxytocin and vasopressin: Powerful regulators of social behavior. *The Neuroscientist*, *23*(5), 517–528. <https://doi.org/10.1177/1073858417708284>
- Caputi, A. A. (1999). The electric organ discharge of pulse Gymnotiforms: The transformation of a simple impulse into a complex spatio-temporal electromotor pattern. *Journal of Experimental Biology*, *202*, 1229–1241.
- Caputi, A., Carlson, B. A., & Macadar, O. (2005). Electric organs and their control. In T. H. Bullock, C. D. Hopkins, & R. R. Fay (Eds.), *Electroreception* (Vol. 21, pp. 410–451). New York: Springer. <https://doi.org/10.1007/0-387-28275-0>
- Caputi, A., & Trujillo-Cenóz, O. (1994). The spinal cord of *Gymnotus carapo*: The electromotoneurons and their projection patterns. *Brain, Behavior and Evolution*, *44*(3), 166–174. <https://doi.org/10.1159/000113588>
- Carlson, B. A. (2003). Single-unit activity patterns in nuclei that control the electromotor command nucleus during spontaneous electric signal production in the mormyrid *Brienomyrus brachyistius*. *Journal of Neuroscience*, *23*(31), 10128–10136. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-31-10128.2003>
- Carlson, B. A., & Hopkins, C. D. (2004). Central control of electric signaling behavior in the mormyrid *Brienomyrus brachyistius*: Segregation of behavior-specific inputs and the role of modifiable recurrent inhibition. *Journal of Experimental Biology*, *207*(7), 1073–1084. <https://doi.org/10.1242/jeb.00851>
- Cazalets, J. R. (2000). Organization of the spinal locomotor network in neonatal rat. In *Neurobiology of spinal cord injury* (pp. 89–111). Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-200-5_4
- Comas, V., Langevin, K., Silva, A., & Borde, M. (2019). Distinctive mechanisms underlie the emission of social electric signals of submission in *Gymnotus omarorum*. *Journal of Experimental Biology*, *222*(11), <https://doi.org/10.1242/jeb.195354>
- Crampton, W. G. R. (2011). An ecological perspective on diversity and distributions. In *Historical biogeography of neotropical freshwater fishes* (pp. 165–192). Berkeley, CA: University of California Press. <https://doi.org/10.1525/california/9780520268685.003.0010>
- Crampton, W. G. R. (2019). Electroreception, electrogenesis and electric signal evolution. *Journal of Fish Biology*, *95*(1), 92–134. <https://doi.org/10.1111/jfb.13922>
- Curti, S., Comas, V., Rivero, C., & Borde, M. (2006). Analysis of behavior-related excitatory inputs to a central pacemaker nucleus in a weakly electric fish. *Neuroscience*, *140*(2), 491–504. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.02.037>
- Curti, S., Falconi, A., Morales, F. R., & Borde, M. (1999). Mauthner cell-initiated electromotor behavior is mediated via NMDA and metabotropic glutamatergic receptors on medullary pacemaker neurons in a gymnotid fish. *Journal of Neuroscience*, *19*(20), 9133–9140. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-20-09133.1999>
- Daur, N., Nadim, F., & Bucher, D. (2016). The complexity of small circuits: The stomatogastric nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*, *41*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.07.005>
- Dickinson, P. S. (2006). Neuromodulation of central pattern generators in invertebrates and vertebrates. *Current Opinion in Neurobiology*, *16*(6), 604–614. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2006.10.007>
- Diotel, N., Do Rego, J.-L., Anglade, I., Vaillant, C., Pellegrini, E., Vaudry, H., & Kah, O. (2011). The brain of teleost fish, a source, and a target of sexual steroids. *Frontiers in Neuroscience*, *5*, 137. <https://doi.org/10.3389/fnins.2011.00137>
- Dougherty, K. J., & Ha, N. T. (2019). The rhythm section: An update on spinal interneurons setting the beat for mammalian locomotion. *Current Opinion in Physiology*, *8*, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2019.01.004>
- Dunlap, K. D., Silva, A. C., Smith, G. T., & Zakon, H. H. (2017). Weakly electric fish: Behavior, neurobiology, and neuroendocrinology. In D. W. Pfaff & M. Joëls (Eds.), *Hormones, brain and behavior* (3rd ed., Vol. 2, pp. 69–98). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803592-4.00019-5>.
- Forlano, P. M., Sisneros, J. A., Rohmann, K. N., & Bass, A. H. (2015). Neuroendocrine control of seasonal plasticity in the auditory and vocal systems of fish. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *37*, 129–145. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.08.002>
- Getting, P. A. (1989). Emerging principles governing the operation of neural networks. *Annual Review of Neuroscience*, *12*, 185–204. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.12.1.185>
- Giora, J., & Malabarba, L. R. (2009). *Brachyhypopomus gauderio*, new species, a new example of underestimated species diversity of electric fishes in the southern South America (Gymnotiformes: Hypopomidae). *Zootaxa*, *2093*, 60–68. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2093.1.4>.
- Godwin, J., & Thompson, R. (2012). Nonapeptides and social behavior in fishes. *Hormones and Behavior*, *61*(3), 230–238. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.12.016>
- Goodson, J. L., & Bass, A. H. (2001). Social behavior functions and related anatomical characteristics of vasotocin/vasopressin systems in vertebrates. *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)
- Goodson, J. L., & Kabelik, D. (2009). Dynamic limbic networks and social diversity in vertebrates: From neural context to neuromodulatory

- patterning. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 30(4), 429–441. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2009.05.007>
- Grant, K. (1993). Motor control of signal generation compared in mormyrid and gymnotiform fish. *Journal of Comparative Physiology - A*, 173(6), 729–731.
- Grillner, S. (2003). The motor infrastructure: From ion channels to neuronal networks. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(7), 573–586. <https://doi.org/10.1038/nrn1137>
- Grillner, S., & El Manira, A. (2015). The intrinsic operation of the networks that make us locomote. *Current Opinion in Neurobiology*, 31, 244–249. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.01.003>
- Guertin, P. A. (2013). Central pattern generator for locomotion: Anatomical, physiological, and pathophysiological considerations. *Frontiers in Neurology*, 3, 183. <https://doi.org/10.3389/fneur.2012.00183>
- Heinzel, H. G., Weimann, J. M., & Marder, E. (1993). The behavioral repertoire of the gastric mill in the crab, *Cancer pagurus*: An *in situ* endoscopic and electrophysiological examination. *Journal of Neuroscience*, 13(4), 1793–1803. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.13-04-01793.1993>
- Hopkins, C. D. (2009). Electric perception and communication. In L. R. Squire (Ed.), *Encyclopedia of neuroscience* (Vol. 3, pp. 813–831). Oxford: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.01827-1>.
- Insel, T. R., & Young, L. J. (2000). Neuropeptides and the evolution of social behavior. *Current Opinion in Neurobiology*, 10(6), 784–789. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00146-X](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00146-X)
- Johnson, Z. V., & Young, L. J. (2017). Oxytocin and vasopressin neural networks: Implications for social behavioral diversity and translational neuroscience. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 76, 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.01.034>
- Kawasaki, M., & Heiligenberg, W. (1989). Distinct mechanisms of modulation in a neuronal oscillator generate different social signals in the electric fish *Hypopomus*. *Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 165(6), 731–741. <https://doi.org/10.1007/BF00610872>
- Kawasaki, M., & Heiligenberg, W. (1990). Different classes of glutamate receptors and GABA mediate distinct modulations of a neuronal oscillator, the medullary pacemaker of a Gymnotiform electric fish. *Journal of Neuroscience*, 10(12), 3896–3904. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-12-03896.1990>
- Kiehn, O. (2006). Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annual Review of Neuroscience*, 29(1), 279–306. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112910>
- Kristan, W. B., Calabrese, R. L., & Friesen, W. O. (2005). Neuronal control of leech behavior. *Progress in Neurobiology*, 76(5), 279–327. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.09.004>
- Lissmann, H. W. (1951). Continuous electrical signals from the tail of a fish, *Gymnarchus niloticus* Cuv. *Nature*, 167(4240), 201–202. <https://doi.org/10.1038/167201a0>
- Lorenzo, D., Sierra, F., Silva, A., & Macadar, O. (1993). Spatial distribution of the medullary command signal within the electric organ of *Gymnotus carapo*. *Journal of Comparative Physiology A*, 173, 221–226. <https://doi.org/10.1007/BF00192980>
- Marder, E. (2012). Neuromodulation of neuronal circuits: Back to the future. *Neuron*, 76(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.010>
- Marder, E., & Bucher, D. (2007). Understanding circuit dynamics using the stomatogastric nervous system of lobsters and crabs. *Annual Review of Physiology*, 69(1), 291–316. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.031905.161516>
- Marder, E., Bucher, D., Schulz, D. J., & Taylor, A. L. (2005). Invertebrate central pattern generation moves along. *Current Biology*, 15(17), 685–699. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.08.022>
- Marder, E., O'Leary, T., & Shruti, S. (2014). Neuromodulation of circuits with variable parameters: Single neurons and small circuits reveal principles of state-dependent and robust neuromodulation. *Annual Review of Neuroscience*, 37(1), 329–346. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071013-013958>
- Marder, E., & Thirumalai, V. (2002, June). Cellular, synaptic and network effects of neuromodulation. *Neural Networks*, 15(4–6), 479–493. [https://doi.org/10.1016/S0893-6080\(02\)00043-6](https://doi.org/10.1016/S0893-6080(02)00043-6)
- Markham, M. R. (2013). Electrocyte physiology: 50 years later. *Journal of Experimental Biology*, 216(13), 2451–2458. <https://doi.org/10.1242/jeb.082628>
- McCrea, D. A., & Rybak, I. A. (2008). Organization of mammalian locomotor rhythm and pattern generation. *Brain Research Reviews*, 57(1), 134–146. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.08.006>
- Mullins, O. J., Hackett, J. T., Buchanan, J. T., & Friesen, W. O. (2011). Neuronal control of swimming behavior: Comparison of vertebrate and invertebrate model systems. *Progress in Neurobiology*, 93(2), 244–269. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.11.001>
- Parker, J. A., & Bloom, S. R. (2012). Hypothalamic neuropeptides and the regulation of appetite. *Neuropharmacology*, 63(1), 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.02.004>
- Perrone, R., Macadar, O., & Silva, A. (2009). Social electric signals in freely moving dyads of *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. *Journal of Comparative Physiology A*, 195(5), 501–514. <https://doi.org/10.1007/s00359-009-0427-6>
- Perrone, R., Migliaro, A., Comas, V., Quintana, L., Borde, M., & Silva, A. (2014). Local vasotocin modulation of the pacemaker nucleus resembles distinct electric behaviors in two species of weakly electric fish. *Journal of Physiology-Paris*, 108, 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.07.007>
- Perrone, R., & Silva, A. (2018). Status-dependent vasotocin modulation of dominance and subordination in the weakly electric fish *Gymnotus omarorum*. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12, 1. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00001>
- Pouso, P., Quintana, L., Bolatto, C., & Silva, A. (2010). Brain androgen receptor expression correlates with seasonal changes in the behavior of a weakly electric fish, *Brachyhypopomus gauderio*. *Hormones and Behavior*, 58(5), 729–736. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.07.005>
- Pouso, P., Radmilovich, M., & Silva, A. (2017). An immunohistochemical study on the distribution of vasotocin neurons in the brain of two weakly electric fish, *Gymnotus omarorum* and *Brachyhypopomus gauderio*. *Tissue and Cell*, 49(2), 257–269. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2017.02.003>
- Puhl, J. G., & Mesce, K. A. (2008). Dopamine activates the motor pattern for crawling in the medicinal leech. *The Journal of Neuroscience*, 28(16), 4192–4200. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0136-08.2008>
- Quintana, L., Harvey-Girard, E., Lescano, C., Macadar, O., & Lorenzo, D. (2014). Sex-specific role of a glutamate receptor subtype in a pacemaker nucleus controlling electric behavior. *Journal of Physiology-Paris*, 108, 155–166. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.04.004>

- Quintana, L., Pouso, P., Fabbiani, G., & Macadar, O. (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>
- Quintana, L., Sierra, F., Silva, A., & Macadar, O. (2011). A central pacemaker that underlies the production of seasonal and sexually dimorphic social signals: Functional aspects revealed by glutamate stimulation. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, *197*(2), 211–225. <https://doi.org/10.1007/s00359-010-0603-8>
- Quintana, L., Zubizarreta, L., Jalabert, C., Batista, G., Perrone, R., & Silva, A. (2016). Building the case for a novel teleost model of non-breeding aggression and its neuroendocrine control. *Journal of Physiology-Paris*, *110*(3), 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2016.11.009>
- Ramirez, J. M., Doi, A., Garcia, A. J., Elsen, F. P., Koch, H., & Wei, A. D. (2012). The cellular building blocks of breathing. *Comprehensive Physiology*, *2*(4), 2683–2731. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110033>
- Ramirez, J. M., Tryba, A. K., & Peña, F. (2004). Pacemaker neurons and neuronal networks: An integrative view. *Current Opinion in Neurobiology*, *14*(6), 665–674. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2004.10.011>
- Remage-Healey, L. (2014). Frank beach award winner: Steroids as neuro-modulators of brain circuits and behavior. *Hormones and Behavior*, *66*(3), 552–560. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.07.014>
- Rhodes, H. J., Yu, H. J., & Yamaguchi, A. (2007). Xenopus vocalizations are controlled by a sexually differentiated hindbrain central pattern generator. *Journal of Neuroscience*, *27*(6), 1485–1497. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4720-06.2007>
- Richer-de-Forges, M. M., Crampton, W. G. R., & Albert, J. S. (2009). A new species of *Gymnotus* (Gymnotiformes, Gymnotidae) from Uruguay: Description of a model species in neurophysiological research. *Copeia*, *2009*(3), 538–544. <https://doi.org/10.1643/CI-07-103>
- Rossignol, S., Dubuc, R., & Gossard, J. P. (2006). Dynamic sensorimotor interactions in locomotion. *Physiological Reviews*, *86*(1), 89–154. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2005>
- Silva, A., Quintana, L., Galeano, M., Errandonea, P., & Macadar, O. (1999). Water temperature sensitivity of EOD waveform in *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. *Journal of Comparative Physiology - A Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, *185*(2), 187–197. <https://doi.org/10.1007/s003590050377>
- Silva, A., Quintana, L., Perrone, R., & Sierra, F. (2008). Sexual and seasonal plasticity in the emission of social electric signals. Behavioral approach and neural bases. *Journal of Physiology-Paris*, *102*(4–6), 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2008.10.016>
- Smith, G. T., & Zakon, H. H. (2000). Pharmacological characterization of ionic currents that regulate the pacemaker rhythm in a weakly electric fish. *Journal of Neurobiology*, *42*(2), 270–286. [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)
- Spiro, J. E. (1997). Differential activation of glutamate receptor subtypes on a single class of cells enables a neural oscillator to produce distinct behaviors. *Journal of Neurophysiology*, *78*(2), 835–847. <https://doi.org/10.1152/jn.1997.78.2.835>
- Steuer, I., & Guertin, P. A. (2019). Central pattern generators in the brainstem and spinal cord: An overview of basic principles, similarities and differences. *Reviews in the Neurosciences*, *30*(2), 107–164. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0102>
- Stoddard, P. (2006). Plasticity of the electric organ discharge waveform: Contexts, mechanisms, and implications for electrocommunication. In F. Ladich, S. P. Collin, P. Moller, & B. G. Kapoor (Eds.), *Fish communication* (pp. 623–646). Enfield, NJ: Science Publisher Inc.
- Teyssedre, C., & Boudinot, M. (1987). Rhythmicity as an intrinsic property of the mormyrids electromotor command system. *Physiology and Behavior*, *41*(3), 201–207. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(87\)90354-4](https://doi.org/10.1016/0031-9384(87)90354-4)
- Trujillo-Cenóz, O., Echagüe, J. A., & Macadar, O. (1984). Innervation pattern and electric organ discharge waveform in *Gymnotus carapo* (Teleostei; Gymnotiformes). *Journal of Neurobiology*, *15*(4), 273–281. <https://doi.org/10.1002/neu.480150404>
- Wilson, D. M. (1961). The central nervous control of flight in a locust. *Journal of Experimental Biology*, *38*(2), 471–490.
- Zornik, E., & Kelley, D. B. (2011). A neuroendocrine basis for the hierarchical control of frog courtship vocalizations. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *32*(3), 353–366. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.12.006>

How to cite this article: Borde M, Quintana L, Comas V, Silva A. Hormone-mediated modulation of the electromotor CPG in pulse-type weakly electric fish. Commonalities and differences across species. *Develop Neurobiol.* 2020;80:70–80. <https://doi.org/10.1002/dneu.22732>