

**Efectos de la temperatura en Gymnotiformes  
de la zona templada**

**Ana Silva**

Tesis de Doctorado  
PEDECIBA  
Area Biología-Subárea Neurociencias  
2002

Orientador: Omar Macadar  
Co-Orientador: Harold Zakon

Tribunal: Ruben Budelli  
Angel Caputi (presidente)  
Peter Narins

Laboratorio de Ejecución: Depto. de Neurofisiología, IIBCE

*A mis padres, que me enseñaron que casi todo es posible*

*A Carlos, compañero de tantos otros desafíos*

*A mis hijos, Maira, Darío y Agustín*

---

## AGRADECIMIENTOS

A los compañeros del día a día que hicieron la tarea grata, desafiante y comprometida:

A Omar Macadar, maestro y amigo, supervisor exigente y tolerante, principal inspirador de mi trabajo.

A mis amigas entrañables, puntales de este trabajo:

Laura Quintana, con quien comparto vocación y disfrutes, por el estimulante intercambio cotidiano.

Rossana Perrone, por su solidario apoyo y crecientemente valiosos aportes.

A Pablo Errandonea, siempre presente, por su entusiasmo, sus propuestas alocadas, el chirp de campo Tipo C.

A Matías Galeano, compañero de los primeros pasos, por su alegría, iniciativa y capacidad emprendedora.

A Harold Zakon, co-orientador, por su guía, respaldo y útiles consejos y contactos.

A los miembros del tribunal, Ruben Budelli, Angel Caputi y Peter Narins, por sus críticas, comentarios y sugerencias que enriquecieron la versión final de esta tesis.

A Felipe Sierra, Julio Velluti, Daniel Lorenzo, Raúl Russo, Alberto Capurro, José Luis Ardanaz, Virginia Comas, Fabiana Blanco, Cecilia Reali, Daniela Agrati por hacer del Depto. de Neurofisiología un ámbito de trabajo enriquecedor y estimulante.

A Angel Caputi, con quien tuve el privilegio de compartir las primeras etapas de esta tesis y aprender de su enfoque original y creativo.

A Felipe Sierra, Daniel Lorenzo, Ruben Budelli, Michel Borde, José Luis Ardanaz, Alberto Capurro, miembros de la comunidad “peces eléctricos” por el incentivo e intercambio académico.

A Bettina Tassino (y al Depto. de Etología) que supervisó con generosidad e idoneidad el trabajo etológico.

A Mariana Meerhof, por la extensa revisión del capítulo biogeográfico, las horas invertidas, aportes y enseñanzas.

A Atilio Falconi por su apoyo en la concepción y realización del proyecto biogeográfico.

A Lynne McAnelly por su hospitalidad en Austin y fluido intercambio que mantenemos hasta hoy.

A los compañeros de las salidas de campo, que con su entusiasmo transformaron un trabajo sacrificado en una experiencia integradora y divertida: Clemente “Tito” Olivera, Gonzalo “Tato” Eiris, Felipe Sierra, Atilio Falconi, José Luis Ardanaz, Virginia Comas, Fabiana Blanco, Fabián Alvarez, Leonel Gómez, Adriana Migliaro, Cecilia Reali, Ruben Budelli, Maira Colacce, Darío Colacce, Juan Carlos Vallelisboa, Gonzalo Budelli, Michel Borde, Daniel Olazabal, Pablo Reyes.

A Gustavo Somoza, que nos recibió generosamente en su laboratorio, nos enseñó la técnica de radioinmunoensayo de esteroides y nos cedió los pellets hormonales.

A Rafael Saa por el desarrollo de software y asesoría constante.

A Leonel Gómez por la adaptación del Acquis 1 y fotos digitales.

A diversas instituciones y personas que facilitaron el trabajo de campo: familia Da Fonseca Zuluaga, Marta y Pamela que nos brindaron las comodidades para llevar a cabo el trabajo en la laguna El Tigre, Intendencias Municipales de Artigas y Treinta y Tres, Club Zorrilla de la ciudad de Artigas, Comisaría Policial de Paso Campamento.

A Liliana Silva y Felicia de Acevedo por el diseño de tapa.

A Fabián Alvarez, Amalia Dutra y dalequeva@ por el envío de artículos.

A las mujeres que tuve el privilegio de tener a mi lado: Aba Pete, Pipina, Aba Shana, Liliana, Maira, Aba Goly, Carla, Gabriela, Adriana, Mele, que me apoyaron con alegría, cuidaron niños, cocinaron, hicieron cadenas, deberes y mandados en mi lugar.

A Carlos, Maira, Darío y Agustín por su amor traducido en apoyo, paciencia y tolerancia.

---

## RESUMEN

Los Gymnotiformes son peces eléctricos de agua dulce que se distribuyen ampliamente en el continente americano. Sin embargo, dada su gran abundancia en la zona tropical, los Gymnotiformes han sido analizados hasta el momento como peces tropicales. Este trabajo los estudia como habitantes de la zona templada en el límite sur de su distribución continental. En este marco, se evaluó la influencia de la temperatura como uno de los factores responsables de la distribución continental del Orden, como factor temporizador del período reproductivo y como modulador de la forma de onda de la DOE interactuando con las hormonas esteroides gonadales.

Se detectó la presencia de 4 especies de Gymnotiformes en territorio uruguayo, de las cuales sólo *Gymnotus carapo* y *Brachyhypopomus pinnicaudatus* fueron encontradas en un alto porcentaje de los sitios explorados y con abundancia relativa alta. Este número de especies es muy inferior al detectado en la zona tropical (aproximadamente 100), y es razonable postular que esta diferencia depende mayormente de las variaciones de temperatura norte-sur. *Gymnotus carapo* habita en todo el territorio uruguayo y es la única especie presente en el área S; *Brachyhypopomus pinnicaudatus* habita en la región noreste y predomina en el área E. Esta distribución diferencial puede explicarse parcialmente por diferencias geográficas de conductividad eléctrica y pH.

El seguimiento de una población de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* a lo largo del año permitió identificar la ocurrencia del período reproductivo entre los meses de noviembre y enero en coincidencia con temperaturas del agua elevadas y fotoperíodo extremo. El dimorfismo sexual de la DOE de los machos progresa a lo largo del año en forma coherente con estos datos. La hipótesis de que el aumento de los valores promedio de la temperatura del agua observados en la Naturaleza es el estímulo que desencadena el período reproductivo en Gymnotiformes de la zona templada fue confirmada en el laboratorio por experimentos de aclimatación. El aumento sostenido de la temperatura del agua es un estímulo ambiental suficiente para desencadenar madurez sexual en *Brachyhypopomus pinnicaudatus*.

La conducta reproductiva de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* se estudió complementariamente en el hábitat natural y el laboratorio. Se identificaron categorías conductuales (espaciales y dinámicas) que permitieron la descomposición de comportamientos complejos en unidades sencillas. Las señales eléctricas propias de la conducta de cortejo incluyeron: la emisión de ráfagas de distintos tipos de chirps emitidos por los machos, interrupciones de la descarga por parte de las hembras y un aumento nocturno de la frecuencia basal de machos y hembras que resultó significativamente mayor que el observado fuera del período reproductivo. Se seleccionaron segmentos de grabación (secuencias) que presentaron un chirp de macho seguido (en menos de 10 s) por una interrupción de hembra. En estas secuencias se destaca la asociación de la emisión de chirps e interrupciones con la ubicación de ambos peces perpendiculares entre sí y con la aproximación del macho hacia la hembra. La ocurrencia de la interrupción de la hembra inmediatamente después de la emisión del chirp del macho resultó estadísticamente significativa, por lo que lo proponemos como uno de los escasos ejemplos de electrocomunicación entre macho y hembra durante el cortejo.

La termosensibilidad de la DOE (disminución de la amplitud de la última fase cabeza-negativa de la DOE por aumento de la temperatura) constituye el efecto más relevante de la temperatura sobre la forma de onda en *Gymnotus carapo* y *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. Se postula que la termosensibilidad de la DOE constituye un nuevo indicador de madurez sexual dado que: a) muestra variaciones estacionales en machos y hembras de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* negativamente correlacionadas con su ciclo reproductivo natural; b) depende de los niveles de hormonas esteroides gonadales (andrógenos) en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y *Gymnotus carapo*; y c) es modulada por manipulación de la temperatura, factor ambiental involucrado en el disparo del período reproductivo en la zona templada, en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y *Gymnotus carapo*. Estos resultados sugieren una interacción entre los efectos de la temperatura y de las hormonas esteroides sobre la forma de onda de la DOE en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y *Gymnotus carapo*. Se postula que el aumento estacional de la temperatura ambiental influye al sistema neuro-endócrino induciendo madurez gonadal y aumento de los niveles de hormonas esteroides, que son responsables de los diferentes indicadores de madurez sexual: dimorfismo sexual morfológico, electrofisiológico y termosensibilidad de la DOE.

El efecto de la activación de la PKA por administración de AMPc sobre la forma de onda de *Stemopygus macrurus* DOE provocó un aumento muy importante (200-400%) de la amplitud de la DOE y un aumento moderado de su duración (25%). Estos datos son consistentes con los hallazgos a nivel celular que constataron un aumento de la amplitud y duración del potencial de acción del electrocito debido al aumento de la magnitud de la corriente de Na<sup>+</sup>. Se postula que el rol funcional de esta modulación de la amplitud de la DOE esté vinculado a variaciones circadianas de la DOE demostradas en especies emparentadas.

---

## ABSTRACT

Gymnotiformes are freshwater electric fish, which are broadly distributed throughout America. Nevertheless, they have been studied as tropical fish, given their great abundance in the tropical zone. This study analyzes Gymnotiformes as inhabitants of the temperate zone, at the southern boundary of their distribution. In this context, the influence of temperature was evaluated as an environmental factor underlying gymnotiform distribution and the onset of their breeding season, and as a modulator of the EOD interacting with gonadal hormone steroids.

Four species of Gymnotiformes were identified in Uruguay. Among them, only *Gymnotus carapo* and *Brachyhyopomus pinnicaudatus* were found in many of the sites explored and presented high relative abundance. This number of species lies well below the number of species detected in the tropical zone (over 100), and it is reasonable to propose that this difference is mainly due to north-south temperature variations. *Gymnotus carapo* inhabits throughout the entire country and is the only species in the S area. *Brachyhyopomus pinnicaudatus* inhabits the northeast region and predominates in the E area. This differential distribution can be partially explained by spatial patterns of pH and conductivity.

A natural population of *Brachyhyopomus pinnicaudatus* was studied throughout the year, and the breeding season was identified from November to January, which coincides with high water temperature and extreme photoperiod. Male EOD dimorphism gradually appears as temperature increases. Acclimation experiments carried out in the laboratory confirmed the hypothesis that the natural increase of water temperature is a trigger of the onset of the breeding season in Gymnotiformes of the temperate zone. Sustained high water temperature was enough to induce sexual maturity in *Brachyhyopomus pinnicaudatus*.

Reproductive behavior of *Brachyhyopomus pinnicaudatus* was studied both in the natural habitat and in the laboratory. The identification of spatial and dynamic behavioral units allowed complex behavior to be broken down into simple units. The electrical displays observed during breeding included: bursts of different kinds of chirps in males, EOD interruptions in females and a nightly increase in basal frequency which was significantly larger than in the non-breeding season. Videoclips (sequences) which had a male chirp followed (less than 10 seconds later) by a female interruption were thoroughly analyzed. In these sequences the emission of the male chirp and female interruption were associated to the postural display of the male and the female in perpendicular position, and to the approach of the male to the female. The occurrence of the interruption immediately after the chirp was statistically significant, and we propose this to be one of the scarce examples of electrocommunication between males and females during courtship.

Temperature sensitivity of the EOD (a decrease in the amplitude of the last head-negative component of the EOD due to increase in water temperature) is the most relevant effect of temperature upon EOD waveform in *Gymnotus carapo* and *Brachyhyopomus pinnicaudatus*. We propose temperature sensitivity as a novel indicator of sexual maturity given that a) it shows seasonal variation in both *Brachyhyopomus pinnicaudatus* males and females, negatively correlated to their reproductive cycle; b) it depends upon hormone levels (androgens) in *Brachyhyopomus pinnicaudatus* and *Gymnotus carapo*; and c) it is modulated by temperature manipulation in *Brachyhyopomus pinnicaudatus* and *Gymnotus carapo*. These results suggest an interaction between the effects of temperature and the effects of gonadal hormones upon EOD waveform in *Gymnotus carapo* and *Brachyhyopomus pinnicaudatus*. We propose that the seasonal increase of environmental temperature affects the neuroendocrine system inducing gonadal maturity and increase of steroid hormone levels. These are responsible, in turn, for the indicators of sexual maturity: morphological and electrophysiological sexual dimorphism and temperature sensitivity of the EOD.

The effect of PKA activation on EOD waveform, by administration of cAMP in *Sternopygus macrurus*, caused a striking increase (200-400%) of EOD amplitude and a moderate increase in duration (25%). These results are consistent with data obtained at the cellular level that showed an increase in the amplitude and duration of the electrocyte action potential in response to the increase of Na<sup>+</sup> current. It is postulated that the functional role of this amplitude modulation is linked to circadian variations of EOD detected in related species.

---

## INTRODUCCION GENERAL

---

Los Gymnotiformes son peces eléctricos americanos que emiten continuamente descargas de baja intensidad del orden de los cientos de milivoltios, salvo la anguila, *Electrophorus electricus*, que también emite descargas potentes. Estas descargas del órgano eléctrico (DOEs) forman parte de una refinada modalidad sensorial denominada sistema de electrorrecepción activa (Lissman 1958). Los peces Gymnotiformes generan campos eléctricos en su entorno acuático que, a su vez, son sentidos por electrorreceptores ubicados en la piel. La presencia en las cercanías del pez de objetos de conductividad eléctrica distinta de la del agua determina cambios en la distribución espacial del campo eléctrico, permitiendo al animal localizar dichos objetos (electrolocalización). Dado que la DOE presenta una forma de onda característica de la especie, el sistema de electrorrecepción activa juega también un rol fundamental en la comunicación entre coespecímenes (reconocimiento intraespecífico, interacciones agresivo-defensivas, cortejo, apareamiento).

El Orden Gymnotiformes constituye un grupo de peces de agua dulce especializados, reconocidos principalmente por la presencia de órganos eléctricos (Mago-Leccia 1994). Estos órganos eléctricos presentan diferentes características y desarrollo según la especie considerada: pueden ser neurogénicos o miogénicos; pueden producir descargas potentes o débiles; sus descargas pueden ser de tipo pulso o de tipo onda. Los Gymnotiformes presentan otros caracteres comunes importantes: cuerpo elongado y comprimido lateralmente (peces cuchillo); aleta anal muy larga que se extiende a lo largo del borde ventral del pez, cuyo movimiento ondulante permite el nado hacia adelante y hacia atrás; ausencia de aletas pélvicas, aleta dorsal y aleta caudal reducidas o ausentes; región preanal corta y ano localizado en una posición anterior.

La DOE está comandada por un núcleo marcapaso ubicado en el bulbo raquídeo, que

controla la secuencia temporal de los intervalos de las DOEs. Un solo impulso de este comando central es transformado en una actividad electromotora compleja distribuida temporal y espacialmente (Bennett 1971, Caputi 1999). El núcleo marcapaso está compuesto por dos tipos de neuronas: las células marcapaso y las células relé (Bennett et al. 1967) que reciben aferencias excitatorias e inhibitorias desde centros superiores (Kawasaki et al. 1988). Las células relé son activadas directamente por las células marcapaso y sus axones descienden por la médula espinal donde excitan a las neuronas electromotoras espinales. Estas, a su vez, inervan a los electrocitos que componen el órgano eléctrico (Dye & Meyers 1986). La forma y propiedades eléctricas de los electrocitos son variables según la especie y pueden variar según la región del órgano eléctrico dentro de una misma especie (Bass 1986).

El Orden Gymnotiformes ha sido relativamente menos estudiado que otros peces ostariophyseos desde el punto de vista taxonómico y ecológico. A pesar de esto, el conocimiento de estos peces data de las primeras descripciones de la ictiofauna sudamericana: Marcgraf (1648, citado en Mago-Leccia 1994) incluye la descripción del primer Gymnotiforme (hoy *Gymnotus carapo*) en su "Historia Naturalis Brasiliae". El conocimiento de la sistemática de estos peces se basa principalmente en el trabajo de Mago-Leccia (1978, 1994). Siguiendo a Mago-Leccia (1994), el Orden Gymnotiformes (Teleostei: Ostariophysii) nuclea 94 especies asignadas a 27 géneros en 6 familias: Rhamphichthyidae, Gymnotidae, Hypopomidae, Electrophoridae, Apterontidae y Sternopygidae. La aparición de especies no descritas y la consideración de nuevos elementos obligan a la revisión constante de los criterios clasificatorios. Recientemente, se han descubierto nuevos géneros y especies, ascendiendo aproximadamente a 110 las especies descritas dentro de este Orden. Asimismo,

varios autores abordaron el estudio filogenético del Orden Gymnotiformes basados en análisis cladísticos que conjugan datos morfológicos, conductuales, fisiológicos, moleculares y provenientes de fósiles (Triques 1993, Gayet et al. 1994, Alves-Gomes et al. 1995). Alves-Gomes (1999) propone un nuevo esquema taxonómico del Orden Gymnotiformes, en el que se describen los siguientes linajes monofiléticos: (Electrophoridae + Gymnotidae), (Rhamphichthyidae + Hypopomidae), (Eigenmanniidae + Apteronotidae), y Sternogygidae.

La mayor parte de los estudios que forman parte de esta tesis se refieren a *Brachyhyopomus pinnicaudatus*, en el cual se determinó la distribución geográfica precisa dentro del territorio uruguayo, se realizó el seguimiento anual de una población natural, se estudió su conducta reproductiva en la Naturaleza y en el laboratorio y se analizó el rol de la temperatura como desencadenante del período reproductivo y sobre la forma de onda de la DOE. Muchos de estos aspectos se estudiaron en forma comparativa en *Gymnotus carapo*, Gymnotiforme de pulso también abundante en Uruguay y que presenta una DOE más compleja. El relevamiento biogeográfico detectó la presencia de otras dos especies de Gymnotiformes poco abundantes: *Eigenmannia virescens* y *Hypopomus* sp. Por último, el estudio de la modulación de la forma de onda de la DOE por activación de la PKA se realizó en *Sternopygus macrurus* durante la pasantía experimental realizada en el laboratorio de Harold Zakon (Co-orientador).

Esta tesis aborda aspectos de la reproducción de Gymnotiformes de pulso de la zona templada con un enfoque neuroetológico que incluye trabajo de campo y de laboratorio complementarios y técnicas de procesamiento diversas (ecológicas, etológicas y electrofisiológicas). Este trabajo se realizó en el Depto. de Neurofisiología del Instituto Clemente Estable e implicó la instalación y puesta a punto de varios de los procedimientos; a saber: muestreos de Gymnotiformes en el campo, montaje de una estación experimental para registros electrofisiológicos en el hábitat natural, registro de imágenes y señales eléctricas en el laboratorio, tratamientos hormonales y aclimatación a temperatura elevada y sostenida.

Uruguay, cuyo territorio pertenece a la zona templada (Conde & Sommaruga 1999), se encuentra en el límite sur de la distribución del Orden Gymnotiformes en América. En estos dos aspectos reside parte del interés y relevancia de este trabajo. Por un lado, no existen hasta la fecha estudios de campo sobre Gymnotiformes realizados en la zona templada. Por otra parte, el hecho de que el Río de la Plata constituya el límite sur de la distribución de Gymnotiformes, hace que el territorio uruguayo sea especialmente atractivo para evaluar la distribución geográfica de las especies residentes y para investigar la importancia del papel de los factores ambientales sobre esa distribución. Estos datos se presentan en el **Capítulo I-A**.

Los ciclos reproductivos de los peces teleósteos en general, y de los Gymnotiformes en particular, dependen de ritmos endógenos modulados por factores ambientales (Baggerman 1980). Dada la amplia distribución del Orden Gymnotiformes en América, son varios los factores ambientales involucrados en el desencadenamiento del período reproductivo. En la región tropical, la mayoría de las especies de Gymnotiformes estudiadas responden al aumento de los niveles del agua y disminución concomitante de la conductividad eléctrica, propios de la estación lluviosa (Kirschbaum 1975, 2000). Las claves ambientales necesariamente diferentes que modulan los ciclos reproductivos en Gymnotiformes de la zona templada no se han estudiado previamente. Este trabajo evalúa el rol de la temperatura del agua como factor temporizador del ciclo reproductivo mediante dos abordajes diferentes: a) la correlación de las variaciones estacionales de la temperatura propias del clima templado con la identificación del período reproductivo en una población de Gymnotiformes y con indicadores de diferenciación sexual; y b) la inducción de diferenciación sexual por manipulación experimental de la temperatura en el laboratorio. Estos resultados se presentan en los **Capítulos I-B, y III-A**.

La conducta reproductiva en Gymnotiformes comprende despliegues locomotores y eléctricos, que no han sido descritos hasta el momento en especies de pulso. Las modulaciones de la DOE propias del período reproductivo comprenden modificaciones de la forma de onda (dimorfismo sexual) y la generación de señales eléctricas específicas, que son modulaciones del ritmo de descarga

de la DOE que participan en el cortejo y apareamiento (Hopkins 1974a, 1974b, Hagedorn & Carr 1985, Hagedorn & Heiligenberg 1985, Hagedorn 1988, Kawasaki & Heiligenberg 1989, Hopkins et al. 1990, Hopkins 1991, Zakon et al. 1991). En el **Capítulo II.** se abordó el estudio de los despliegues posturales, locomotores y eléctricos de la conducta reproductiva de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* complementando datos obtenidos en el hábitat natural y en el laboratorio. Se intentó demostrar la asociación de despliegues eléctricos y locomotores durante el cortejo y evidencias de electrocomunicación entre los sexos.

Además de su rol como factor ambiental, la temperatura actúa como parámetro físico sobre diversas propiedades del sistema nervioso poniendo a prueba la capacidad del individuo de mantener la coordinación sensorio-motora. La temperatura modifica la forma de onda de la DOE en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y *Gymnotus carapo*. En el **Capítulo III-B.** se caracteriza la termosensibilidad de la DOE, se estudian sus variaciones estacionales correlacionadas con las variaciones estacionales de temperatura, y su modulación en el laboratorio por tratamiento hormonal y por aclimatación a temperatura elevada sostenida.

La termosensibilidad de la DOE pone en evidencia la existencia de mecanismos plásticos que modulan la forma de onda de la DOE cuyas bases celulares y subcelulares han sido poco exploradas hasta el presente. Varios estudios demostraron otros cambios plásticos de la amplitud de la DOE en diversas especies y contextos comportamentales (Hagedorn & Heiligenberg 1985, Hagedorn & Zelick 1989, Hagedorn 1995, Franchina & Stoddard 1998, Franchina et al. 2001). La búsqueda de abordajes experimentales para el estudio de mecanismos subyacentes a la modulación de la forma de onda de la DOE incluyó una pasantía de entrenamiento realizada en el laboratorio de Harold Zakon (Co-orientador) en la Universidad de Texas en Austin durante el mes de noviembre de 2000. En el **Capítulo IV.** se presentan los resultados obtenidos en esta pasantía, en la que se evaluó el efecto de la activación de la PKA sobre la forma de onda de *Stenopygus macrurus*.

El contenido de este trabajo de tesis se organiza en capítulos y subcapítulos como se indica a continuación. En primer lugar, se presentan los resultados provenientes del estudio de campo que aportan un marco biogeográfico y ecológico introductorio (**Capítulo I.**). El estudio del período reproductivo en Gymnotiformes de la zona templada incluye dos aspectos complementarios que se presentan en los capítulos principales de esta tesis: por un lado la caracterización de la conducta de cortejo (**Capítulo II.**); y por otro lado la evaluación de los efectos de la temperatura como factor ambiental temporizador del período reproductivo, y como factor físico sobre la forma de onda de la DOE (**Capítulo III.**). Por último, se presentan en el **Capítulo IV.** los datos obtenidos en el laboratorio de Harold Zakon sobre el efecto del AMPc sobre la forma de onda en *Stenopygus*.

**CAPITULO I.** Estudios de campo en Gymnotiformes de Uruguay

**I-A.** Distribución biogeográfica

**I-B.** Ciclo anual de una población de *Brachyhypopomus pinnicaudatus*

**CAPITULO II.** Despliegues locomotores y eléctricos de cortejo en *Brachyhypopomus pinnicaudatus*

**CAPITULO III.** Influencias hormonales y ambientales sobre la forma de onda de la DOE en Gymnotiformes

**III-A.** La temperatura como factor ambiental temporizador del período reproductivo en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* de la zona templada

**III-B.** Termosensibilidad de la DOE en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y *Gymnotus carapo*

**CAPITULO IV.** Modulación de la amplitud de la DOE por AMPc en *Stenopygus macrurus*

## BIBLIOGRAFIA

- Alves-Gomes JA, Ortí G, Haygood M, Heiligenberg W, Meyer A. 1995. Phylogenetic analysis of the South American electric fishes (order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: a synthesis based on morphology, electrophysiology and mitochondrial sequence data. *Mol Biol Evol* 12: 298-318.
- Alves-Gomes JA. 1999. Systematic biology of gymnotiform and mormyriiform electric fishes: phylogenetic relationships, molecular clocks and rates of evolution in the mitochondrial rRNA genes. *J Exp Biol* 202: 1167-1183.

- Baggerman B. 1980. Photoperiodic and endogenous control of the annual reproductive cycle in teleost fishes. En: Ali MA (ed) Environmental physiology of fishes. Plenum Press. New York: 553-568.
- Bass 1986. Electric organs revisited: evolution of a vertebrate communication and orientation organ. En: Bullock T, Heiligenberg W (eds) Electroreception. Wiley. New York: 19-100.
- Bennett M, Pappas G, Gimenez M, Nakajima Y. 1967. Physiology and ultrastructure of electrotonic junctions. IV. Medullary electromotor nuclei in gymnotid fish. J Neurophysiol 30: 236-300.
- Bennet M. 1971. Electroreception. En: Hoar W, Randall D (eds) Fish Physiology. Academic Press. New York: 493-574.
- Caputi A. 1999. The electric organ discharge of pulse gymnotiforms: the transformation of a simple impulse into a complex spatio-temporal electromotor pattern. J Exp Biol 202: 1229-1241.
- Conde D, Sommaruga R. 1999. A review of the state of Limnology in Uruguay. En: Wetzel RG, Gopal B (eds) Limnology in developing countries. Vol. 2. International Association for Limnology (SIL), International Scientific Publications. New Delhi: 1-31.
- Dye J, Meyers J. 1986. Central control of the electric organ discharge in weakly electric fish. En: Bullock T, Heiligenberg W (eds) Electroreception. Wiley. New York: 71-102.
- Franchina CR, Stoddard PK. 1998. Plasticity of the electric organ discharge waveform of the electric fish *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. I. Quantification of day-night changes. J Comp Physiol A 183: 759-768.
- Franchina C, Salazar V, Volmar GH, Stoddard P. 2001. Plasticity of the electric organ discharge waveform of male *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. II. Social effects. J Comp Physiol A 187: 45-52.
- Gayet M, Meunier FJ, Kirschbaum F. 1994. *Ellisella kirschbaumi* Gayet and Meunier, 1991, gymnotiforme fossile de Bolivie et ses relations phylogénétiques au sien des formes actuelles. Cybium 18:273-306.
- Hagedorn M, Carr C. 1985. Single electrocytes produce a sexually dimorphic signal in South American electric fish, *Hypopomus occidentalis* (gymnotiformes, Hypopomidae). J Comp Physiol A 156: 511-523.
- Hagedorn M, Heiligenberg W. 1985. Court and spark: electric signals in the courtship and mating of gymnotoid fish. Anim Behav 33: 254-265.
- Hagedorn M. 1988. Ecology and behavior of a pulse-type electric fish *Hypopomus occidentalis* (Gymnotiformes, Hypopomidae) in a fresh-water stream in Panama. Copeia 2: 324-335.
- Hagedorn M, Zelick R. 1989. Relative dominance among males is expressed in the electric organ discharge characteristics of a weakly electric fish. Anim Behav 38: 520-525.
- Hagedorn M. 1995. The electric fish *Hypopomus occidentalis* can rapidly modulate the amplitude and duration of its electric organ discharges. Anim Behav 49: 1409-1413.
- Hopkins CD. 1974a. Electric communication: functions in the social behavior of *Eigenmannia virescens*. Behaviour 50: 270-305.
- Hopkins CD. 1974b. Electric communication in the reproductive behavior of *Sternopygus macrurus* (Gymnotoidei). Z Tierpsychol 35: 518-535.
- Hopkins CD, Comfort NC, Bastian J, Bass AH. 1990. Functional analysis of sexual dimorphism in an electric fish, *Hypopomus pinnicaudatus*, Order Gymnotiformes. Brain Behav Evol 35: 350-367.
- Hopkins CD. 1991. *Hypopomus pinnicaudatus* (Hypopomidae) a new species of gymnotiform fish from French Guiana. Copeia 1: 151-161.
- Kawasaki M, Maler L, Rose GJ, and Heiligenberg W (1988) Anatomical and functional organization of the prepacemaker nucleus in gymnotiform electric fish: the accommodation of two behaviors in one nucleus. J Comp Neurol 276: 113-131.
- Kawasaki M, Heiligenberg W. 1989. Distinct mechanisms of modulation in a neuronal oscillator generate different signals in the electric fish *Hypopomus*. J Comp Physiol A 165: 731-741.
- Kirschbaum F. 1975. Environmental factors control the periodical reproduction of tropical electric fish. Experientia 31: 1159-1160.
- Kirschbaum F. 2000. The breeding of tropical freshwater fishes through experimental variation of exogenous parameters. Aqua Geographia 20: 95-105.
- Lissman H. 1958. On the function and evolution of electric organs in fish. J Exp Biol 35: 415-486.
- Mago-Leccia F. 1978. Los peces de la familia Stenopygidae de Venezuela. Acta Cient Venez 29: 1-89.
- Mago-Leccia F. 1994. Electric fishes of the continental waters of America.: Clemente Editores. Caracas: 206 pp.
- Triques ML. 1993. Filogenia dos generos de gymnotiformes (Acyinopterygii, Ostariophysii), com base em caracteres esqueleticos. Comun Mus Cienc PUCRS, Serie Zool 6: 85-130.
- Zakon HH, Thomas P, Yan HY. 1991. Electric organ discharge frequency and plasma steroid levels during gonadal recrudescence in a natural population of the weakly electric fish *Sternopygus macrurus*. J Comp Physiol A 169: 493-499.

---

## CAPITULO I

### Estudios de campo en Gymnotiformes de Uruguay

---

El conocimiento de la biogeografía y ecoetología de los Gymnotiformes es parcial y los estudios en poblaciones naturales han sido escasos y realizados principalmente en la zona tropical. En Uruguay, los hábitats naturales de Gymnotiformes son accesibles y se encuentran entre 100 y 500 km del laboratorio lo cual permitió realizar sobre ellos un estudio anual sistemático. En este capítulo se presentan datos de biogeografía y aspectos reproductivos de Gymnotiformes autóctonos. Este estudio se llevó a cabo como forma de enmarcar sólidamente nuestros estudios sobre conducta reproductiva y efectos de la temperatura ambiental sobre la fisiología reproductiva de estos peces. Los datos presentados son pioneros en el análisis de la biogeografía de los Gymnotiformes del clima templado. Dado que este trabajo se realizó en un territorio frontera de distribución, analiza las claves ambientales y/o climatológicas responsables de la presencia de Gymnotiformes en las aguas dulces americanas.

Este trabajo de campo se organizó sobre la base de dos enfoques complementarios. El

primer abordaje fue extensivo y se propuso la exploración de cursos de agua dulce del territorio uruguayo con el fin de determinar la distribución geográfica de los Gymnotiformes y su asociación con algunos factores ambientales. Estos datos se presentan en el **Capítulo I-A**. Distribución geográfica. En el segundo abordaje se seleccionó un curso de agua y se analizaron en él las variaciones estacionales de la estructura de una población de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* con el fin de identificar la ocurrencia del período reproductivo. Estos datos se presentan en el **Capítulo I-B**. Ciclo anual de una población de *Brachyhypopomus pinnicaudatus*.

Los datos presentados en este capítulo son el resultado de 4 años de trabajo de campo y se organizaron en un manuscrito titulado: "Biogeography and breeding in Gymnotiformes from Uruguay" de los autores Silva A, Quintana L, Galeano M y Errandonea P, que fue enviado para su publicación en la revista *Environmental Biology of Fishes* y se encuentra actualmente aceptado provisionalmente.

---

#### I-A. Distribución biogeográfica

##### ANTECEDENTES

Los Gymnotiformes habitan en una vasta región del continente americano que se extiende desde la Provincia de Chiapas, México en el norte hasta la cuenca del Río de la Plata en el sur (Vaz Ferreira 1969, Vilano & Balderas 1987). Sólo cuatro especies de Gymnotiformes se encuentran en todo (o prácticamente todo) este amplio territorio: *Gymnotus carapo*, *Eigenmannia virescens*, *Apteronotus albifrons* y *Stemopygus macrurus* (Kirschbaum 1995). Dentro de América del Sur, se han reportado Gymnotiformes en las ocho regiones de

ictiofauna definidas por Eigenmann (Géry 1969). El patrón principal de distribución del Orden Gymnotiformes sigue las líneas generales de la distribución de peces continentales en Sudamérica propuestas por Darlington (1957): su diversidad y abundancia es máxima en la cuenca del Amazonas, decrece gradualmente hacia el norte y sur, aumenta relativamente en la cuenca del sistema La Plata-Uruguay-Paraná-Paraguay, y desaparece en el sur del continente. El análisis comparativo de poblaciones adaptadas a diferentes regiones de ictiofauna puede aportar a la comprensión de los mecanismos evolutivos determinantes de la actual diversidad y distribución del Orden.

Existen varios reportes sobre distribución y abundancia de Gymnotiformes en grandes ríos y pequeños cursos de agua de la zona tropical. Kramer et al. (1981) colectaron más de 40 especies de Gymnotiformes en el Río Solimões (Amazonas) cerca de la ciudad de Manaus; en tanto Goulding et al. (1988) documentaron la presencia de 36 especies en el Río Negro; y Marrero & Taphorn (1991) reportaron que el 86% (11197 especímenes) de los peces colectados en el Río Orinoco son Gymnotiformes. Algunos aspectos ecológicos se han estudiado con mayor detalle aunque aisladamente en pequeños arroyos y lagunas (Schwassmann 1976, Hopkins & Heiligenberg 1978, Hagedorn 1988, Westby 1988).

Las diferencias en diversidad y abundancia de Gymnotiformes en distintas regiones también dependen de características del hábitat relacionadas con aspectos geológicos, variaciones estacionales, factores limnológicos, vegetación, disponibilidad de alimentos, presencia de predadores, etc. (Kirschbaum 1995). Los Gymnotiformes habitan en casi todos los biotopos de las aguas dulces continentales sudamericanas. Algunas especies presentan exigencias estrictas y, por lo tanto, requieren de hábitats con características precisas: por ejemplo *Gymnorhamphichthys hypostomus* vive exclusivamente enterrado en la arena del fondo de pequeños cursos de agua (Hagedorn 1986). Otras especies toleran condiciones muy variables, y una misma especie puede encontrarse en arroyos, esteros, pantanos, ensenadas, restos de troncos y raíces o bancos de arena orilleros, aguas profundas o someras, cursos de agua cubiertos por una densa vegetación superficial o aguas claras, etc. Además de estas adaptaciones, un mismo hábitat puede sufrir importantes variaciones estacionales debidas, por ejemplo a la alternancia de las estaciones seca y lluviosa. Los Gymnotiformes, estudiados siempre dentro de la zona tropical, toleran amplios rangos de temperatura (20-35 °C), pH (4-7), conductividad eléctrica (10 a varios miles  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) y contenido de oxígeno del agua (Kirschbaum 1995).

En Uruguay (30-35 °S, 54-58 °O), que se encuentra al sur de la región de ictiofauna del Paraná, los Gymnotiformes se han adaptado al clima templado. Las descripciones clásicas de la ictiofauna uruguaya incluyen varias especies de Gymnotiformes reportadas a

partir de búsquedas no sistemáticas (Devincenzi & Barattini 1928, Vaz Ferreira 1969). La recopilación personal de peces de agua dulce de Uruguay realizada por Hebert Nion (Instituto Nacional de Pesca, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca) incluye las siguientes especies de Gymnotiformes: *Gymnotus carapo*, *Hypopomus brevirostris*, *Eigenmannia virescens*, *Apteronotus leptorhynchus*, *Rhamphichthys rostratus* y *Rhamphichthys marmoratus*

## OBJETIVOS

Se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Confirmar la presencia de las especies de Gymnotiformes previamente reportadas en Uruguay.
- Determinar la distribución geográfica de dichas especies.
- Evaluar la variación geográfica de conductividad eléctrica y pH del agua y su relación con la distribución de Gymnotiformes.
- Evaluar las variaciones diarias y estacionales de la temperatura del agua.
- Caracterizar el hábitat típico de los Gymnotiformes en Uruguay.

## MÉTODOS

### *Muestreo de Gymnotiformes*

El territorio uruguayo fue dividido para su exploración sistemática en tres áreas definidas en base a las cinco cuencas descritas por Conde & Sommaruga (1999) como se muestra en la Fig. 13: a) área del estuario del Río de la Plata (S), que incluye tributarios directos del Río de la Plata en la región más austral del país; b) área del Río Uruguay (W), que comprende tributarios directos del Río Uruguay y a la subcuenca del Río Negro y ocupa la región noroeste del país; y c) área de las lagunas costeras (E), en donde se destaca la cuenca de la laguna Merín al este del país.

El muestreo se diseñó para obtener estimaciones relativas de las poblaciones de Gymnotiformes. Es decir, se obtuvieron estimaciones en las que el tamaño de la población se midió en unidades arbitrarias y no se intentó la determinación del tamaño real de la población. La ventaja de los estimadores relativos sobre los absolutos se evidencia en el requerimiento de esfuerzo de

muestreo. El método de muestreo utilizado fue "time-based", es decir que se fijó un tiempo estándar en el cual se realizaron las colectas. Esta metodología permitió obtener un índice de la abundancia relativa de los peces en términos de captura por unidad de esfuerzo (CPUE). El tiempo estándar de colecta (o esfuerzo total), en todos los sitios y a lo largo del año, fue fijado en 45 minutos. Para obtener la CPUE se estandarizaron los datos a 1 hora, por lo cual la CPUE está expresada en número de peces por hora (peces  $hs^{-1}$ , Perrow et al. 1996, Calow 1998). Se definieron como sitios de abundancia alta en Gymnotiformes (sitios AAR) aquellos en que la abundancia relativa fue mayor de 13 peces  $hs^{-1}$ .

Se muestrearon 207 sitios de cursos de agua diversos (ríos, arroyos, cañadas, esteros, bañados, canales y zonas litorales de lagos y lagunas) en su intersección con rutas y caminos en el transcurso de dos años consecutivos. Todos los sitios estudiados eran someros ( $z < 1$  m) y fueron explorados por vadeo en una extensión máxima de 100 m. El muestreo fue realizado simultáneamente por dos equipos en cada sitio.

En cada sitio explorado: a) se determinó su ubicación geográfica precisa; b) se midieron los siguientes parámetros físico-químicos del medio acuático: temperatura (termómetro digital Lutron TM-915) conductividad eléctrica (conductímetro Cole Parmer TDSu Testr 3) y pH (pHímetro Cole Parmer Testr2); y c) se colectaron peces. La temperatura se midió en tres réplicas por sitio. Las variaciones diarias de la temperatura se midieron en el Arroyo Cuaró (área W) en 2 períodos de 48 hs durante el mes de diciembre.

La detección de los peces se llevó a cabo aprovechando su capacidad electrogeneradora y sus hábitos nocturnos. Es decir, los peces se muestrearon durante el día cuando están en reposo ocultos en sus refugios. El muestreo fue realizado con la ayuda de un detector de peces por equipo. El detector de peces es un dispositivo portátil que permite registrar a partir de dos electrodos la señal eléctrica generada por estos peces conectándola a un amplificador, cuya salida se conecta a un parlante. La presencia de un pez se detecta por una señal sonora que es audible hasta 1 m alrededor del animal y que aumenta de intensidad a medida que los electrodos se acercan al sitio de refugio del pez. Una vez identificada precisamente su ubicación, el pez se captura por medio de una red de bordes resistentes.

#### Clasificación de peces

La identificación de las distintas especies de Gymnotiformes colectados se realizó tomando en cuenta claves morfológicas y electrofisiológicas. La sistemática de este grupo no está aclarada completamente aún debido en parte a la constante descripción de nuevas especies. La identificación de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* se basó en

los lineamientos establecidos por Hopkins (1991), en tanto la identificación de *Gymnotus carapo* y *Eigenmannia virescens* se basó en el catálogo de Mago-Leccia (1994). Se identificó tentativamente como *Hypopomus sp.* a una especie no descrita previamente (Hopkins, comunicación personal). Se depositaron ejemplares de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y *Hypopomus sp.* en la Colección Ictiológica de la Universidad de Cornell, USA (CU77186-87 y CU77188-89, respectivamente).

#### Registro de la DOE

Se obtuvieron registros cabeza-cola de la DOE a una temperatura estándar de 20 °C siguiendo los procedimientos descritos en Caputi et al. (1998), Silva et al. (1999) y Ardanaz et al. (2001). Se colocó el pez en un cilindro fenestrado de plástico de 3 cm de diámetro cuyo largo se adapta a la longitud del pez y este tubo se sumergió en un recipiente de mayores dimensiones (50x40x20 cm). Se colocaron dos electrodos de Nichrome en los extremos de dicho tubo que se conectaron a un amplificador de alta impedancia de entrada ( $G\Omega$ ), cuya salida se conectó a un osciloscopio digital. Los datos se almacenaron en cinta magnética y se ingresaron en una computadora para su posterior análisis. Las señales se adquirieron y procesaron utilizando un software especialmente diseñado en nuestro laboratorio.

#### Estadística

Los sitios explorados se ubicaron a lo largo de un gradiente en base a la abundancia relativa de las especies que los componen utilizando el Análisis de Componentes Principales (técnica matemática multivariada que resume la variación con finalidad descriptiva). Las abundancias relativas de *Gymnotus carapo* y *Brachyhypopomus pinnicaudatus* se correlacionaron con la conductividad y el pH a través del coeficiente de correlación simple por rangos de Spearman. Se aplicó la técnica de Regresión Múltiple que estudia la relación estocástica cuantitativa entre una variable de interés, en nuestro caso las abundancias relativas de *Brachyhypopomus pinnicaudatus*, y un conjunto de variables explicativas, que son el pH y la conductividad. El coeficiente de determinación mide la bondad del ajuste de la recta de regresión a la nube de observaciones.

## RESULTADOS

#### Hábitat

Se exploraron 207 sitios y se detectó la presencia de Gymnotiformes en 128 de ellos (62%). Se confirmó que estos peces habitan en cursos de agua muy diversos: se hallaron en ríos, arroyos, cañadas, lagunas, esteros, bañados e incluso en canales



**Figura 11.** Cursos de agua identificados como sitios de abundancia relativa alta en Gymnotiformes de las tres áreas en las que se dividió el territorio uruguayo (S, W, y E).

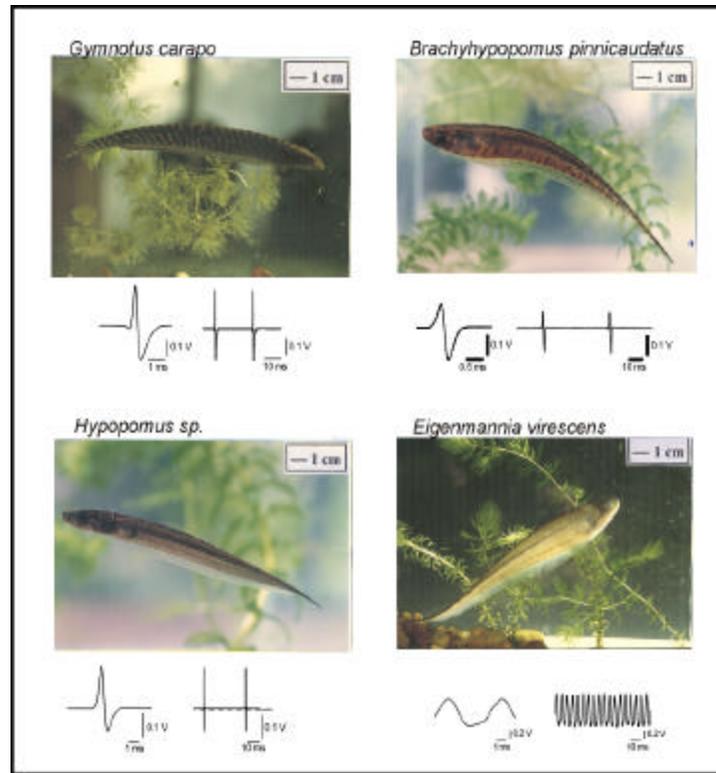
artificiales de riego de cultivos de arroz y cunetas. Sin embargo, a partir del análisis de los sitios en los que se demostró una abundancia relativa alta de Gymnotiformes (sitios AAR), se identificó el hábitat más característico de estos peces (Fig. 11). Todos los sitios AAR ( $n=28$ ) presentaron abundante vegetación acuática superficial y la mayoría de ellos correspondieron a lagunas o ensenadas con aguas turbias y quietas. En cambio, en aguas corrientes y claras, los Gymnotiformes resultaron poco abundantes y fueron hallados frecuentemente en túneles profundos de barrancos o enterrados en el fondo. En cursos de agua de lecho rocoso, el agua siempre era clara y los peces (poco abundantes) se refugiaban entre las piedras del fondo o entre los restos de raíces y hojas en la superficie.

Los cursos de agua explorados presentan distintos tipos de vegetación acuática organizada en pequeños parches aislados o en extensos y densos entramados. Las macrófitas flotantes (por ejemplo: *Azolla spp.*,

*Eichornia crassipes*, *Pistia stratiotes*, *Salvinia spp.*) predominaron en aguas quietas y profundas (> 50 cm). Las macrófitas emergentes (por ejemplo: *Ludwigia peploides*, *Typha sp.*, *Scirpus sp.*) y sumergidas (por ejemplo: *Chabomba sp.*, *Potamogeton sp.*) fueron observadas más frecuentemente en sitios de agua corriente someros (< 50 cm).

#### Distribución de Gymnotiformes

Se colectaron 4 especies de Gymnotiformes durante la exploración sistemática del territorio uruguayo realizada en este estudio (Fig. 1-2): *Gymnotus carapo*, *Brachyhypopomus pinnicaudatus*, *Hypopomus sp.* y *Eigenmannia virescens*. *Hypopomus sp.* corresponde a una especie, y probablemente a un género, no descritos hasta el momento. *Gymnotus carapo*, *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y *Hypopomus sp.* son especies que descargan en pulsos a una frecuencia aproximada de 40 Hz, 20 Hz y 35 Hz a 20 ° C, respectivamente.



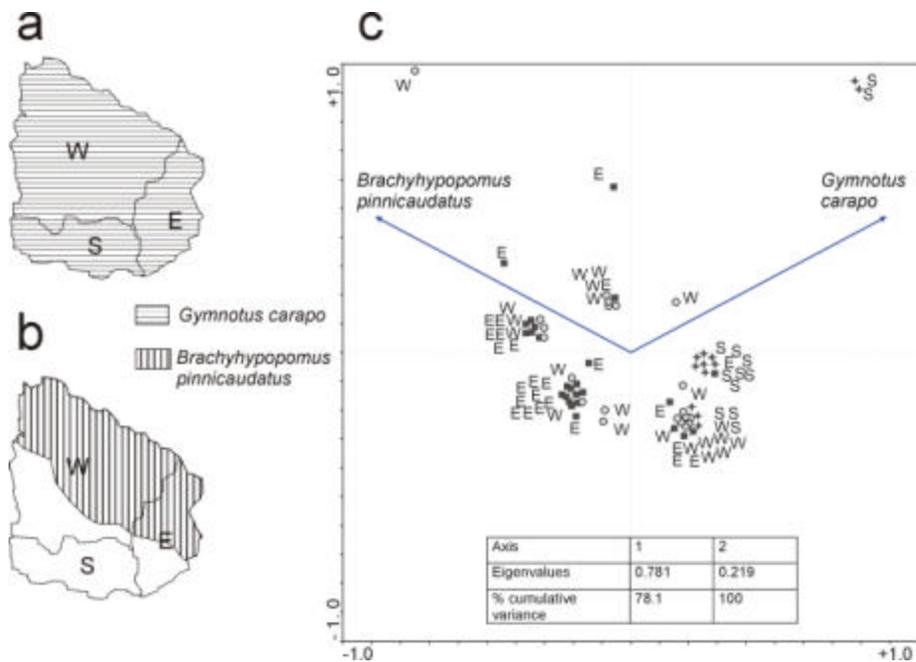
**Figura 12.** Especies de Gymnotiformes identificadas durante la exploración sistemática del territorio uruguayo. Para cada una de ellas se representa su DOE específica registrada a 20 °C a dos escalas temporales para destacar la forma de onda y el ritmo de descarga.

La forma de onda de estas descargas en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y *Hypopomus sp.* es bifásica, mientras que en *Gymnotus carapo* es trifásica (Fig. 1-2). *Eigenmannia virescens* emite una descarga casi sinusoidal con una frecuencia aproximada de 250 Hz a 20 °C (Fig. 1-2).

*Gymnotus carapo* fue hallado en 92 sitios uniformemente distribuidos en el territorio uruguayo como se muestra en la Fig. 1-3a. Fue detectado en las tres áreas; es decir, en tributarios directos e indirectos del Río Uruguay (W), Río de la Plata (S) y de las lagunas costeras (E). *Brachyhypopomus pinnicaudatus* se encontró en 53 sitios del noreste del país (áreas W y E, Fig. 1-3b). No se detectaron ejemplares de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* en tributarios directos del Río de la Plata, es decir, en la zona más austral del país que coincide con el límite sur de la distribución de Gymnotiformes en América. *Eigenmannia virescens* y *Hypopomus sp.* sólo fueron encontrados en 3 y 4 cursos de agua, respectivamente; aunque fueron

sistemáticamente identificados en estos mismos sitios en exploraciones sucesivas. Estos escasos datos impiden determinar con precisión la distribución de estas dos últimas especies en Uruguay. Aparentemente, *Hypopomus sp.* comparte la misma distribución geográfica que *Brachyhypopomus pinnicaudatus*, ya que fue encontrado en la zona noreste del país; mientras que *Eigenmannia virescens* sólo fue detectado en el norte del territorio uruguayo.

La distribución diferencial de *Gymnotus carapo* y *Brachyhypopomus pinnicaudatus* fue evaluada por medio del análisis de componentes principales (ACP) de sus abundancias relativas en sitios AAR. La gráfica de la Fig. 1-3c indica que: a) sitios AAR de las tres áreas (S,W y E) fueron afectados por la presencia de *Gymnotus carapo*; b) sitios AAR del área W y la mayoría de los sitios AAR del área E se caracterizaron por la presencia de *Brachyhypopomus pinnicaudatus*; y c) la abundancia relativa de ambas especies varía en forma inversa de



**Figura 13.** Distribución geográfica de *Gymnotus carapo* y *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. **a.** *Gymnotus carapo* habita en las tres áreas: S (área del estuario del Río de la Plata, W (área del río Uruguay), y E (área de las lagunas costeras). **b.** *Brachyhypopomus pinnicaudatus* habita en las áreas W y E. **c:** Gráfica del Análisis de Componentes Principales: los sitios del área S (●) están exclusivamente influenciados por la presencia de *Gymnotus carapo*; los sitios del área W (○) están igualmente influenciados por la presencia de *Gymnotus carapo* y *Brachyhypopomus pinnicaudatus*; los sitios del área E (■) están principalmente influenciados por la presencia de *Brachyhypopomus pinnicaudatus*.

acuerdo con el sentido de las flechas en el diagrama.

En muchos casos, *Gymnotus carapo* y *Brachyhypopomus pinnicaudatus* compartían exactamente la misma ubicación en el hábitat natural. Se encontraron ejemplares de ambas especies separados 10 cm entre sí debajo de la misma planta acuática. En otros casos, por ejemplo en el arroyo Tres Cruces (área W) se colectaron individuos de las 4 especies de Gymnotiformes. En este curso de agua, se observó cierta distribución espacial diferencial entre las especies: *Eigenmannia virescens* fue detectado en aguas profundas y quietas, mientras que *Hypopomus sp.* en sectores someros de aguas corrientes.

#### Conductividad, pH y su asociación con la distribución de Gymnotiformes

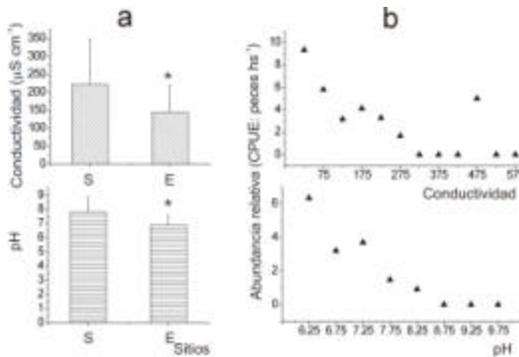
Dado que la distribución geográfica diferencial de las dos especies principales de Gymnotiformes se hace evidente en las áreas S y E (el área S presenta sólo *Gymnotus carapo* y en el área E predomina *Brachyhypopomus pinnicaudatus*), se analizaron algunos parámetros de la

composición química del agua en esas áreas. La conductividad eléctrica y pH de los distintos cursos de agua presentaron un patrón espacial diferencial en el territorio uruguayo. Se analizaron los valores de conductividad y pH medidos en los sitios del área E (n=60) y del área S (n=27), que resultaron ser significativamente distintos entre sí (test de t,  $p < 0.05$ ). Como se muestra en la Fig. 14a, la conductividad y pH medidos en los sitios del área S fueron mayores que los respectivos valores obtenidos en sitios del área E. La conductividad (promedio  $\pm$  desvío estándar) en el área S fue de  $222.4 \pm 127.2 \mu\text{S cm}^{-1}$  y en el área E de  $144.8 \pm 74.0 \mu\text{S cm}^{-1}$ , mientras que el pH del área S fue de  $7.8 \pm 1.0$  y del área E fue de  $6.9 \pm 0.6$ .

Los valores de conductividad y pH de los sitios en los que se detectó la presencia de *Gymnotus carapo* resultaron significativamente mayores que los valores respectivos medidos en los sitios en los que se detectó *Brachyhypopomus pinnicaudatus* (test de t,  $p < 0.01$ ). La conductividad de los sitios que presentaron *Gymnotus carapo* fue en promedio  $231.2 \pm 146.5 \mu\text{S cm}^{-1}$  y el pH de  $7.35 \pm 0.7$ . La conductividad de los sitios

que presentaron *Brachyhypopomus pinnicaudatus* fue  $139.25 \pm 81.3 \mu\text{S cm}^{-1}$  y el pH de  $7.0 \pm 0.6$ . Asimismo, los rangos de conductividad y pH registrados en los sitios que presentaron *Gymnotus carapo* (20-635  $\mu\text{S cm}^{-1}$  y 6-8.8, respectivamente) fueron más amplios que los observados en sitios con *Brachyhypopomus pinnicaudatus* (30-470  $\mu\text{S cm}^{-1}$  y 5.8-8.2, respectivamente).

Se evaluó la relación entre la abundancia relativa de *Gymnotus carapo* y *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y los factores conductividad y pH del medio acuático. Como se muestra en la Fig. 14b, la abundancia relativa de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* decrece a medida que aumentan la conductividad y el pH. Esta correlación negativa resultó altamente significativa (test de correlación de rangos de Spearman, conductividad:  $r_s = -0.37$ ; pH:  $r_s = 0.27$ ;  $p < 0.001$ ). *Gymnotus carapo*, en cambio, no mostró correlación alguna con estos factores ambientales.



**Figura 14.** Conductividad y pH del agua en sitios explorados. **a.** Diagrama de barras de la conductividad (gráfica superior) y pH (gráfica inferior) medidos en sitios del área S y E. Ambos parámetros alcanzan valores significativamente superiores en el área S que en el área E (\*, test de t,  $p < 0.05$ ). **b.** Abundancia relativa de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* (CPUE, peces  $\text{hs}^{-1}$ ) promedio en todos los sitios explorados en función de la conductividad (gráfica superior) y pH (gráfica inferior). La abundancia relativa de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* está correlacionada negativamente con la conductividad y el pH ( $r_s = -0.37$  y  $-0.27$ , respectivamente;  $p < 0.001$ ).

Dados estos resultados, se analizó la contribución de la conductividad y el pH en las diferencias espaciales de abundancia relativa de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* por medio de una regresión múltiple. La conductividad y el pH explican en forma significativa el 9.4% de la variación observada ( $r^2 = 0.094$ ,  $f = 10.45$ ,  $df = 2,2$ ,

$p < 0.001$ ), siendo el  $\beta$  de la conductividad y del pH  $-0.16$  y  $-0.23$ , respectivamente.

#### Variaciones estacionales y diarias de la temperatura

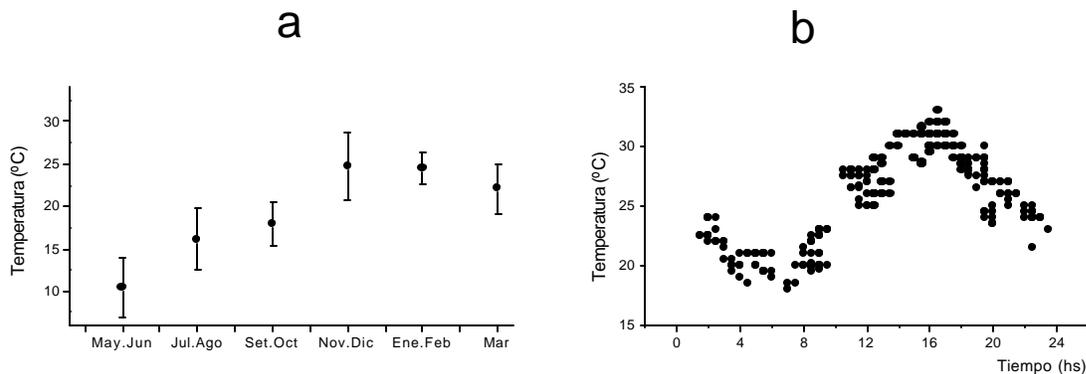
*Gymnotus carapo* y *Brachyhypopomus pinnicaudatus* fueron encontrados en cursos de agua que exhibieron importantes variaciones de temperatura. A lo largo del año, ambas especies fueron detectadas en aguas cuyas temperaturas variaron entre valores inferiores a  $10^\circ\text{C}$  y superiores a  $30^\circ\text{C}$ . Las variaciones estacionales de la temperatura de los sitios explorados se muestran en la Fig. 1-5a. Los valores observados fueron de  $10.41 \pm 3.48^\circ\text{C}$  en mayo-junio a  $24.68 \pm 3.91^\circ\text{C}$  en noviembre-diciembre. Las variaciones diarias de la temperatura fueron evaluadas en el arroyo Cuaró Grande (área W, Fig. 1-5b) durante el período reproductivo. En este hábitat reproductivo somero se observaron importantes fluctuaciones diarias de la temperatura del agua desde  $18^\circ\text{C}$  a las 7:00 hs hasta  $33^\circ\text{C}$  a las 16:00 hs.

## DISCUSION

Este estudio constituye la primer exploración extensa y sistemática de Gymnotiformes en Uruguay cuyo territorio se encuentra en la zona templada (Conde & Sommaruga 1999) y corresponde al límite sur de la distribución del Orden en América. Si bien la amplia distribución geográfica de los Gymnotiformes es bien conocida y aceptada (Vaz Ferreira 1969, Vilano & Balderas 1987, Kirschbaum 1995), todos los estudios de campo referentes a su diversidad, abundancia de especies, caracterización del hábitat y aspectos ecológicos se han realizado en la zona tropical (Schwassmann 1976, Hopkins & Heiligenberg 1978, Kramer et al. 1981, Hagedorn 1986, 1988, Westby 1988, Goulding et al. 1988, Marrero & Taphorn 1991). Por lo tanto, hasta la fecha, no se han analizado las condiciones ambientales necesariamente diferentes que deben enfrentar estos peces en su adaptación al clima templado. La exploración en uno de los límites de la distribución y la comparación de las variaciones ambientales con la distribución de abundancias relativas pueden contribuir a identificar las bases físicas que gobiernan la distribución geográfica de estos peces.

Este estudio permitió confirmar la presencia de cuatro especies de Gymnotiformes habitando el territorio uruguayo: *Gymnotus carapo*, *Brachyhypopomus pinnicaudatus*, *Hypopomus* sp. y *Eigenmannia virescens*. Estos datos no coinciden exactamente con descripciones previas de la ictiofauna local (Devincenzi & Barattini 1928, Vaz Ferreira

1969). Parte de esta disparidad puede explicarse por problemas en la clasificación dentro del grupo, cuya sistemática es todavía muy dinámica. Por ejemplo, es posible que la especie identificada como *Hypopomus brevirostris* (hoy *Brachyhypopomus brevirostris*) en las descripciones



**Figura 15.** Cambios estacionales y diarios de la temperatura. **a.** Valores promedio ( $\pm$  desvío estándar) de la temperatura del agua registrada en todos los sitios explorados a lo largo del año. **b.** Temperaturas del agua a lo largo del día medidas en el arroyo Cuaró Grande durante la estación reproductiva.

tradicionales de ictiofauna uruguayana corresponda a la identificada por nosotros como *Brachyhypopomus pinnicaudatus* que fue descrita posteriormente (Hopkins 1991). Otro factor es el sesgo impuesto por el método de muestreo utilizado en este estudio, que sólo accedió a sectores someros y áreas litorales de los diversos cursos de agua. No fueron explorados los cauces principales ni zonas profundas de ríos, arroyos y lagunas.

Como aporte de este trabajo, se destaca la identificación de una especie novedosa identificada tentativamente como *Hypopomus* sp. Hopkins, a quien consultamos para aclarar la sistemática de esta especie, propone que corresponde a un género tampoco descrito aún (comunicación personal). En el futuro, se llevará a cabo la clasificación y nominación definitiva de esta especie.

El hallazgo de Gymnotiformes en un alto porcentaje de los sitios explorados (62%) indica que la población real de estos peces en Uruguay ha sido subestimada, como

ocurre en el resto del continente (Kirschbaum 1995). Este hecho puede deberse a que los Gymnotiformes carecen de interés comercial y habitan en sectores de difícil acceso para el ser humano. Es frecuente constatar que incluso los pescadores locales desconocen la existencia de estos peces.

#### Hábitat

En coincidencia con reportes previos (Kirschbaum 1995, Lorenzo et al. 2001), los Gymnotiformes en Uruguay se han adaptado a hábitats muy diversos. Fueron encontrados en casi todos los tipos existentes de cursos de agua dulce naturales y artificiales. Sin embargo, su abundancia relativa es variable en los distintos tipos de sitios explorados y fue posible identificar un hábitat típico asociado a una alta abundancia relativa de Gymnotiformes. Las características más salientes de este hábitat típico son: cursos de agua someros con aguas quietas, turbias y con presencia de abundante vegetación superficial.

En varios de los sitios explorados, se detectó la presencia de más de una especie de Gymnotiformes. Por ejemplo, en el arroyo Tres Cruces se colectaron ejemplares de las cuatro especies identificadas en este trabajo. Es difícil precisar si se trata de especies estrictamente simpátricas, ya que los individuos de una misma especie suelen encontrarse agrupados en sectores relativamente aislados. Esto puede ser consecuencia de la existencia de sutiles preferencias específicas con respecto al hábitat que redunden en la generación de diferentes microhábitats entre los que prácticamente no se establezcan interacciones interespecíficas (Westby 1988). En particular, en el arroyo Tres Cruces, *Eigenmannia virescens* habita en sectores profundos y de aguas quietas, lo que es consistente con la hipótesis de que los peces que emiten DOEs sinusoidales de alta frecuencia prefieren temperaturas más estables (Stoddard 2002).

#### *Influencia de factores ambientales sobre la distribución geográfica de Gymnotiformes*

En este estudio, se analizó la distribución del Orden Gymnotiformes en el límite sur de su distribución continental. Se confirmó que el número de especies halladas en estas latitudes es mucho menor que las reportadas en la zona tropical. De las aproximadamente 110 especies de Gymnotiformes descritas, sólo *Gymnotus carapo* y *Brachyhypopomus pinnicaudatus* fueron encontrados en un alto porcentaje de los sitios explorados en Uruguay y en alta abundancia relativa. Por otra parte, este estudio demostró que dentro del territorio uruguayo estas dos especies de Gymnotiformes se distribuyen de manera no uniforme: a) *Gymnotus carapo* habita en todo el territorio y es la única especie presente en el extremo sur (área S); y b) *Brachyhypopomus pinnicaudatus* habita en la región noreste de Uruguay y predomina en el área E.

La temperatura es un factor ambiental fundamental en la determinación de la distribución geográfica del Reino Animal (Prosser & Heath 1991). Con respecto a los Gymnotiformes en particular, la temperatura puede ser uno de los factores involucrados en la disminución del número de especies observado en dirección norte-sur (trópico-templado). Los reportes previos indicaban que la mayoría de los Gymnotiformes toleraban temperaturas del agua entre 20 y

35 °C (Kirschbaum 1995). Enger & Szabo (1968) encontraron que *Sternarchorhynchus* sp. y *Sternopygus* provenientes del Río Negro (Brasil) presentaban exigencias térmicas aún más estrictas: 25-37 °C y 19-30 °C, respectivamente. En este trabajo, se demostró que los Gymnotiformes en Uruguay son capaces de tolerar rangos de temperatura bastante más amplios que los previamente reportados (8-33 °C).

El contenido de oxígeno disuelto en el medio acuático es un determinante importante de la distribución y patrones migratorios de los peces neotropicales (Kramer et al. 1978, Val & Almeida-Val 1995). En Gymnotiformes de la cuenca del Amazonas, Crampton (1998) confirmó el efecto de este factor sobre la distribución, comportamiento migratorio, adaptaciones respiratorias y diseño de la DOE. Las dos principales especies encontradas en Uruguay (*Gymnotus carapo* y *Brachyhypopomus pinnicaudatus*) toleran ambientes anóxicos ya que poseen adaptaciones para la respiración aérea (Liem et al. 1984, Hopkins 1991). Si bien en este estudio no se realizaron mediciones del contenido de oxígeno, se pudo constatar indirectamente la tolerancia de *Gymnotus carapo* y *Brachyhypopomus pinnicaudatus* a concentraciones extremadamente bajas de oxígeno. En varios cursos de agua, se encontraron ejemplares de *Gymnotus carapo* y *Brachyhypopomus pinnicaudatus* enterrados en el sedimento que es prácticamente anóxico.

La composición química del medio acuático continental (conductividad, pH, concentración de calcio, etc.) influye sobre la distribución de los organismos vivos (Krebs 1978). Las aguas dulces sudamericanas se caracterizan por valores bajos de pH y valores muy variables de conductividad eléctrica, y los Gymnotiformes toleran amplios rangos de estos factores (Kirschbaum 1995).

En este estudio se evaluó la influencia de la conductividad y pH del medio sobre la distribución geográfica diferencial de *Gymnotus carapo* y *Brachyhypopomus pinnicaudatus* en Uruguay. Inicialmente se constató que: a) los sitios del área E, donde predomina *Brachyhypopomus pinnicaudatus*, presentan valores de conductividad y pH significativamente inferiores a los del área S, habitada exclusivamente por *Gymnotus carapo*; y b) *Brachyhypopomus pinnicaudatus* fue encontrado en aguas que exhibían

valores promedio inferiores y un rango más estrecho de conductividad y pH que *Gymnotus carapo*. En base a estos hallazgos, se evaluó el impacto de la conductividad y pH sobre la abundancia relativa de ambas especies mediante dos procedimientos estadísticos diferentes, resultando que: a) la abundancia relativa de *Brachyhyopomus pinnicaudatus* (pero no la de *Gymnotus carapo*) se correlaciona negativamente con la

conductividad y el pH; y b) la conductividad y el pH contribuyen significativamente (9.4%) a las diferencias geográficas encontradas de abundancia relativa de *Brachyhyopomus pinnicaudatus*. Los datos presentados en este estudio demuestran la responsabilidad parcial de estos factores en la distribución no uniforme de *Gymnotus carapo* y *Brachyhyopomus pinnicaudatus* en Uruguay.

## I-B. Ciclo anual de una población de *Brachyhyopomus pinnicaudatus*

### ANTECEDENTES

Los procesos reproductivos de los peces de agua dulce americanos dependen de ritmos biológicos endógenos y de la influencia de factores ambientales (Baggerman 1980). Los cambios estacionales de los factores ambientales señalan al pez el momento más favorable para la reproducción, que básicamente se produce en el momento del año en que sus crías tienen la máxima chance de supervivencia. En algunos teleósteos, los factores ambientales disparan por sí mismos el ciclo reproductivo actuando como factores proximales; y en otros actúan como factores reguladores (temporizadores, "zeitgebers") ajustando el ritmo endógeno a las condiciones ambientales (Lam 1983, Kirschbaum 2000). El fotoperíodo, la temperatura y su interacción son temporizadores importantes y reconocidos del ciclo reproductivo en peces de las zonas subtropical y templada (Lam 1983, Prosser & Heath 1991). Los factores temporizadores de la reproducción cíclica de los peces tropicales se vinculan con la alternancia de las estaciones seca y lluviosa (Kirschbaum 1979, 2000).

A lo largo de la amplia distribución de Gymnotiformes en el continente americano, es razonable suponer la acción de varios factores ambientales temporizadores de los ciclos reproductivos de estos peces. Los estudios ecoetológicos realizados hasta el momento se han llevado a cabo en la zona tropical, donde la temperatura es prácticamente constante a lo largo del año (Tabla I-1). Como muchos otros peces neotropicales, la mayoría de los Gymnotiformes del trópico se reproducen durante la estación lluviosa, durante la cual el

importante aumento de precipitaciones determina un aumento de los niveles del agua asociado a una disminución de la conductividad (Hopkins 1974b, Kirschbaum 1979, 2000). Provenzano (1984) demostró que el aumento del índice gonadosomático en *Eigenmannia virescens* se asociaba con la ocurrencia de la estación lluviosa en el Río Apure (mayo-octubre, 8 °N, Venezuela). Otros estudios revelan diferencias en las claves ambientales que actúan como factores temporizadores del ciclo reproductivo inclusive para una misma especie. Schwassmann (1976) reportó diferencias en el disparo de la reproducción de *Gymnorhamphichthys hypostomus* en tres áreas. En el Ecuador, en ausencia de cambios estacionales de fotoperíodo, el período reproductivo de *Gymnorhamphichthys hypostomus* coincide con la estación lluviosa (febrero-julio), utilizando probablemente el aumento de los niveles de agua asociado a una disminución de la conductividad como factor ambiental temporizador. A 10 °S, *Gymnorhamphichthys hypostomus* se reproduce al comienzo de la estación seca (julio-setiembre); en este caso se interpreta que los peces están probablemente respondiendo a cambios estacionales en el fotoperíodo y se reproducen cuando las noches son más largas. Hagedorn (1988) muestreó los cambios estacionales de una población de *Brachyhyopomus occidentalis* en un sector del Río Limbo (enero-abril, 10 °N, Panamá). Esta población se reprodujo en la transición entre la estación lluviosa y seca respondiendo probablemente a cambios en el fotoperíodo y a la mayor disponibilidad de sitios de apareamiento que quedan luego de los desbordes e inundaciones de la estación lluviosa.

En la zona templada no se ha estudiado hasta la fecha el ciclo reproductivo de los peces Gymnotiformes ni los factores ambientales involucrados en su regulación. En Uruguay, borde sur de la distribución de Gymnotiformes en América, las condiciones ambientales son muy diferentes que en el trópico. El fotoperíodo y la temperatura sufren

importantes cambios estacionales, mientras que las precipitaciones son irregulares a lo largo del año. La mayoría de los peces teleósteos estudiados en la zona templada se reproducen durante la primavera y verano en respuesta a las variaciones del fotoperíodo asociadas al aumento de la temperatura del agua (Lam 1983).

ESPECIE	LUGAR	LATITUD	REPRODUCCIÓN	FACTORES AMBIENTALES	AUTORES
<i>Stemopygus macrurus</i> <i>Eigenmannia virescens</i>	Distrito Rupununi	3 °N	Estación lluviosa	Inundación local ↓ Conductividad	Hopkins (1974a,b)
<i>Gymnorhamphichthys hypostomus</i>	Belén	Ecuador	Estación lluviosa Febr-Abr	Inundación local ↓ Conductividad	Schwassmann (1976)
<i>Gymnorhamphichthys hypostomus</i>	Manaos	Ecuador	Estación lluviosa May-Jul	Inundación local ↓ Conductividad	Schwassmann (1976)
<i>Gymnorhamphichthys hypostomus</i>	Rondonia	10 °S	Estación seca Jul-Set	Fotoperíodo	Schwassmann (1976)
<i>Eigenmannia virescens</i>	Río Apure	8 °N	Estación lluviosa May-Oct	Inundación local ↓ Conductividad	Provenzano (1984)
<i>Brachyhypopomus occidentalis</i>	Parque Nacional Soberanía	10 °N	Estación seca Ene-Abr	Fotoperíodo Disponibilidad de sitios de cortejo	Hagedorn (1988)

**Tabla 11.** Recopilación del trabajo de campo de diversos autores que proponen distintos factores ambientales como temporizadores ("zeitgebers") del período reproductivo en Gymnotiformes.

## OBJETIVOS

Se plantearon los siguientes objetivos específicos:

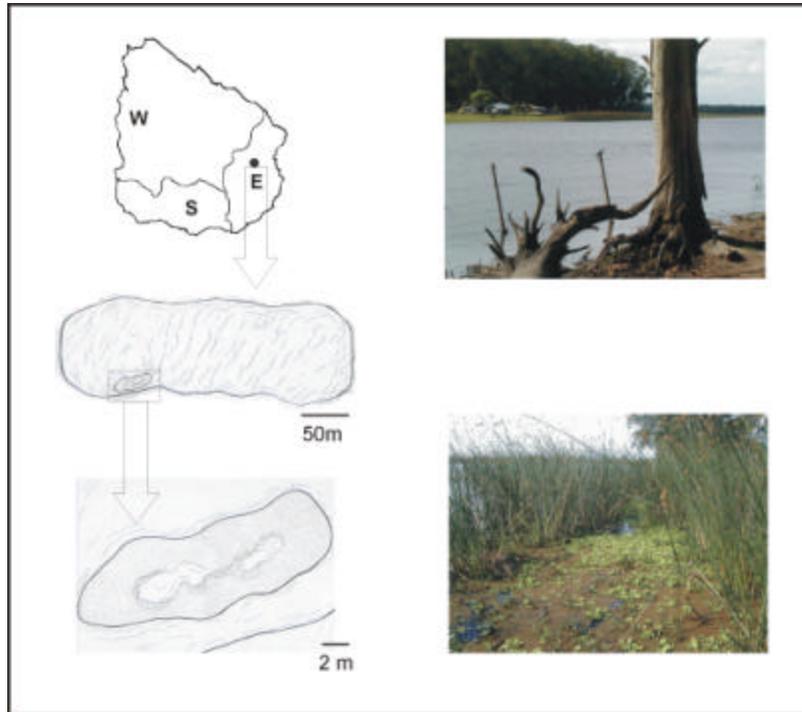
- Realizar el seguimiento de una población de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* a lo largo del año.
- Identificar el período reproductivo de esta población.
- Describir los cambios de temperatura, conductividad eléctrica y fotoperíodo a lo largo del año y su asociación con la ocurrencia del período reproductivo de *Brachyhypopomus pinnicaudatus*.

## METODOS

El análisis de los cambios estacionales en la estructura de una población de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* se llevó a cabo en una laguna ubicada en el área E (laguna El Tigre, Depto. de Treinta y Tres, 33.18 °S, 54.35 °O, Fig. 46), cuyas dimensiones totales son de aproximadamente 300 m X 70 m. Como se observa en la Fig. 46, el muestreo se realizó en un área de 80 m<sup>2</sup> de la zona litoral de la laguna El Tigre. Esta área de muestreo se encuentra naturalmente limitada por juncos que retienen abundante vegetación acuática superficial a lo largo de todo el año. Durante 1999 y 2000, se tomaron muestras de la población mensualmente (en primavera y verano) y cada dos meses (en otoño e invierno). El muestreo se llevó a cabo por dos equipos en cada expedición. En todos los casos, el esfuerzo total

fue de 120 min y los datos se estandarizaron a 1 hs, por lo que la CPUE se expresó en peces  $hs^{-1}$ . En cada muestreo, los peces se capturaban, se medían y se retornaban al hábitat, a excepción de 10 adultos que se trasladaban al laboratorio para ulterior análisis. De acuerdo con los criterios establecidos por Franchina (1997), el tamaño corporal se usó para clasificar a los ejemplares como juveniles (tamaño corporal < 9 cm) o adultos (tamaño corporal > 9 cm). La madurez sexual se evaluó por parámetros morfológicos y electrofisiológicos (Hopkins et al. 1990, Hopkins

1991, Caputi et al. 1998, Silva et al. 1999). Los machos sexualmente diferenciados son de mayor tamaño que las hembras y poseen un filamento caudal largo y ancho, mientras que las hembras tienen filamentos caudales cilíndricos y ovarios protruyentes a través de la piel. La identificación sexual se complementó con registros de la DOE realizados en el laboratorio: los machos muestran una DOE de mayor duración que las hembras a expensas de un incremento de la duración de la segunda fase cabeza-negativa.



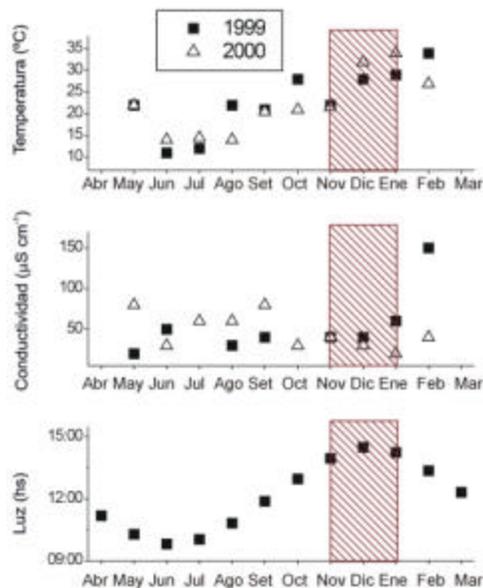
**Figura 16.** Laguna El Tigre, área E, Depto. de Treinta y Tres. Se muestran esquemas generales y fotografías de la laguna (21000 m<sup>2</sup>) y de la zona litoral de muestreo (80 m<sup>2</sup>).

## RESULTADOS

Como se observa en la Fig. I-7, la temperatura del agua presentó variaciones estacionales en la laguna El Tigre en determinaciones realizadas mensualmente durante dos años sucesivos. La temperatura alcanzó valores mínimos en junio (11 y 14 °C) y máximos en enero (29 y 34 °C). La conductividad eléctrica del agua se mantuvo relativamente baja (entre 20 y 150  $\mu S cm^{-1}$ ) y no experimentó variaciones estacionales. En la gráfica inferior de la Fig. I-7, se representan en horas de luz las importantes variaciones de fotoperíodo a lo largo del año correspondientes a esta latitud (33 °S).

Se registraron modificaciones en la estructura de la población de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* de la laguna El Tigre a lo largo del año (Fig. I-8). Se capturaron ejemplares de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* en todas las expediciones salvo en junio y agosto. Los peces colectados se clasificaron en 4 categorías: juveniles (negro), adultos sexualmente indiferenciados (gris), hembras sexualmente diferenciadas (rayado) y machos (blanco). Si bien se identificaron individuos juveniles (tamaño corporal < 9 cm) a lo largo de todo el año (excepto en setiembre), se observó un aumento muy pronunciado de los mismos en el mes de enero. Los juveniles predominan en la muestra obtenida en enero alcanzando una abundancia relativa de 25 peces  $hs^{-1}$ . Se

colectaron individuos adultos de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* (tamaño corporal > 9 cm) entre los meses de julio y febrero. Su abundancia relativa fue muy variable desde 05 peces  $hs^{-1}$  en invierno a 25-35 peces  $hs^{-1}$  en verano. Los adultos sexualmente diferenciados (machos y hembras) se detectaron en las muestras de los meses de noviembre, diciembre, enero y febrero. Todos los machos colectados presentaron un tamaño corporal mayor de 15 cm y las todas hembras fueron mayores de 12.5 cm. Los adultos sexualmente diferenciados predominaron en las muestras de la población obtenidas en noviembre y diciembre, alcanzando una abundancia relativa de 17 peces  $hs^{-1}$  y 36 peces  $hs^{-1}$ , respectivamente.



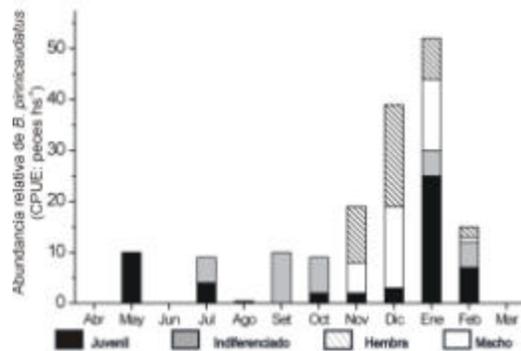
**Figura I-7.** Variaciones estacionales de los factores ambientales en la laguna El Tigre. Se representan temperatura, conductividad y horas de luz a lo largo del año. La temperatura y el fotoperíodo muestran variaciones estacionales, mientras que la conductividad se mantiene relativamente constante y baja. Los cuadrados negros y triángulos blancos corresponden a los registros obtenidos en 1999 y 2000, respectivamente. Las barras rayadas representan la ocurrencia del período reproductivo.

La presencia de adultos sexualmente diferenciados y el brusco incremento en la abundancia relativa de juveniles indican que el período reproductivo ocurrió entre los meses de noviembre, diciembre y enero. Este período coincide con temperaturas del agua elevadas (con importantes variaciones diarias), conductividad eléctrica baja (< 80  $\mu S$

$cm^{-1}$ ), y fotoperíodo extremo (14 hs luz – 10 hs oscuridad) como se señala en el área rayada de la Fig. I-7.

## DISCUSION

Este es el primer estudio de campo que identifica el período reproductivo en una población natural de Gymnotiformes de la zona templada. En la laguna El Tigre, *Brachyhypopomus pinnicaudatus* se reproduce en los meses de noviembre, diciembre y enero, en coincidencia con temperaturas elevadas del agua (30 °C aproximadamente) y fotoperíodo extremo (14 hs luz – 10 hs oscuridad, aproximadamente). Estos datos refuerzan el posible rol de la temperatura como factor temporizador (“zeitgeber”) del período reproductivo, hipótesis que se expondrá y discutirá extensamente en el Capítulo III. No es posible descartar, sin embargo, el rol de las variaciones estacionales del fotoperíodo y sus interacciones con la temperatura como factores importantes en el desencadenamiento del período reproductivo en Gymnotiformes de la zona templada.



**Figura I-8.** Estructura de la población de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* en la laguna El Tigre. Se representa la abundancia relativa de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* (CPUE, peces  $hs^{-1}$ ) colectados durante el año: juveniles (negro), adultos sexualmente indiferenciados (gris), hembras (rayado) y machos (blanco).

La abundancia relativa de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* decrece en el invierno. Dado que esta fluctuación se observó en dos años consecutivos, se interpretó que el decremento observado no se relaciona con la remoción de ejemplares durante el procedimiento de muestreo. Schwassmann (1976) en *Gymnorhamphichthys* y Hagedorn

(1988) en *Brachyhypopomus occidentalis* describieron una disminución similar en el número de adultos luego del período reproductivo. Se han planteado varias interpretaciones para explicar estas fluctuaciones: migraciones, predación diferencial, correntadas ("washouts") durante lluvias torrenciales y mortalidad de adultos (principalmente machos) post-reproducción (Hagedorn 1986). En *Brachyhypopomus occidentalis* no se observaron movimientos migratorios (Hagedorn 1988). En *Eigenmannia* y *Apteronotus* se observó un aumento de la mortalidad luego de la reproducción en cautiverio (Hagedorn & Heiligenberg 1985). Sin embargo, *Brachyhypopomus pinnicaudatus* se ha reproducido exitosamente en nuestro laboratorio y no se ha evidenciado aumento de la mortalidad post-reproducción; el mismo grupo de peces adquirió diferenciación sexual en dos años sucesivos. La predación diferencial puede jugar un rol importante en el decremento de la población, ya que los individuos en cortejo (especialmente los machos) se exponen más durante el período reproductivo en busca de pareja y exhiben una DOE más potente que los podría hacer más vulnerables frente a predadores electrosensibles.

## BIBLIOGRAFIA

- Alves-Gomes JA. 1999. Systematic biology of gymnotiform and mormyrid electric fishes: phylogenetic relationships, molecular clocks and rates of evolution in the mitochondrial rRNA genes. *J Exp Biol* 202:1167-1183.
- Ardanaz JL, Silva A, Macadar O. 2001. Temperature sensitivity of the electric organ discharge waveform in *Gymnotus carapo*. *J Comp Physiol A* 187: 853-864.
- Baggerman B. 1980. Photoperiodic and endogenous control of the annual reproductive cycle in teleost fishes. En: Ali MA (ed) *Environmental physiology of fishes*. Plenum Press. New York: 553-568.
- Calow P. 1998. The encyclopedia of ecology & environmental management. Falk DA, Grace J, Moore PD, Shorrocks B, Stearns SC (eds). Blackwell Science. Oxford. 805 pp.
- Caputi AA, Silva A, Macadar O. 1998. The EOD of *Brachyhypopomus pinnicaudatus*: The effect of environmental variables on waveform generation. *Brain Behav Evol* 52: 148-158.
- Conde D, Sommaruga R. 1999. A review of the state of Limnology in Uruguay. En: Wetzel RG, Gopal B (eds) *Limnology in developing countries*. Vol. 2. International Association for Limnology (SIL), International Scientific Publications. New Delhi: 1-31.
- Crampton WGR. 1998. Effects of anoxia on the distribution, respiratory strategies and electric signal diversity of gymnotiform fishes. *J Fish Biol* 53: 307-330.
- Darlington PJ. 1957. *Zoogeography*. Wiley. New York. 657 pp.
- Devincenzi GJ, Barattini LP. 1928. *Album ictológico del Uruguay (1º y 2º Serie)* An. Mus. Hist. Nat. Montevideo, Uruguay.
- Enger PS, Szabo T. 1968. Effect of temperature on the discharge rates of the electric organ of some gymnotids. *Comp Biochem Physiol* 27: 625-627.
- Franchina CR. 1997. Ontogeny of the electric organ discharge and the electric organ in the weakly electric pulse fish *Brachyhypopomus pinnicaudatus* (Hypopomidae, Gymnotiformes). *J Comp Physiol A* 181: 111-119.
- Géry J. 1969. The freshwater fishes of South America. En: Fittkau EJ, Illes J, Klinge H (eds.) *Biogeography and Ecology in South America*. Monographiae Biologicae. No. 9. Dr W. Junk Publ. The Hague: 828-848.
- Goulding MJ, Carvalho ML, Ferreira EG. 1988. Rio Negro, rich life in poor water. SPB Academic Publishing. The Hague.
- Hagedorn M Heiligenberg W. 1985. Court and spark: electric signals in the courtship and mating of gymnotoid fish. *Anim Behav* 33: 254-265.
- Hagedorn M. 1986. The ecology, courtship, and mating of gymnotiform electric fish. En: Bullock TH, Heiligenberg W (eds) *Electroreception*. Wiley. New York: 497-526.
- Hagedorn M. 1988. Ecology and behavior of a pulse-type electric fish *Hypopomus occidentalis* (Gymnotiformes, Hypopomidae) in a fresh-water stream in Panama. *Copeia* 2: 324-335.
- Hopkins C D. 1974a. Electric communication: functions in the social behavior of *Eigenmannia virescens*. *Behaviour* 50: 270-305.
- Hopkins CD. 1974b. Electric communication in the reproductive behavior of *Sternopygus macrurus* (Gymnotoidei). *Z Tierpsychol* 35:518-535.
- Hopkins CD, Heiligenberg W. 1978. Evolutionary designs for electric signals and electroreceptors in Gymnotoid fishes of Surinam. *Behav Ecol Sociobiol* 3: 113-134.
- Hopkins CD, Comfort NC, Bastian J, Bass AH. 1990. Functional analysis of sexual dimorphism in an electric fish, *Hypopomus pinnicaudatus*, Order Gymnotiformes. *Brain Behav Evol* 35: 350-367.
- Hopkins CD. 1991. *Hypopomus pinnicaudatus* (Hypopomidae) a new species of gymnotiform fish from French Guiana. *Copeia* 1: 151-161.
- Kirschbaum F. 1979. Reproduction of the weakly electric fish *Eigenmannia virescens* (Rhamphichthyidae, Teleostei) in captivity. *Behav Ecol Sociobiol* 4: 331-355.
- Kirschbaum F. 1995. Taxonomy, zoogeography and general ecology of South American knifefishes (Gymnotiformes). En: Moller P (ed) *Electric Fishes. History and behavior*. Chapman & Hall, Fish and Fisheries Series 17. London: 446-464.
- Kirschbaum F. 2000. The breeding of tropical freshwater fishes through experimental variation of exogenous parameters. *Aqua Geographia* 20: 95-105.
- Kramer DL, Lindsey CC, Moodie GEE, Stevens ED. 1978. The fishes and the aquatic environment of the Central Amazonian basin with particular reference to respiratory patterns. *Can J Zool* 56: 717-729.
- Kramer B, Kirschbaum F, Markl H. 1981. Species specificity of electric organ discharges in a sympatric group of gymnotoid fish from Manaus (Amazonas). En: Szabo T & Czéh D (eds) *Advances in Physiological Sciences*. Vol 31: Sensory physiology of aquatic lower vertebrates. Pergamon Press, Academiai Kiado. Budapest: 195-219.

- Krebs CJ. 1978. Ecology: the experimental analysis of distribution and abundance. Harper & Row Publ. New York. 678 pp.
- Lam TJ. 1983. Environmental influences on gonadal activity in fish. En: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (eds) Fish Physiology. Vol IX, Academic Press. New York: 65-116.
- Liem KF, Echlaner D, Fink WL. 1984. Aerial respiration in the banded knife fish *Gymnotus carapo* (Teleostei: Gymnotoidei). Physiological Zoology 57: 185-195.
- Lorenzo D, Silva A, Caputi A, Borde M, Macadar O. 2001. Electrogenation in South American weakly electric fish. En: Kapoor BG, Hara TJ (eds) Sensory biology of jawed fishes. Oxford & IBH Publishing Co Put Ltd. New Delhi.
- Mago-Leccia F. 1994. Electric fishes of the continental waters of America. Clemente Editores. Caracas.
- Marrero C, Taphorn DC. 1991. Notas sobre la historia natural y distribución de los peces gymnotiformes en la cuenca del Río Apure y otros ríos de la Orinoquia. Biollan 8: 123-142.
- Perrow MR, Côté IM, Evans M. 1996. Fish. En: Sutherland WJ (ed) Ecological census techniques. A handbook. Cambridge University Press. Cambridge: 178-204.
- Prosser CL, & Heath JE. 1991. Temperature. En: Prosser CL (ed) Environmental and metabolic animal physiology. Wiley-Liss. New York: 109-165.
- Provenzano RF. 1984. Aspectos de la reproducción en peces Gymnotiformes del Bajo Llano de Venezuela. Tesis, Univ. Central de Venezuela. 68 pp.
- Schwassmann HO. 1976. Ecology and taxonomic status of different geographic populations of *Gymnorhamphichthys hypostomus*. Ellis (Pisces, Cypriniformes, Gymnotoidei). Biotropica 8: 25-40.
- Silva A, Quintana L, Galeano M, Errandonea P, Macadar O. 1999. Water temperature sensitivity of the EOD waveform in *Brachyhyopomus pinnicaudatus*. J Comp Physiol A 185, N° 2: 187-197.
- Val AL, Almeida-Val VMF. 1995. Fishes of the Amazon and their environment. Physiological and biochemical aspects. Springer-Verlag. Heidelberg. 224 pp.
- Vaz Ferreira R. 1969. Peces del Uruguay. Editorial Nuestra Tierra. Montevideo, Uruguay. 72 pp.
- Vilano VV de, Balderas SC. 1987. Lista zoogeográfica y ecológica de la ictiofauna continental de Chiapas, México. The Southwestern Naturalist. 32: 223-236.
- Westby GWM. 1988. The ecology, discharge diversity and predatory behaviour of gymnotiform electric fish in the coastal streams of French Guiana. Behav Ecol Sociobiol 22: 341-354.



---

## CAPITULO II

### Despliegues locomotores y eléctricos de cortejo en *Brachyhyopomus pinnicaudatus*

---

#### ANTECEDENTES

El comportamiento reproductivo comprende toda interacción entre ambos sexos que conduce a la unión de los gametos. La visión clásica de los estereotipados rituales de cortejo y apareamiento los propone como aventuras armoniosas en las que machos y hembras cooperan para propagar sus genes respectivos (Tinbergen 1951). En este marco, las funciones asignadas al comportamiento de cortejo son: reconocer a un coespecimen de sexo adecuado, establecer el nexo entre la pareja, sincronizar y estimular la gametoposición, y favorecer el aislamiento reproductivo a través de la utilización de señales especie-específicas. Más recientemente, se ha entendido que también hay importantes conflictos de interés entre machos y hembras durante el cortejo. Hoy se concibe a la pareja como haciendo una difícil e inestable alianza durante el cortejo, en la que cada sexo intenta maximizar su propio éxito en la propagación de sus genes (Krebs & Davies 1993).

El comportamiento reproductivo en peces teleósteos muestra un amplio rango de repertorios desde la simple liberación de gametos en la proximidad de un coespecimen hasta secuencias complejas que pueden incluir defensa territorial, preparación de nido, formación de pareja y protección de la cría (Balon 1975, 1981). En las especies de fecundación externa, se reconocen tres etapas en el comportamiento reproductivo: a) cortejo, comportamiento previo a la gametoposición involucrado en la búsqueda, atracción y excitación de una potencial pareja; b) desove, variados despliegues por los cuales hembras y machos coordinan y sincronizan la ovoposición y espermiación; y c) cuidado parental, acciones posteriores a la gametoposición tendientes al cuidado de huevos y/o crías (Liley & Stacey 1983).

Existen múltiples estudios de dimorfismo sexual, cortejo y selección de pareja

realizados en diversas especies de peces teleósteos. Entre ellos, se destacan los realizados en *Poecilia reticulata*, que presenta fecundación interna y da origen a una camada de individuos juveniles completamente independientes (Meffe & Snelson 1989, Houde 1997); y en el gasterósteo *Gasterosteus aculeatus*, que presenta fecundación externa y cuidado parental de huevos y crías por parte del macho (Wootton 1976). A pesar de que estas especies difieren mucho en su biología reproductiva, comparten la estrategia de selección sexual y han aportado datos importantes sobre la comunicación establecida entre ambos sexos durante la reproducción (Sargent et al. 1998).

La conducta de cortejo en Gymnotiformes comprende despliegues locomotores y eléctricos. La caracterización de los despliegues locomotores ha sido abordada sólo en *Eigenmannia*, *Apteronotus*, *Sternopygus* y *Electrophorus* (Hopkins 1974a, 1974b, Kirschbaum 1979, Kutz 1980, Hagedorn & Heiligenberg 1985, Assunção & Schwassmann 1992). Con respecto a los despliegues eléctricos, existen dos tipos de modulaciones de la DOE propias del período reproductivo: a) varias especies de los géneros *Brachyhyopomus*, *Eigenmannia*, *Apteronotus* y *Sternopygus* presentan DOEs sexualmente dimórficas que se utilizan para el reconocimiento y selección de pareja (Hagedorn & Carr 1985, Hagedorn & Heiligenberg 1985, Hopkins et al. 1990, Hopkins 1991, Zakon et al. 1991); y b) ambos sexos pueden modular su ritmo de descarga y forma de onda para producir señales sociales específicas que participan en el cortejo y apareamiento (Hopkins 1974a, 1974b, Hagedorn & Heiligenberg 1985, Hagedorn 1988, Kawasaki & Heiligenberg 1989, Stoddard et al. 1996).

Los estudios pioneros de la conducta reproductiva en Gymnotiformes, en los que se consolida el concepto de

electrocomunicación, fueron realizados en *Eigenmannia virescens* y *Sternopygus macrurus* por Hopkins (1974a, 1974b). Hopkins (1974b) describió despliegues locomotores y eléctricos en una población de *Sternopygus macrurus* en el arroyo Moco-Moco en Guyana, registrando en el macho residente interrupciones y aumentos de la frecuencia de descarga en respuesta al pasaje de la hembra. Los despliegues locomotores y eléctricos de la conducta reproductiva de *Eigenmannia virescens* y *Apteronotus leptorhynchus* han sido más extensamente estudiados en poblaciones de peces que se reproducen en cautiverio (Hopkins 1974a, Kirschbaum 1979, Kutz 1980, Hagedorn & Heiligenberg 1985). Los grupos de *Eigenmannia virescens* y *Apteronotus leptorhynchus* mantenidos en condiciones de reproducción establecen rangos jerárquicos basados en la agresividad y el tamaño y expresados en la frecuencia de descarga de la DOE. El macho dominante en una población de *Eigenmannia virescens* exhibe la menor frecuencia de descarga, en tanto la hembra dominante exhibe la mayor. En *Apteronotus leptorhynchus*, la situación es inversa y el macho dominante es quien exhibe la máxima frecuencia (Hagedorn & Heiligenberg 1985).

Durante interacciones sexuales y encuentros agonistas en *Eigenmannia* y *Apteronotus*, se registraron diferentes modulaciones del ritmo de descarga (chirps, interrupciones y variaciones graduales de frecuencia). Los chirps definidos por Bullock (1969) como aumentos breves y bruscos de la frecuencia de la DOE, fueron inicialmente descritos en *Apteronotus* con el nombre de “pings” por Larimer & MacDonald (1968). En *Apteronotus* existen chirps emitidos exclusivamente por machos asociados a interacciones sexuales y chirps emitidos por ambos sexos utilizados como señales de comunicación entre individuos del mismo sexo (Zupanc & Maler 1993, Engler et al. 2000, Bastian et al. 2001). En *Eigenmannia*, se ha demostrado que la duración de las interrupciones de la descarga también depende del contexto comportamental: se observan interrupciones cortas durante encuentros agonistas y más prolongadas asociadas a la conducta de cortejo Hopkins (1974a).

Dentro de los Gymnoiformes que descargan en pulsos, se han realizado algunos aportes en la caracterización de la conducta de

cortejo en el género *Brachyhypopomus* (previamente denominado *Hypopomus*). Hagedorn (1988) registró dos tipos de modulaciones del ritmo de descarga en contexto reproductivo en una población de *Brachyhypopomus occidentalis* en el río Limbo en Panamá: chirps (definidos como trenes decrementales, “decremental bursts”) e interrupciones (adoptando un patrón de apagado-encendido-apagado-encendido, “off-on-off-on pattern”). Kawasaki & Heiligenberg (1989) registraron tres tipos de modulaciones de la DOE en parejas *Brachyhypopomus brevirostris* que adquirieron su madurez sexual por simulación de la estación lluviosa en el laboratorio: a) machos y hembras interrumpen sus descargas en forma brusca o luego de una disminución gradual de la frecuencia; b) machos y hembras producen chirps débiles (“weak”, rápida sucesión de pulsos de menor amplitud interpuestos entre DOEs normales) y fuertes (“strong”, trenes de descargas de pulsos de menor amplitud con interrupción de la emisión de DOEs normales); y c) modulaciones de la frecuencia basal graduales (aumentos y disminuciones) y tumultosas (sólo observadas en el macho). El estudio de los despliegues locomotores y eléctricos de la conducta reproductiva y de las estrategias de selección sexual en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* ha sido abordado en individuos reproducidos en cautiverio (Stoddard et al. 1996, C Curtis, comunicación personal).

Las bases circuitales y celulares de la producción de las distintas modulaciones de los patrones de descarga fueron estudiadas en *Apteronotus*, *Eigenmannia*, *Brachyhypopomus* y *Sternopygus* (Kawasaki et al. 1988, Kawasaki & Heiligenberg 1989, Keller et al. 1991). En *Brachyhypopomus*, el ritmo regular de las descargas impuesto por el núcleo marcapaso bulbar está modulado por aferencias provenientes de al menos dos regiones premarcapaso: diencefálica (PPn) y mesencefálica sublemniscal (SPPn). Estas vías se activan diferencialmente según el tipo de señal observada (aceleraciones y desaceleraciones suaves y bruscas, chirps o interrupciones) involucrando distintos neurotransmisores, receptores y células blanco (Kawasaki & Heiligenberg 1990, Spiro 1997).

Desde los estudios pioneros de la década del 70, se postuló el rol funcional de estas modulaciones de la frecuencia de la DOE como verdaderas señales sociales y de

cortejo. Esta particular forma de señalización entre sexos constituyen ejemplos concretos de electrocomunicación que permitieron demostrar que la DOE aporta suficiente información del individuo emisor como para modificar conductas en el individuo receptor. Por ejemplo, a) machos de *Eigenmannia virescens* producen interrupciones en su descarga frente a la reproducción de la actividad eléctrica (“playback”) de coespecímenes pero no de individuos de otras especies (Hopkins 1974a); b) la reproducción de la actividad eléctrica de un macho dominante en la noche de apareamiento (chirps, interrupciones, modulaciones graduales) puede provocar la ovoposición en una hembra grávida de *Eigenmannia virescens* aun en la ausencia del macho (Hagedorn & Heiligenberg 1985); c) la estimulación de un animal con una señal sinusoidal que remeda la descarga de un coespecimen implica la producción de chirps en *Apteronotus leptorhynchus* (Dye 1987); d) hembras grávidas de *Brachyhypopomus occidentalis* discriminan entre señales eléctricas artificiales tipo-macho (“male-like”) y tipo-hembra (“female-like”) (Shumway & Zelick 1988); y e) machos de *Apteronotus leptorhynchus* producen más chirps en presencia de machos que de hembras (Dunlap 2002).

## OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es la identificación y descripción de los despliegues posturales, locomotores y eléctricos característicos de la conducta reproductiva de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* a partir del análisis de parejas (macho y hembra sexualmente diferenciados) en campo abierto (“open field”) registradas complementariamente en el hábitat natural y en el laboratorio.

Se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Confirmar los despliegues eléctricos de cortejo (chirps e interrupciones) en parejas de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* registradas durante el período reproductivo en el hábitat natural.
- Reproducir las condiciones para que se produzca el comportamiento de cortejo de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* en estaciones experimentales en el laboratorio que remedan el hábitat

reproductivo y permiten videofilmación y registros simultáneos de la DOE.

- Definir categorías conductuales para la descripción del comportamiento de cortejo de *Brachyhypopomus pinnicaudatus*.
- Explorar la asociación de despliegues eléctricos, posturales y locomotores durante el comportamiento de cortejo de *Brachyhypopomus pinnicaudatus*.
- Investigar evidencias de electrocomunicación entre macho y hembra durante el comportamiento de cortejo de *Brachyhypopomus pinnicaudatus*.

## METODOS

### Registro de la DOE en el hábitat

Se registraron 6 parejas de individuos adultos de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* sexualmente diferenciados durante el período reproductivo (noviembre, diciembre y enero de 1999, 2000 y 2001) en la laguna del Tigre, Depto. de Treinta y Tres (33.18°S, 54.35°O).

Se seleccionaron machos y hembras por su dimorfismo sexual morfológico (el macho es mayor que la hembra y posee un filamento caudal más largo y aplanado, Fig. III-3) y eléctrico (la duración de la segunda fase de la DOE, P2, es mayor en el macho que en la hembra, Figs. II-1 y III-3). Las parejas se aislaron inmediatamente después de su colecta en sectores restringidos del hábitat natural de reproducción (60 X 60 X 30 cm). No se restringieron los movimientos de los peces dentro de estos recintos, por lo que los registros se realizaron en campo abierto. Se obtuvieron registros de las DOEs a partir de dos pares de electrodos ubicados ortogonalmente siguiendo un procedimiento de registro modificado del diseñado por Black-Cleworth (1970). Los registros electrofisiológicos se realizaron durante 6 hs (1 hs antes y 5 hs después de la puesta de sol). Las señales fueron amplificadas (amplificador diferencial AC A-M Systems 1700) y grabadas en cintas electromagnéticas (Pioneer CT-F500 y Akai GXC-725D) para su ulterior procesamiento en el laboratorio.

En cada sesión de registro, se midió además: a) la temperatura del agua durante las 6 hs de registro (20-29 °C); y b) la conductividad eléctrica (30-70  $\mu\text{Scm}^{-1}$ ).

### Alojamiento de peces

Los peces se trasladaron desde la laguna del Tigre, Depto. de Treinta y Tres, y se sembraron en

tanques exteriores utilizando el agua y vegetación superficial proveniente de la laguna. En cada tanque (140 X 100 X 50 cm) se ubicaron 8 individuos (2 machos y 6 hembras de acuerdo con el diseño utilizado por Stoddard, comunicación personal).

A lo largo del año se midió la temperatura del agua (8-35 °C) y la conductividad (40-200  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ). Los tanques se cubrieron con un material aislante desde mayo a agosto para prevenir descensos extremos de la temperatura del agua (< 8°C). La conductividad se mantuvo siempre por debajo de 200  $\mu\text{S cm}^{-1}$  mediante el agregado de agua deionizada. Los peces se alimentaron generosamente con Tubifex especialmente durante la estación reproductiva.

Los individuos adultos inicialmente trasladados a estos tanques exteriores mantuvieron su diferenciación sexual y se reprodujeron durante diciembre y enero; se desdiferenciaron a partir de marzo; y readquirieron caracteres sexuales secundarios en la estación reproductiva siguiente (octubre-noviembre).

#### *Registro de imágenes y de la DOE en el laboratorio*

Se registraron 7 parejas de individuos adultos de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* sexualmente diferenciados durante el período reproductivo (noviembre, diciembre y enero de 2000 y 2001) y 6 parejas de individuos adultos indiferenciados fuera del período reproductivo (mayo, junio y agosto de 2001).

Se montó una estación de registro en el laboratorio que permitió complementar los registros electrofisiológicos de la DOE de parejas de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* con la filmación simultánea de sus despliegues posturales y locomotores. Se acondicionó una pecera de 55 X 40 X 25 cm a los efectos de remedar las condiciones del hábitat natural. Se colocó vegetación superficial, se aportó abundante alimentación y se mantuvo la conductividad eléctrica inferior a 200  $\mu\text{S cm}^{-1}$ . Se fijó el ciclo luz-oscuridad en 14:10 hs durante el período reproductivo y en 10:14 hs durante el período no reproductivo. Para evitar variaciones de temperatura que pudieran afectar la conducta reproductiva, la temperatura de la pecera se mantuvo igual a la registrada en los tanques exteriores en los que se alojaban los peces previo al registro, resultando 21-30 °C y 10-17 °C dentro y fuera del período reproductivo, respectivamente. Dado que el comportamiento reproductivo se produce durante la noche, el dispositivo se iluminó con paneles de diodos de emisión de luz (LEDs) infrarroja. Posteriormente a cada sesión de registro, se rastreó la presencia de huevos que fue positiva en dos oportunidades durante el período reproductivo.

Durante el período reproductivo, se seleccionaron parejas de machos y hembras por su dimorfismo morfológico y eléctrico. Además, en cada pareja registrada la longitud del macho fue 2 cm mayor que la de la hembra para favorecer el procesamiento posterior de las señales eléctricas. Fuera del período reproductivo, cuando no es posible identificar claves morfológicas ni eléctricas de dimorfismo sexual, se seleccionaron los individuos de longitudes extremas dentro del tanque de alojamiento para asegurar que se tratara de un macho (longitud máxima) y una hembra (longitud mínima).

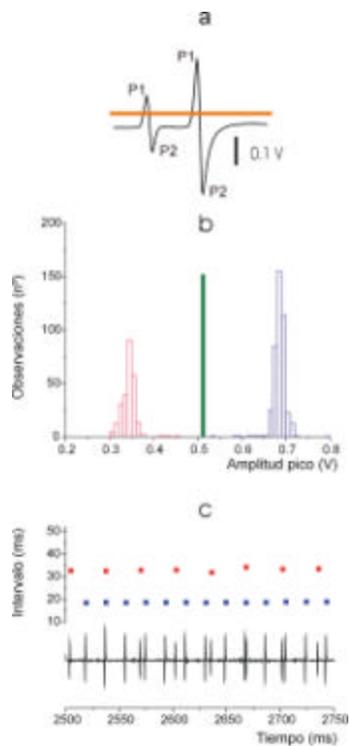
No se restringieron los movimientos de los peces dentro la pecera de registro, en la que se colocaron 8-10 hs antes del comienzo de la grabación. Los registros electrofisiológicos y la filmación de imágenes se realizaron al igual que en el hábitat natural en campo abierto y durante 6 hs (1 hs antes y 5 hs después de la puesta de sol), totalizando en 13 parejas más de 120 hs de grabación.

Se obtuvieron registros de las DOEs por medio de dos pares de electrodos ortogonales (procedimiento modificado de Black-Cleworth 1970). Las imágenes de los despliegues posturales y locomotores se grabaron por medio de una cámara de video (SONY CCD-Iris) sin filtro infrarrojo colocada enfocando el fondo de la pecera. Se diseñó la pecera de registro (base de 55 X 45 y altura del agua nunca superior a 15 cm) para poder restringir a dos dimensiones el registro eléctrico (2 electrodos ortogonales) y de imágenes (1 cámara). Las imágenes y los registros eléctricos preamplificados (amplificador diferencial AC A-M Systems 1700) se almacenaron en canales independientes utilizando un grabador de video (SONY SVO-1500P). El procesamiento simultáneo de ambas señales (imágenes y registros de la DOE) permitieron correlacionar algunos despliegues eléctricos y locomotores de la conducta de cortejo en esta especie.

#### *Procesamiento de señales eléctricas*

Los registros electrofisiológicos digitizados por medio de la tarjeta conversora análogo-digital (Labmaster DMA 120) fueron adquiridos con el programa Axotape. El paso inicial del procesamiento de estas señales implica la separación de las DOEs generadas por el macho y por la hembra de acuerdo con un criterio de tamaño: el macho es mayor que la hembra y, por tanto, genera DOEs de mayor amplitud en el agua como se muestra en un ejemplo en la Fig. II-1. En cada caso, se seleccionó para su adquisición el canal de registro en el que se observaba más inequívocamente esa diferencia macho-hembra. El programa Acquis1 4.0 (Bio-Logic) construye un histograma de amplitudes de dos picos luego de fijar un umbral adecuado en el registro de las DOEs. Un pico del histograma corresponde a las DOEs del macho y el otro a las de la hembra.

Posteriormente, el Acquis1 4.0 elabora dos listados de instantes de ocurrencia de cada DOE del macho y de la hembra por separado, y un listado de los intervalos correspondientes. El principal problema que enfrenta este procesamiento es la coincidencia de las DOEs del macho y de la hembra. Cuando sucede esto, la descarga de mayor amplitud enmascara a la de menor amplitud. El algoritmo diseñado detecta que, debido a la superposición, en el listado de ocurrencia de eventos correspondiente al animal con menor amplitud de descarga, hay un intervalo que es aproximadamente múltiplo del intervalo unitario. En esos casos el algoritmo asigna a ambas listas el (los) valores de tiempo detectados para el evento de mayor amplitud. A partir de estos listados, se construyeron gráficas de intervalo en función del tiempo utilizando el programa MicrocalOrigin como se muestra en la Fig. II-1 (gráfica inferior) en coincidencia con el registro crudo.



**Figura II-1.** Separación de las DOEs generadas por el macho y la hembra. **a.** Registro de 2 DOEs, la de mayor amplitud es la descarga del macho y la de menor amplitud es la de la hembra. La barra naranja indica el umbral seleccionado para la detección de amplitudes pico. Nótese el dimorfismo sexual de la DOE (la duración de P2 es mayor en el macho que en la hembra). **b.** Histograma de amplitudes que muestra 2 picos correspondientes a las DOEs de la hembra (rojo, 0.3 V) y a las del macho (azul, 0.7 V). La barra verde indica el umbral seleccionado para la elaboración de listados de intervalos independientes. **c.** Se representa el intervalo en función del tiempo de las DOEs del macho (azul) y de la hembra (rojo) en coincidencia con el registro crudo de las DOEs (trazado inferior).

Se registró el número e instante de ocurrencia de las modulaciones de frecuencia (chirps e interrupciones) durante todas las noches de registro. Segmentos de registros crudos de la DOE conteniendo chirps e interrupciones se procesaron en forma similar a lo expuesto en párrafo anterior por medio de los programas Acquis 1 4.0 y Microcal Origin que permitieron representarlos en gráficas de intervalo en función del tiempo.

El aumento de la frecuencia basal fue analizado en 7 parejas en cortejo (machos y hembras sexualmente diferenciados durante el período reproductivo) y en 6 parejas control (machos y hembras sexualmente indiferenciados fuera del período reproductivo). Con este fin, se tomaron muestras de 10 s cada 10 min a lo largo de las 6 hs de grabación (1 hs antes y 5 hs después de la puesta de sol). Se seleccionaron segmentos de registros estacionarios en amplitud, forma de onda y frecuencia, para el muestreo con el fin de evitar que cambios en la amplitud y forma de onda de la DOE complicaran la discriminación hembra-macho y para eliminar posibles variaciones de frecuencia debidas a movimientos. Los listados de intervalos se convirtieron en listados de frecuencia instantánea ( $T=1/f$ ) y se promediaron utilizando el programa MicrocalOrigin. Para poder hacer comparaciones entre los datos obtenidos de distintas parejas a lo largo del año y evitar la influencia de la temperatura sobre el ritmo de descarga, se calculó el incremento mediante el índice  $IFB_{ND} = [(frecuencia\ basal\ media\ de\ la\ noche) - (frecuencia\ basal\ media\ del\ día)] / (frecuencia\ basal\ media\ del\ día)$ .

#### Procesamiento de imágenes

Imágenes y registros electrofisiológicos fueron ingresados en la computadora como señales de video y audio, respectivamente, por medio de la tarjeta MiroDC30 utilizando el programa AdobePremier. Este programa permite analizar cuadro a cuadro ( $24\ s^{-1}$ ) las imágenes y correlacionar con la misma precisión eventos motores y eléctricos.

#### Categorías conductuales

El comportamiento de cortejo es generalmente muy estereotipado. Esto permite que sea estudiado mediante definición de categorías conductuales y análisis de secuencias por transición, asociación o correlación de las mismas (Slater 1975). Se optó por realizar las observaciones en campo abierto tomando como unidad de observación a la diada macho-hembra. Siguiendo el esquema de Delgado & Delgado (1962, citado en Lehner 1996), se definieron 2 tipos de categorías conductuales sociales simples: estados espaciales que describen la postura o relación espacial de la pareja (Fig. II-2), y unidades dinámicas que apuntan a describir la organización temporal del comportamiento, es decir las variaciones temporales de la postura. Los

estados espaciales y las unidades dinámicas se definieron con el fin de constituir categorías conductuales objetivas, exhaustivas y mutuamente excluyentes (Lehner 1996).

Se seleccionaron segmentos de grabación que denominamos secuencias (n=24, 12 s) que presentaron un chirp emitido por el macho seguido de una interrupción de la descarga por parte de la hembra en los siguientes 10 s y segmentos de grabación denominados controles (n=24, 10 s) inmediatamente previos a las secuencias. Se utilizó el programa AdobePremier para registrar la secuenciación y duración de las categorías conductuales observadas en cada segmento de grabación discretizado en unidades temporales de 1 s. En cada segundo, se consignó el estado espacial y la unidad dinámica observados, y las señales eléctricas propias de la conducta de cortejo se registraron como eventos. Se analizó la asociación entre categorías conductuales y señales eléctricas. Se construyeron histogramas con los porcentajes relativos de tiempo de estados espaciales y unidades dinámicas (Fig. II-9). La secuenciación de las categorías conductuales dentro de los segmentos de grabación analizados se evaluó por medio de la construcción de matrices de transición y diagramas de flujo (Fig. II-10). Para ello, se generaron categorías conductuales secundarias espacio-dinámicas que surgen de la combinación de estados espaciales y unidades dinámicas: A1 (Paralelos-Aproximación), A2 (Paralelos-Alejamiento), A3 (Paralelos-Nado Sincronizado), etc.

Se analizaron noches completas de registro (6 hs) en 6 parejas durante el período reproductivo y 6 parejas control (fuera del período reproductivo Fig.II-6). Para este análisis prolongado, se simplificaron las categorías conductuales en 2 estados espaciales: Juntos (incluye A, B, C, D y F) y Separados (E); y en 2 unidades dinámicas: Móviles (incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 8) e Inmóviles (7). Se utilizaron planillas para registrar la secuencia y la duración de las categorías conductuales observadas y la ocurrencia de señales eléctricas (chirps e interrupciones) consignadas como eventos. La unidad temporal seleccionada en este caso fue de 1 min. Posteriormente, se generaron las siguientes categorías conductuales secundarias espacio-dinámicas: Juntos-Inmóviles, Juntos-Móviles, Separados-Móviles y Separados-Inmóviles. La duración porcentual estimada de cada categoría conductual secundaria se representó cada 30 min durante la noche de registro (Fig. II-6).

## RESULTADOS

### *Identificación de categorías conductuales*

La sucesión continua de eventos locomotores y eléctricos que componen la conducta de cortejo en *Brachyhypopomus pinnicaudatus*

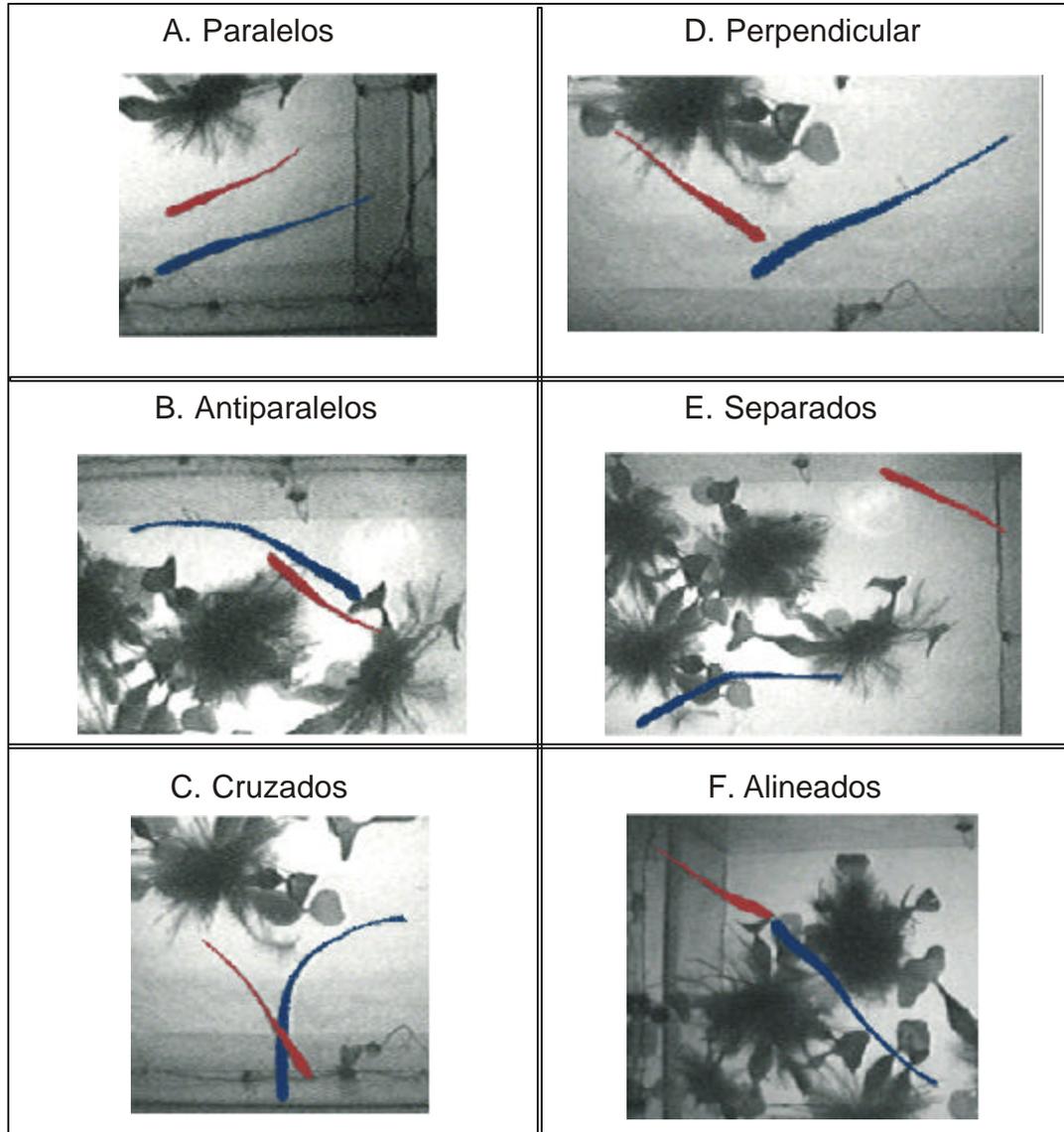
se discretizó para su estudio en categorías conductuales. Dado que no había antecedentes en el abordaje etológico al estudio de la conducta reproductiva en esta especie, el paso inicial de este trabajo fue la identificación de dos tipos de categorías conductuales (estados espaciales, Fig.II-2, y unidades dinámicas) definidas en ambos casos para la díada macho-hembra.

### Estados Espaciales

- A. Paralelos: Ejes mayores de macho y hembra se disponen paralelos (0-15°), cabeza-cabeza, sin contacto directo ni superposición entre individuos, distancia entre puntos más próximos de ambos individuos menor de 5 cm.
- B. Antiparalelos: Ejes mayores de macho y hembra se disponen paralelos (0-15°), cabeza-cola, sin contacto directo ni superposición entre individuos, distancia entre puntos más próximos de ambos individuos menor de 5 cm.
- C. Cruzados: Contacto directo y/o superposición entre individuos cuyos ejes mayores se disponen en cualquier orientación.
- D. Perpendiculares: Ejes mayores de macho y hembra se disponen perpendiculares (75-105°), sin contacto directo ni superposición entre individuos, distancia entre puntos más próximos de ambos individuos menor de 5 cm.
- E. Separados: Distancia entre puntos más próximos de ambos individuos mayor de 5 cm.
- F. Alineados: Ejes mayores de macho y hembra coinciden, sin contacto directo ni superposición entre individuos, distancia entre puntos más próximos de ambos individuos menor de 5 cm.

### Unidades Dinámicas

1. Aproximación: Distancia entre las cabezas de ambos individuos disminuye en función del tiempo.
2. Alejamiento: Distancia entre las cabezas de ambos individuos aumenta en función del tiempo.
3. Nado sincronizado: Desplazamientos coordinados de ambos individuos en dirección y sentido.
4. Entrelazado: Movimientos corporales de macho y hembra en íntimo contacto sin desplazamiento. Coincide siempre con el estado espacial C (Cruzados).



**Figura II-2.** Estados espaciales. Categorías conductuales sociales simples definidas para la diada macho (azul) – hembra (rojo).

5. Persecución: Desplazamiento de un individuo dirigido hacia el otro también en movimiento sin disminución de la distancia entre las cabezas de ambos individuos.
6. Serpenteo: Movimiento de la aleta ventral de macho y/o hembra sin desplazamiento individual.
7. Inmóviles: Ausencia de movimiento en ambos individuos.
8. Exploración independiente: Desplazamiento de un individuo no dirigido hacia el otro. Incluye movimientos de exploración y reconocimiento. Coincide siempre con el estado espacial E (Separados).

#### Señales Eléctricas

Chirp: Aumento breve y brusco de la frecuencia de descarga de la DOE con disminución de su amplitud y desorganización de su forma de onda.

Interrupción: Cese de emisión de la DOE.

#### *Identificación en el hábitat natural de señales eléctricas propias del cortejo*

En la laguna del Tigre, se registraron durante el período reproductivo las DOEs de hembras y machos sexualmente diferenciados a partir de dos pares de electrodos ortogonales. En estas condiciones siempre fue posible diferenciar la descarga del macho de la DOE de la hembra. Como se observa en la Fig. II-1, la descarga del macho es de mayor amplitud que la de la hembra y presenta un claro dimorfismo caracterizado fundamentalmente por un aumento en la duración de la segunda fase cabeza-negativa de la DOE (P2).

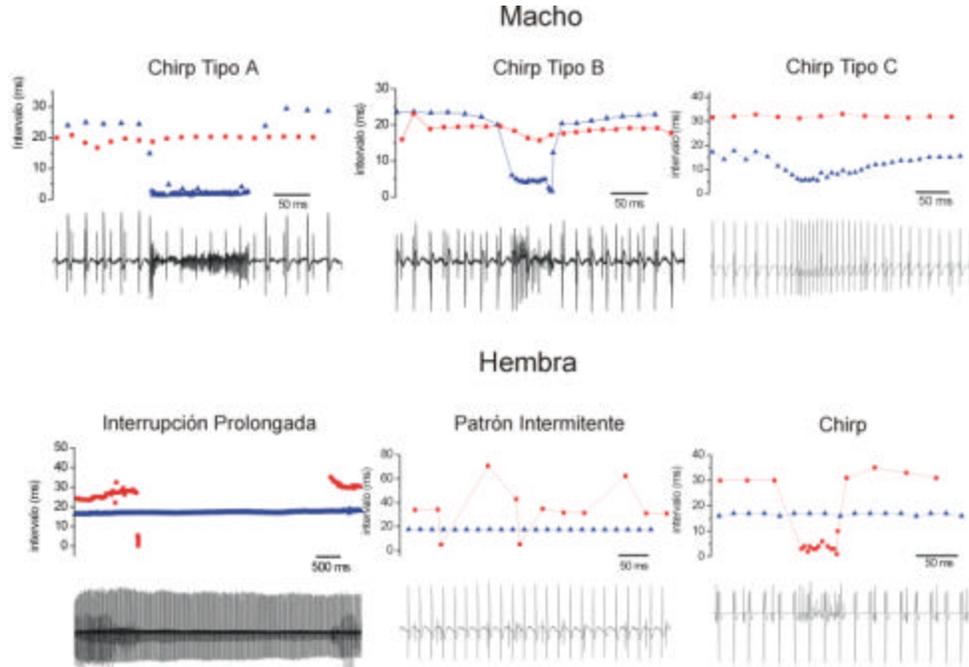
Además de mantener la descarga basal de la DOE, machos y hembras modularon esa descarga produciendo señales eléctricas características de la conducta de cortejo como se muestra en la Fig. II-3. Se registraron chirps (aumentos breves y bruscos de la frecuencia de descarga de la DOE con disminución de su amplitud y desorganización de su forma de onda) e interrupciones (ceses breves de la emisión de la DOE). Los chirps fueron emitidos en su enorme mayoría por machos y presentaron duración variable (50-400 ms) y organización interna variable (con amplitud decreciente, estable o en huso). Se identificaron 3 tipos de chirps emitidos por los machos (Fig. II-3): Tipo A, con husos, 70-270 ms de duración

(duración promedio=150 ms), se caracteriza por una fase inicial de aumento de la frecuencia y disminución de la amplitud con desorganización de la forma de onda y una fase tardía con modulaciones de la amplitud en forma de husos; Tipo B, cortos, 30-150 ms de duración (duración promedio=70 ms), se caracteriza por un aumento de la frecuencia con disminución gradual de la amplitud y desorganización de la forma de onda; y Tipo C, suaves, 50-400 ms de duración, aumento de la frecuencia de descarga de la DOE con leve modificación de la forma de onda. Además de estos tres tipos básicos de chirps, se registraron múltiples chirps intermedios entre los Tipos A y B en cuanto a duración y modulación de la amplitud de la DOE intrachirp, y chirps combinados (por ejemplo, un chirp Tipo A en el medio de un chirp Tipo C). Un mismo macho alterna la producción de distintos tipos de chirps a lo largo de una noche de cortejo. Sólo en forma excepcional, se registraron chirps emitidos por hembras que fueron en su gran mayoría cortos (30-50 ms) y con poca variación de la forma de onda de la DOE (Fig. II-3). Las interrupciones fueron exclusivamente observadas en hembras quienes pueden presentar ceses prolongados de la emisión de sus descargas (5-15 s) o adoptar un patrón intermitente de interrupciones y encendidos (patrón off-on-off-on) como se observa en la Fig. II-3. La hembra suele iniciar la interrupción disminuyendo gradualmente la amplitud de sus DOEs en forma similar a un chirp pero de 10-20 ms de duración (microchirps).

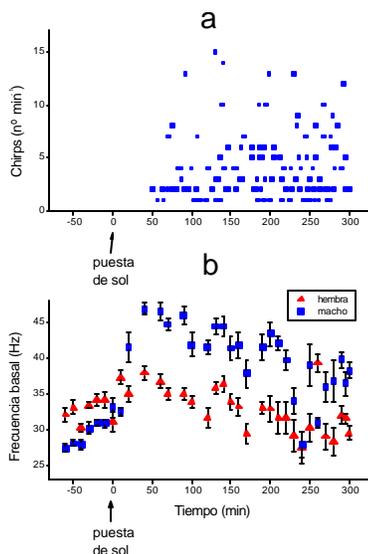
La Fig. II-4 muestra dos aspectos relevantes de los despliegues eléctricos de una pareja de individuos sexualmente diferenciados de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* registrados en su hábitat reproductivo: a) la producción de chirps por parte del macho; y b) el aumento nocturno de la frecuencia basal observado en el macho y en la hembra. A lo largo de las 6 hs de registro, el macho emitió 508 chirps (Fig. II-4a). La producción de chirps comenzó aproximadamente 50 min después de la puesta de sol, es decir, no se observó ningún chirp durante el día y primeros minutos de la noche, y se mantuvo hasta 5 hs después de la puesta de sol. El comienzo de la producción de chirps por parte del macho coincide con el aumento de su ritmo de descarga basal como se observa en la Fig. II-4b. Los chirps se emitieron en ráfagas de hasta 15 chirps  $\text{min}^{-1}$  separadas por cortos períodos de silencio. Como se muestra en la Fig. II-4b, la frecuencia de la

DOE aumenta después de la puesta de sol claramente en el macho y levemente en la hembra registrados en el hábitat reproductivo a 21 °C. Las frecuencias basales de la DOE del macho y de la hembra fueron calculadas seleccionando muestras de 10 s cada 10 min de registros de la DOE de amplitud, forma de onda y frecuencia estacionarias, lo que nos

permite suponer que los individuos se encontraban quietos. En promedio, la frecuencia de la hembra aumentó de  $32.9 \pm 1.47$  Hz en el día a  $32.95 \pm 3.13$  Hz en la noche; en tanto que la frecuencia promedio del macho aumentó de  $29.28 \pm 1.62$  Hz en el día a  $39.65 \pm 4.9$  Hz en la noche.



**Figura II-3.** Señales eléctricas propias del cortejo registradas en el hábitat natural. Se representan tres tipos de chirps observados en machos (Tipos A, B y C), dos tipos de ceses de la descarga observados en hembras (interrupciones prolongadas y patrón intermitente) y un chirp de hembra (raramente observado).



**Figura II-4.** Despliegues eléctricos de una pareja de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* registrada en el hábitat natural durante 6 hs (1 hs antes y 5 hs después de la puesta de sol). **a.** Se representan los chirps emitidos por el macho a lo largo del tiempo de registro ( $n^{\circ} \text{min}^{-1}$ ). No se representa la no ocurrencia de chirps (ceros) antes de la puesta de sol ni en los primeros 50 min de la noche ni entre ráfagas. **b.** Se representan las frecuencias basales de la DOE (en Hz) del macho (azul) y de la hembra (rojo), calculadas en base a muestras de 10 s cada 10 min, en función del tiempo de registro.

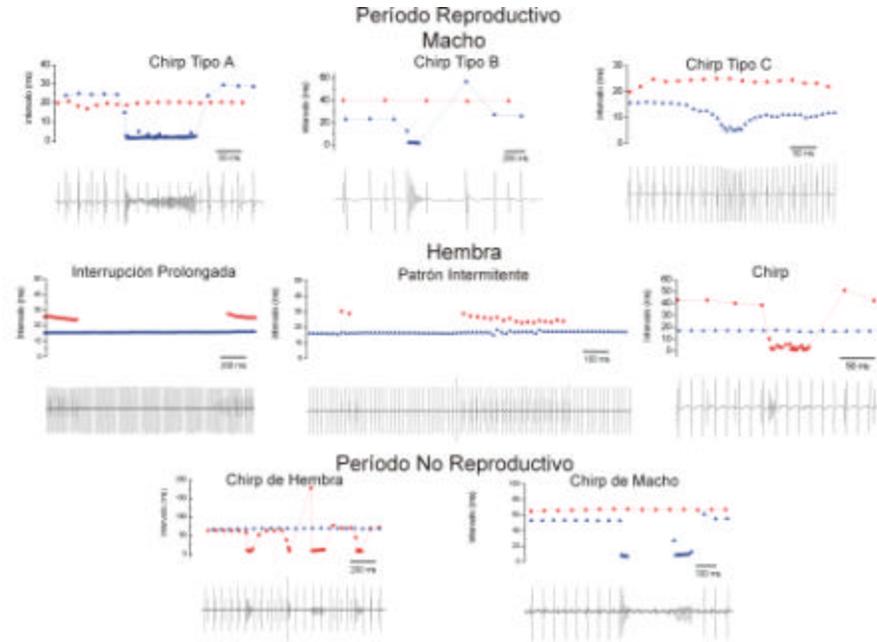
*Identificación en el laboratorio de señales eléctricas propias del cortejo y despliegues posturales y locomotores asociados*

En la estación de registro montada en el laboratorio, machos y hembras emitieron múltiples señales eléctricas características de la conducta de cortejo durante el período reproductivo. Se registraron chirps e interrupciones de la DOE indistinguibles de los observados en el hábitat natural. Los machos emitieron chirps de Tipo A, B, C, (y también intermedios y combinados), en tanto las hembras produjeron interrupciones prolongadas, adoptaron el patrón intermitente off-on-off-on y muy excepcionalmente emitieron chirps (Fig. II-5). Fuera del período reproductivo, se observaron muy pocas modulaciones en el ritmo de descarga en machos y hembras. Sólo se registraron chirps eventuales emitidos por machos y hembras (Fig. II-5). No se observaron interrupciones de la DOE fuera del período reproductivo. Los chirps emitidos fuera del período reproductivo no se corresponden exactamente con los tipos descritos: presentan una duración promedio mayor (400 ms), menor frecuencia intrachirp y son similares entre machos y hembras.

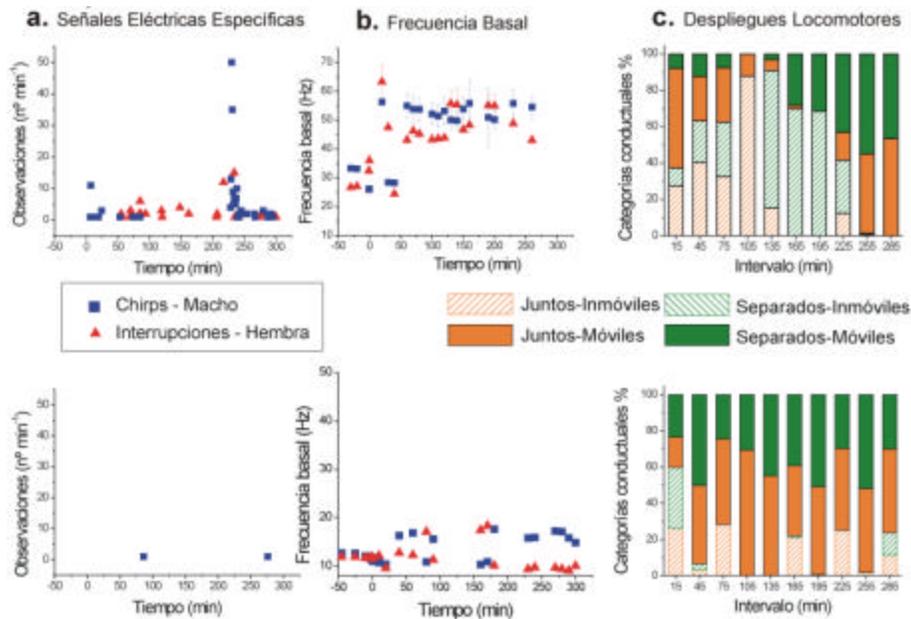
La Fig. II-6 muestra los despliegues eléctricos y locomotores observados en una pareja de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* durante una noche de cortejo en el laboratorio y los compara con los observados fuera del período reproductivo. Durante la noche de cortejo (6 hs de registro: 1 hs luz y 5 hs oscuridad), el macho emitió 211 chirps y la hembra interrumpió su descarga en 94 ocasiones (Fig. II-6a gráfica superior). La producción de chirps comenzó inmediatamente después de la puesta de sol (no se observó ningún chirp durante el día) y se mantuvo hasta 5 hs después del mismo. El comienzo de la producción de chirps por parte del macho coincide también con el aumento de su ritmo de descarga basal como se observa en la Fig. II-6b (gráfica superior). La ocurrencia de chirps e interrupciones fue desigual a lo largo de la noche de registro; se presentaron en ráfagas intercaladas por períodos de silencio de 20-40 min. La máxima producción de estas señales características del cortejo se observó alrededor de 250 min después de la puesta de sol, llegando a consignarse  $48 \text{ chirps min}^{-1}$  y  $15 \text{ interrupciones min}^{-1}$ . La gráfica superior de la Fig. II-6b muestra que la frecuencia de la DOE aumenta después de la puesta de sol

en el macho y en la hembra registrados en el laboratorio a  $29 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Como en este caso se contaba con la grabación simultánea de imágenes, la frecuencia basal de la DOE del macho y de la hembra fue calculada seleccionando muestras (10 s cada 10 min), en las que ambos individuos se encontraban en reposo. En promedio, la frecuencia de la hembra aumentó de  $27.26 \pm 4.95 \text{ Hz}$  ( $n=7$ ) en el día a  $46.89 \pm 8.56 \text{ Hz}$  en la noche ( $n=18$ ); en tanto que la frecuencia promedio del macho aumentó de  $27.2 \pm 5.51 \text{ Hz}$  en el día ( $n=7$ ) a  $48.82 \pm 9.99 \text{ Hz}$  ( $n=18$ ) en la noche. Los despliegues locomotores de la noche de cortejo se evaluaron a través de las 4 categorías espacio-dinámicas simplificadas y combinadas: Juntos-Inmóviles, Juntos-Móviles, Separados-Móviles y Separados-Inmóviles (Fig. II-6c, gráfica superior). La duración porcentual estimada de las diferentes categorías conductuales no fue estadísticamente diferente durante la noche de registro.

El mismo análisis descrito en el párrafo anterior se aplicó a los despliegues eléctricos y locomotores observados en una pareja registrada fuera del período reproductivo a  $14 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (Fig. II-6, gráficas inferiores). Se observó la emisión por parte del macho de escasos chirps ( $n=2$ ) y un aumento de la frecuencia basal muy inferior al observado durante el período reproductivo. En promedio, la frecuencia de la hembra aumentó de  $11.79 \pm 0.13 \text{ Hz}$  en el día ( $n=5$ ) a  $11.84 \pm 2.99 \text{ Hz}$  en la noche ( $n=17$ ); en tanto que la frecuencia promedio del macho aumentó de  $12.15 \pm 0.54 \text{ Hz}$  en el día ( $n=5$ ) a  $14.05 \pm 2.86 \text{ Hz}$  en la noche ( $n=17$ ). Los peces adoptaron preferentemente las categorías conductuales Juntos-Móviles y Separados-Móviles. Los despliegues locomotores observados dentro y fuera del período reproductivo (cuantificados por estas 4 categorías espacio-dinámicas simplificadas y combinadas) no fueron significativamente diferentes.



**Figura II-5.** Señales eléctricas propias del cortejo registradas en el laboratorio. Dentro del período reproductivo, se representan tres tipos de chirps observados en machos (Tipos A, B y C), dos tipos de ceses de la descarga observados en hembras (interrupciones prolongadas y patrón intermitente) y un chirp de hembra (raramente observado) indistinguibles de los observados en el hábitat natural. Fuera del período reproductivo se registraron escasos chirps en hembras y machos.



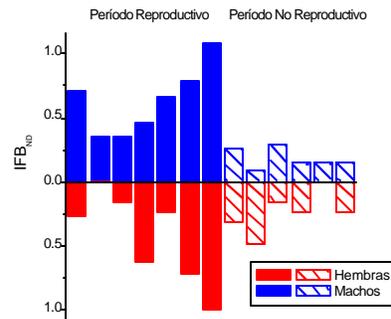
**Figura II-6.** Despliegues eléctricos y locomotores observados en el laboratorio durante 6 hs (1hs antes y 5 hs después de la puesta de sol). Durante el período reproductivo (gráficas superiores), **a.** se representan los chirps emitidos por el macho (azul) y las interrupciones producidas por la hembra (rojo) a lo largo del tiempo de registro ( $n^{\circ} \text{ min}^{-1}$ , no se representan los ceros); **b.** se representan las frecuencias basales de la DOE (en Hz) del macho (azul) y de la hembra (rojo), calculadas en base a muestras de 10 s cada 10 min, en función del tiempo de registro; **c:** se representa la duración porcentual estimada cada 30 min de las categorías conductuales espacio-dinámicas Juntos-Móviles (naranja), Juntos-Inmóviles (naranja rayado), Separados-Móviles (verde) y Separados-Inmóviles (verde rayado) a lo largo del tiempo de registro. Se representan datos comparables obtenidos fuera del período reproductivo **a, b, c,** gráficas inferiores).

*El aumento de la frecuencia basal como señal eléctrica propia del cortejo*

La frecuencia basal de la DOE de hembras y machos aumenta en la noche durante todo el año. Durante el período reproductivo, la frecuencia basal de la DOE de las hembras ( $n=7$ ) aumentó en forma estadísticamente significativa de  $27.82 \pm 7.02$  Hz (media y desvío estándar) antes de la puesta de sol a  $38.25 \pm 7.82$  Hz después de la puesta de sol (test pareado de Wilcoxon,  $p<0.05$ ). Por su parte, la frecuencia basal de los machos ( $n=7$ ) aumentó en forma estadísticamente significativa de  $29.12 \pm 4.64$  Hz antes de la puesta de sol a  $46.94 \pm 7.79$  Hz después de la puesta de sol (test pareado de Wilcoxon,  $p<0.05$ ). En los registros realizados fuera del período reproductivo, hembras ( $n=6$ ) y machos ( $n=6$ ) también aumentaron significativamente su frecuencia basal (test pareado de Wilcoxon,  $p<0.05$ ): de  $9.82 \pm 2.13$  Hz antes de la puesta de sol a  $12.04 \pm 2.31$  Hz después de la puesta de sol en hembras y de  $10.58 \pm 2.43$  Hz antes de la puesta de sol a  $12.4 \pm 2.44$  Hz después de la puesta de sol en machos.

De acuerdo con el diseño metodológico seleccionado (el registro en la estación experimental del laboratorio se realizó siempre a la misma temperatura en que se encontraban los peces en los tanques exteriores de alojamiento), los registros de la DOE se obtuvieron a diferentes temperaturas:  $21-30$  °C durante el período reproductivo y  $10-17$  °C fuera del mismo. Para cancelar el efecto de la temperatura sobre el ritmo de descarga de la DOE y así poder realizar comparaciones entre individuos y estaciones, el aumento de la frecuencia basal luego de la puesta de sol se cuantificó mediante el índice de incremento  $IFB_{ND}$  (Fig. II-7). Hembras y machos aumentan su frecuencia de descarga en la noche en forma similar: los valores del  $IFB_{ND}$  de hembras y machos no fueron estadísticamente distintos en período reproductivo ( $n=7$ , test de Wilcoxon,  $p>0.05$ ) ni fuera del mismo ( $n=6$ , test de Wilcoxon,  $p>0.05$ ). El  $IFB_{ND}$  promedio (considerando los valores de hembras y machos en forma conjunta) dentro del período reproductivo fue de  $0.52 \pm 0.31$  y fuera del mismo fue de  $0.2 \pm 0.13$ . Los valores del  $IFB_{ND}$  calculados a partir de los registros de parejas sexualmente diferenciadas en cortejo fueron significativamente mayores que los valores del  $IFB_{ND}$  obtenidos a partir de parejas indiferenciadas fuera del período reproductivo

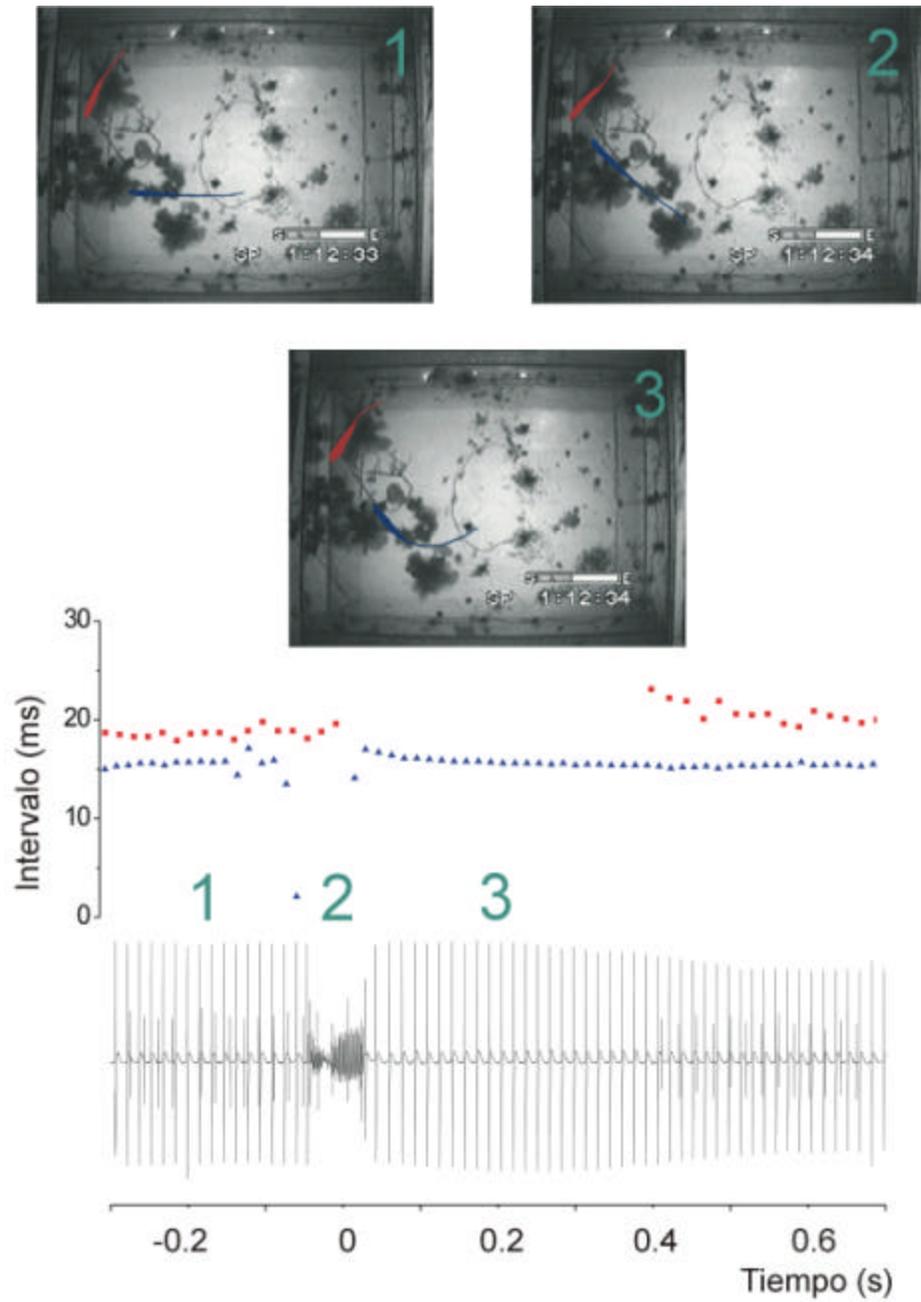
(Fig. II-7,  $n_1=12$ ,  $n_2=14$ , test de Mann & Whitney,  $p<0.01$ ).



**Figura II-7.** El  $IFB_{ND}$  cuantifica el aumento nocturno de la frecuencia basal de machos y hembras dentro y fuera del período reproductivo. Se representa el  $IFB_{ND}$  de 7 parejas registradas dentro del período reproductivo (machos en azul y hembras en rojo) y de 6 parejas registradas fuera del mismo (machos en azul rayado y hembras en rojo rayado).

*Secuencia electro-locomotora característica del cortejo*

Se realizó una descripción detallada de los despliegues locomotores y eléctricos y su asociación durante el cortejo en 24 segmentos de grabación de 12 s de duración que denominamos secuencias. El criterio de selección de estas secuencias fue el siguiente: presentar un chirp de macho seguido en menos de 10 s por una interrupción de hembra. La Fig. II-8 muestra un ejemplo de los primeros segundos de una de estas secuencias electro-locomotoras (secuencia 1 en Fig. II-11). En los cuadros superiores, se observa la posición del macho y la hembra a lo largo de la secuencia: ambos individuos se encuentran separados inicialmente y a partir del segundo cuadro se mantienen juntos y perpendiculares debido a que el macho se aproximó a la hembra. En la gráfica intermedia intervalo-tiempo, se muestra que macho y hembra disparan a frecuencia muy próxima al inicio (63.74 Hz y 55.86 Hz, respectivamente); aparecen modulaciones del ritmo de descarga correspondientes a la emisión de 1 chirp por el macho y a 1 interrupción de la DOE de la hembra; y la hembra reinicia su descarga a una frecuencia menor (45.19 Hz en la hembra). Estas señales eléctricas se presentan en los registros electrofisiológicos que se observan en la parte inferior de la Fig. II-8.



**Figura II-8.** Secuencia electro-locomotora característica del cortejo. Cuadros superiores: se representa la posición del macho (azul) y la hembra (rojo) durante los primeros segundos de la secuencia. Gráfica intermedia: se representa el intervalo en función del tiempo de las DOEs del macho (azul) y de la hembra (rojo). Trazados inferiores: registros de las DOEs que muestran la ocurrencia de señales eléctricas propias del cortejo (chirp de macho e interrupción de hembra) dentro de la secuencia.

Los despliegues locomotores y eléctricos de las secuencias se analizaron comparativamente con los observados en los segmentos de grabación de igual duración (10 s) inmediatamente previos a cada secuencia (segmentos control). En la Fig. II-9 se muestran los porcentajes relativos de tiempo en que se observaron los distintos estados espaciales y unidades dinámicas en 18 secuencias y 18 controles analizados. En los controles predomina el estado espacial Separados (E, 45%), la unidad dinámica Aproximación (1, 32.2%) y se observa la emisión de pocas señales eléctricas (chirps e interrupciones). En las secuencias predomina francamente el estado espacial Perpendicular (D, 62.8%), la unidad dinámica Aproximación (1, 35.5%) y se observan múltiples señales eléctricas que ocurren preferentemente en el estado espacial Perpendicular (D, 11 chirps y 30 interrupciones) y en la unidad dinámica Aproximación (1, 12 chirps y 17 interrupciones).

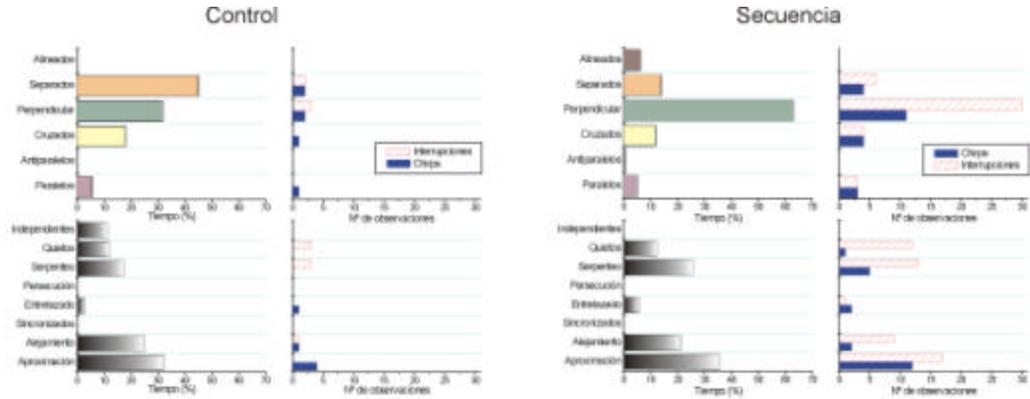
Las transiciones de categorías conductuales observadas durante 18 secuencias (y sus controles respectivos) se analizaron tomando como base categorías conductuales secundarias espacio-dinámicas que surgen de la combinación de estados espaciales y unidades dinámicas. Se elaboró una matriz de transición con las categorías espacio-dinámicas observadas durante los controles y otra durante las secuencias (Fig. II-10). Las transiciones observadas en más de 3 oportunidades aportaron los datos para la construcción de los diagramas de flujo que se muestran en la Fig. II-10. En los controles, las transiciones se dan en forma más desorganizada involucrando 9 categorías espacio-dinámicas destacándose la transición Separados-Aproximación (E1) a Perpendicular-Aproximación (D1). En cambio, en las secuencias, se destacan transiciones entre 6 categorías espacio-dinámicas con un núcleo de transiciones frecuentes con los peces en Perpendicular (D) exhibiendo despliegues dinámicos de Aproximación, Alejamiento y Serpenteo (D1, D2 y D6).

Los 24 segmentos de grabación seleccionados (control + secuencia) se alinearon en la Fig. II-11a. Se ubicó la ocurrencia del chirp de macho en el instante cero (azul) y se representaron las interrupciones (rojo), el estado espacial Perpendicular (D, verde) y la unidad dinámica Aproximación (1, amarillo). El número total de observaciones del estado Perpendicular, de

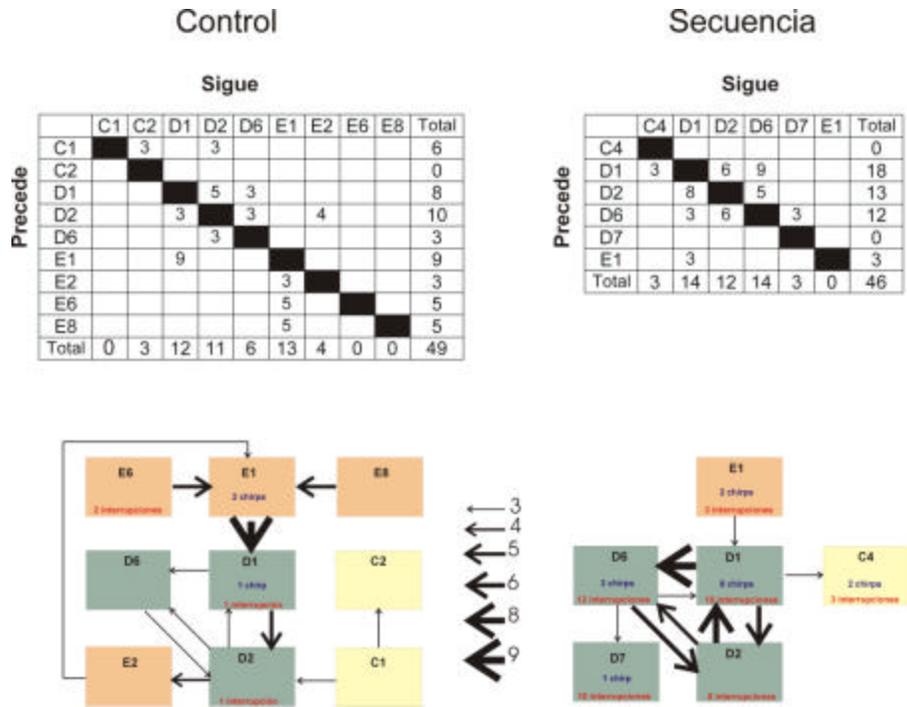
la unidad Aproximación y de las Interrupciones en cada segundo se muestran en la Fig. II-11b. Las tres gráficas presentan un perfil asimétrico con respecto a la ocurrencia del chirp, del que destacamos: a) un mayor número de observaciones del estado espacial Perpendicular después del chirp que antes del mismo; b) un aumento en pico del número de la unidad dinámica Aproximación cuyo máximo se observa entre  $-1$  s y  $0$  s; c) un mayor número de interrupciones después del chirp que antes del mismo; y d) un aumento abrupto del número de interrupciones coincidente con el segundo de ocurrencia del chirp (entre  $0$  s y  $+1$  s).

Durante las 3 noches de registro de las que se extrajeron los 24 segmentos de grabación analizados ocurrieron un total de 374 chirps y 126 interrupciones. Durante los 24 segmentos de grabación (control + secuencia) ocurrieron 24 chirps (6.4% del total) y 39 interrupciones (30.9% del total). Se analizaron segmentos de grabación de 24 s ( $-12$  s a  $+12$  s) en el entorno de 37 chirps seleccionados aleatoriamente del total de 374 chirps. Estos segmentos se alinearon ubicando la ocurrencia del chirp de macho en el instante cero y se consignó la ocurrencia de interrupciones de hembra entre  $-12$  s y  $+12$  s. El número total de interrupciones observadas en cada segundo en el entorno de los chirps seleccionados al azar (violeta) se muestran en la Fig. II-12a en comparación con el número total de interrupciones observadas en los 24 segmentos de grabación (control + secuencia) en el mismo período (rojo, ídem Fig. II-11b, gráfica inferior). El número de interrupciones observadas en el entorno de los chirps seleccionados al azar es prácticamente cero, en tanto el número de interrupciones observadas en las secuencias y controles es mayor, sobretodo a partir de la emisión del chirp.

La significación de la correlación cruzada entre la emisión del chirp por el macho y la interrupción de la hembra se evaluó por desorganización de la sucesión natural de ocurrencia de uno de los eventos manteniendo la secuenciación natural del otro. Se desalinearon 18 de los 24 segmentos de grabación (18 veces cada uno) tomando como cero un instante aleatorio entre  $-7$  s y  $+7$  s. Se consignó el número de interrupciones en cada segundo ( $-12$  s a  $+12$  s) en cada uno de los segmentos y



**Figura II-9.** Histogramas de distribución temporal porcentual de estados espaciales, unidades dinámicas y su asociación con la ocurrencia de señales eléctricas propias del cortejo (chirps e interrupciones). Se representan comparativamente los datos provenientes de secuencias (n=18, 10 s) y de segmentos de grabación inmediatamente previos (Control, n=18, 10 s).



**Figura II-10.** Matrices de transición y diagramas de flujo de categorías conductuales espacio-dinámicas observadas en las secuencias (n=18, 10 s) y en los segmentos de grabación control (n=18, 10 s). Control: C1 (CruzadosAproximación), C2 (Cruzados-Alejamiento), D1 (Perpendicular-Aproximación), D2 (Perpendicular-Alejamiento), D6 (Perpendicular-Serpenteo), E1 (Separados-Aproximación), E2 (Separados-Alejamiento), E6 (Separados-Serpenteo), E8 (Separados-Exploración independiente). Secuencia: C4 (Cruzados-Entrelazado), D1 (Perpendicular-Aproximación), D2 (Perpendicular-Alejamiento), D6 (Perpendicular-Serpenteo), D7 (Perpendicular-Inmóviles).

se promedió el resultado de los 18 segmentos desalineados. En la Fig. II-12b, se compara el número de interrupciones resultantes de la desorganización (media  $\pm$  2 desvíos estándar) en cada segundo (-12 s a +12 s) con el número de interrupciones observadas en los 24 segmentos de grabación en el mismo período (ídem Fig. II-11b, gráfica inferior). El número de interrupciones observadas durante los segmentos de grabación (control + secuencia) es significativamente mayor al esperado inmediatamente después de la emisión del chirp (entre 0 s y +1 s) ( $p < 0.05$ ). Las interrupciones de la DOE generadas por las hembras pueden durar varios segundos y el chirp de los machos es un evento puntual (cuya duración no excede 200 ms). Por lo tanto, en la Fig. II-12c se correlacionó la emisión del chirp con el inicio de las interrupciones en cada segundo (-12 s a +12 s) en los 24 segmentos de grabación (control + secuencia) y estos datos se compararon con el número de inicio de interrupciones observados luego del desalineado de los segmentos (media  $\pm$  2 desvíos estándar). En este caso, es muy evidente la relevancia estadística ( $p < 0.05$ ) del pico de interrupciones que comienzan en el segundo de ocurrencia del chirp (entre 0 s y +1 s).

## DISCUSIÓN

### *Diseño experimental*

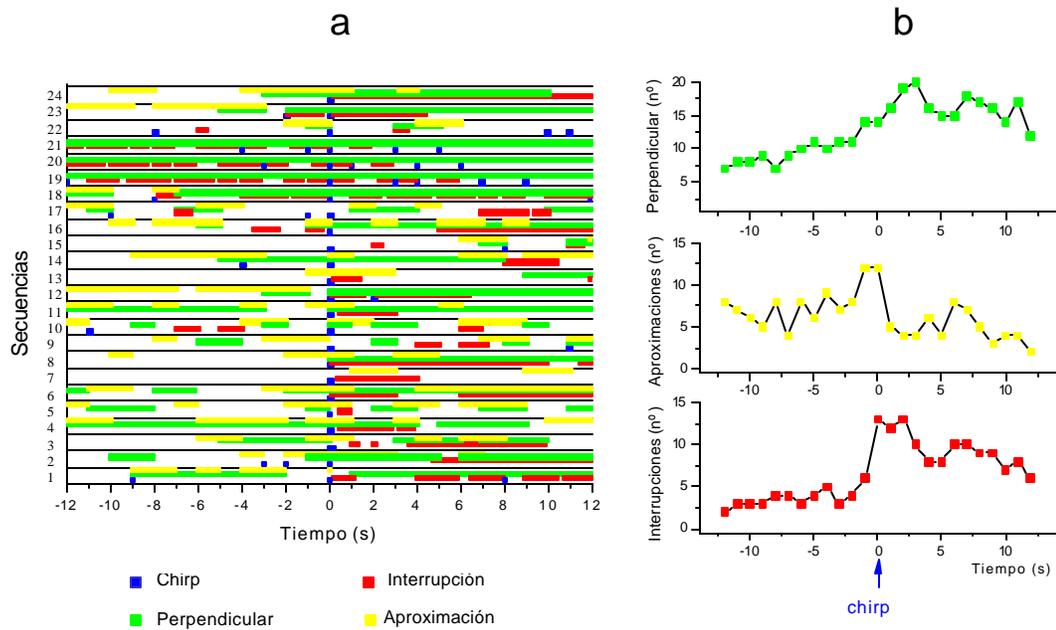
La estrategia de este trabajo se basa en el registro preliminar en el hábitat reproductivo de los despliegues eléctricos de cortejo en parejas sexualmente diferenciadas de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y su complementación con registros obtenidos en el laboratorio de los despliegues eléctricos y locomotores de cortejo. Este abordaje es, en sí mismo, un aporte de este trabajo ya que no existen estudios previos sobre conducta reproductiva en Gymnotiformes que complementen tan estrictamente datos obtenidos en la Naturaleza y en el laboratorio. La ventaja de que el hábitat reproductivo se encuentre a 300 km del laboratorio, nos permitió realizar el trabajo de campo con asiduidad, trasladar adecuadamente los ejemplares luego de su registro en el hábitat reproductivo y registrar a esos mismos individuos en el laboratorio pocas horas después.

Dado que no pudimos registrar con certeza el momento de la ovoposición ni de la espermiación del macho, los resultados obtenidos en la estación experimental del laboratorio cobran valor en tanto sean similares a los obtenidos en el hábitat reproductivo. Registramos chirps, interrupciones y un aumento de la frecuencia basal de la DOE de machos y hembras en el laboratorio indistinguibles de los registrados en la Naturaleza. Consideramos, entonces, estas modulaciones del ritmo de descarga como las señales características del cortejo de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* que cuantificamos y tomamos como referencia.

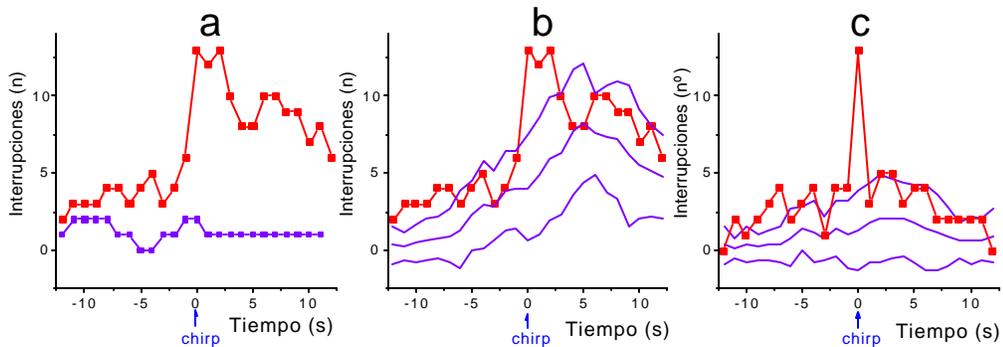
El porcentaje de parejas seleccionadas para el registro en la estación experimental que desarrollaron despliegues electrolocomotores de cortejo fue bajo y sólo se encontraron huevos en 2 ocasiones. En cambio, en los tanques exteriores de alojamiento, machos y hembras adquirieron y/o mantuvieron el dimorfismo sexual morfológico y electrofisiológico, y se consignó la presencia de crías en varias oportunidades. Nuestra primer interpretación de este bajo rendimiento es que no reprodujimos correctamente el hábitat reproductivo en la estación de registro del laboratorio. Es posible que la pecera de registro no tenga las dimensiones adecuadas o suficientes plantas. Las peceras usadas por otros autores para el estudio de la conducta reproductiva en Gymnotiformes son de mayores dimensiones (Kirschbaum 1979, Hagedorn & Heiligenberg 1985, Kawasaki & Heiligenberg 1989, Stoddard, comunicación personal). También es posible que las parejas de machos y hembras seleccionadas por tamaño no coincidieran con los machos y hembras dominantes de los tanques exteriores. Otro punto a considerar es la influencia del estrés asociado al pasaje de los peces desde el tanque exterior a la estación de registro y que el tiempo de aclimatación a las nuevas condiciones no haya sido suficiente.

### *Identificación de categorías conductuales*

Hay pocos antecedentes de la utilización del abordaje etológico para la descripción de distintos tipos de comportamientos en Gymnotiformes. La categorización de comportamientos complejos en unidades



**Figura II-11.** Asociación de despliegues locomotores y eléctricos durante las secuencias. **a.** Se representa la ocurrencia del estado espacial Perpendicular (verde), de la unidad dinámica Aproximación (amarillo) y de las interrupciones de hembra (rojo) en los segmentos de grabación (control + secuencia, n=24) alineados con la ocurrencia del chirp de macho (azul) en el instante cero. **b.** El número total de observaciones del estado espacial Perpendicular (verde), de la unidad dinámica Aproximación (amarillo) y de las interrupciones de hembra (rojo) registradas en los segmentos de grabación (control + secuencia, n=24) se representan en función del tiempo.



**Figura II-12.** Validación de la asociación de la emisión del chirp de macho e interrupción de la hembra como ejemplo de electrocomunicación. **a.** El número de interrupciones (rojo) observadas en los segmentos de grabación (control + secuencia, n=24) se compara con el número de interrupciones (violeta) observadas en el entorno de la emisión de 37 chirps seleccionados al azar entre los 374 chirps emitidos durante las tres noches de registro. **b.** El número de interrupciones (rojo) observadas en los segmentos de grabación (control + secuencia, n=24) se compara con el número de interrupciones (violeta, media  $\pm$  2 SD) observadas en los mismos segmentos de grabación luego de desorganizar la sucesión natural de eventos. **c.** El número de interrupciones medidas sólo al inicio (rojo) observadas en los segmentos de grabación (control + secuencia, n=24) se compara con el número de interrupciones (medidas sólo al inicio, violeta, media  $\pm$  2 SD) observadas en los mismos segmentos de grabación luego de desorganizar la sucesión natural de eventos.

conductuales sencillas para su caracterización y análisis cuantitativo sólo se ha realizado previamente en contadas ocasiones. En este sentido, se destaca el trabajo pionero de Black-Cleworth (1970), quien describió los despliegues locomotores y eléctricos de la conducta agresiva y de predación en *Gymnotus carapo*, definiendo unidades conductuales individuales que son de referencia obligada hasta hoy. Otros estudios destacables son: a) dominancia social en el comportamiento agresivo de *Gymnotus carapo* y de *Hypopomus artedi* (Westby 1975); b) comportamiento agonista en *Eigenmannia virescens* (Hopkins 1974a); c) dominancia relativa de machos en la interacción social de *Brachyhypopomus occidentalis* (Hagedorn & Zelick 1989); d) estrategias conductuales y sus consecuencias electrosensoriales en la captura de la presa por *Apteronotus albifrons* (Nelson & McIver 1999). Con respecto al comportamiento de cortejo en particular, existen pocos datos etológicos cuantitativos e intentos previos de discretización de secuencias en unidades conductuales sencillas (Hopkins 1974b, Kutz 1980). En este campo, el estudio de referencia en Gymnotiformes es el realizado en *Eigenmannia virescens* y *Apteronotus leptorhynchus* por Hagedorn y Heiligenberg (1985), quienes aportaron una descripción cualitativa de los despliegues locomotores y eléctricos de la conducta de cortejo de estas especies basada en 600 hs de observación en el laboratorio.

En este marco, la identificación de las categorías conductuales que permiten la descripción de los despliegues locomotores de la conducta de cortejo de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* es un aporte importante de este trabajo. Luego de una prolongada observación preliminar en campo abierto (50 hs aproximadamente), se optó por la definición de categorías conductuales sociales (referidas a la diada macho-hembra) y de dos tipos (estados espaciales y unidades dinámicas). Algunas de estas categorías (por ejemplo: Paralelos, Antiparalelos, Aproximación, Serpenteo) coinciden con las previamente descritas por otros autores para la caracterización de la conducta agonista en otros Gymnotiformes (Black-Cleworth 1970, Hopkins 1974a, Westby 1975). Las categorías conductuales definidas en este trabajo constituyen herramientas útiles para la caracterización detallada de secuencias electro-locomotoras

relevantes, que nos acercarán a la comprensión de la comunicación macho-hembra durante la conducta de cortejo en *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. Por otra parte, es probable que estas categorías conductuales sean también aplicables para la caracterización de los despliegues locomotores en especies emparentadas.

#### *Señales eléctricas propias de la conducta reproductiva*

Se han reportado diferentes modulaciones de frecuencia de la DOE (chirps, aceleraciones, interrupciones) como señales eléctricas propias de la conducta de cortejo en varias especies de Gymnotiformes (Hopkins 1974a, 1974b, Hagedorn & Heiligenberg 1985, Hagedorn 1988, Kawasaki & Heiligenberg 1989, Stoddard et al. 1996). En *Brachyhypopomus pinnicaudatus*, hemos registrado varios tipos de modulaciones del ritmo de descarga que se producen fundamentalmente durante el período reproductivo: chirps, que son producidos mayormente por los machos e interrupciones de la descarga, que son exclusivas de las hembras. Sólo se registraron eventuales chirps emitidos por hembras y no se observaron interrupciones de la descarga en machos.

Encontramos tres tipos básicos de chirps (Tipos A, B y C). Los Tipos A y B corresponden a los chirps fuertes ("strong") y el Tipo C a los chirps débiles ("weak") previamente descritos en *Brachyhypopomus brevisrostris* por Kawasaki & Heiligenberg (1989). Existen, además, múltiples chirps no contemplados por esta clasificación (intermedios y combinados). En cuanto a las interrupciones de la descarga, Kawasaki & Heiligenberg (1989) reportaron interrupciones bruscas y prolongadas de la DOE en machos y hembras de *Brachyhypopomus brevisrostris*, en tanto el patrón intermitente (patrón off-on-off-on) fue observado en *Brachyhypopomus occidentalis* por Hagedorn (1988).

El registro prolongado a lo largo de 6 hs por noche permitió demostrar que chirps e interrupciones se producen en ráfagas, separadas por intervalos de descarga basal estacionaria con escasas modulaciones vinculadas a movimientos durante el período reproductivo, en tanto sólo aparecen algunos chirps aislados en las noches del período no reproductivo. Las ráfagas están formadas por

chirps de todos los tipos, lo que sugiere un patrón de relevancia electrocomunicativa que no pudimos aún desentrañar. Se registraron chirps eventuales emitidos por machos y hembras fuera del período reproductivo que no coinciden exactamente con ninguno de los tipos descritos. Los chirps de macho Tipo A, B y C y las interrupciones de la DOE por parte de la hembra fueron exclusivamente observados durante el período reproductivo (tanto en el hábitat natural como en el laboratorio). En resumen, nuestros resultados indican que los despliegues eléctricos relevantes asociados al contexto comportamental de cortejo en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* consisten en: a) la emisión de múltiples señales organizadas en ráfagas; b) la producción por parte del macho de chirps de diferentes tipos (A, B, intermedios A-B, C y combinados); y c) la producción de interrupciones (prolongadas o en patrón intermitente) por parte de la hembra.

Las diferencias en el número y tipo de modulaciones de frecuencia observadas en el período reproductivo y fuera del mismo sugieren una dependencia hormonal en su producción. En *Eigenmannia virescens*, Hopkins (1974a) demostró que la duración de las interrupciones es mayor en contexto reproductivo que en encuentros agonistas. En *Apteronotus leptorhynchus*, se ha demostrado que la emisión de chirps depende de los niveles hormonales de testosterona y 11-ketotestosterona, lo que sugiere que las variaciones estacionales en las concentraciones plasmáticas de andrógenos regulan la producción de chirps en esta especie (Dulka & Maler 1994, Dunlap 2002). La temperatura también influye en la producción de modulaciones de frecuencia (Dunlap et al. 2000), pero la influencia de este factor no fue explorada en este estudio ya que no se realizaron controles a diferentes temperaturas durante el período reproductivo ni fuera del mismo.

El aumento de la frecuencia basal observado durante la noche es un dato esperable en peces de hábitos nocturnos que dependen de estas descargas para la electrolocalización. Black-Cleworth (1970) y Kawasaki & Heiligenberg (1989) describieron un aumento nocturno de la frecuencia basal en *Gymnotus carapo* y *Brachyhypopomus brevisrostris*, respectivamente, asociado al aumento de la actividad motora que se produce en la noche. En este estudio se demuestra un aumento

significativo de la frecuencia basal de la DOE en machos y hembras durante todo el año independiente de la actividad motora, ya que todas las mediciones se hicieron con ambos individuos en reposo. Dado que la frecuencia de descarga de la DOE depende linealmente de la temperatura en Gymnotiformes (Lissman 1958, Enger & Szabo 1968, Dunlap et al. 2000), la comparación podría hacerse por la relación entre ambas variables ( $Q_{10}$ ). El interés se centró en el incremento de la frecuencia basal, por lo que se calculó un índice (IFB<sub>ND</sub>) que nos permitió evaluar comparativamente el aumento observado entre individuos y a lo largo del año. Los valores del IFB<sub>ND</sub> fueron significativamente mayores durante el período reproductivo que los valores del IFB<sub>ND</sub> obtenidos fuera del período reproductivo (Fig. II-7). En base a estos resultados, concluimos que el aumento de la frecuencia basal observado en machos y hembras durante las noches del período reproductivo constituye una señal eléctrica propia del cortejo, y como tal, probablemente dependa de las variaciones estacionales de los niveles de hormonas esteroides gonadales. Nuestras observaciones sugieren que el incremento nocturno de la frecuencia basal está asociado a la ocurrencia de chirps e interrupciones ya que éstos sólo se observan “montados” sobre el incremento de la frecuencia basal. En este sentido, son ilustrativos los datos provenientes de una pareja registrada el hábitat reproductivo (Fig. II-4): el macho mostró un importante aumento de la frecuencia basal de la DOE (que alcanza más de 45 Hz a 21 °C!) y emitió 508 chirps, mientras que no se observaron señales eléctricas propias del cortejo (interrupciones, por ejemplo) en la hembra que sólo mostró un leve aumento de su frecuencia basal durante la noche.

#### *Electrocomunicación y asociación de despliegues eléctricos y locomotores*

Teniendo en cuenta que nuestros datos indican al chirp y a la interrupción de la DOE como las señales características del macho y de la hembra, respectivamente, durante el cortejo, se exploró la relación entre ambas. Para ello, se seleccionaron 24 secuencias que presentaron la emisión de un chirp por parte del macho seguido en menos de 10 s de una interrupción de hembra con el fin de demostrar: a) asociación de despliegues eléctricos específicos de cortejo con despliegues posturales y locomotores; y b) comunicación eléctrica entre macho y hembra

durante el cortejo. Estas secuencias no fueron frecuentes a lo largo de las noches de registro pero sí relevantes. Menos del 10% del total de chirps (24 en 374) fueron seguidos de interrupciones a lo largo de 3 noches de registro. Sin embargo, aproximadamente el 30% (39 de 126) de las interrupciones observadas en esas noches ocurre en el entorno de esos 24 chirps. Como se muestra en la Fig. II-12a, el número total de interrupciones observadas en el entorno de chirps seleccionados al azar es prácticamente cero, en tanto número de interrupciones observado en el entorno de la emisión de los chirps de las 24 secuencias seleccionadas es siempre mayor (sobretodo luego de la ocurrencia del chirp). El número de interrupciones observado en las secuencias se aparta del valor esperado de interrupciones en el entorno de la ocurrencia de un chirp cualquiera que se puede suponer igual a cero.

La observación de patrones locomotores particulares en el entorno inmediato del chirp y segundos posteriores surge de la comparación entre las secuencias y los segmentos de grabación inmediatamente previos (controles). Los histogramas porcentuales de tiempo de estados espaciales y unidades dinámicas, los diagramas de flujo de las transiciones más frecuentes y las gráficas de observaciones totales del estado espacial Perpendicular y la unidad dinámica Aproximación (Figs. II-9, 10 y 11, respectivamente) muestran perfiles diferentes en las secuencias y los controles. Analizados en conjunto, estos datos sugieren una organización de los despliegues locomotores en el entorno de la emisión del chirp frente a despliegues más variables observados previamente. Dentro de esta organización, se destaca la aproximación del macho a la hembra entre  $-1$  s y  $0$  s y el importante porcentaje de tiempo en que ambos peces permanecen en el estado espacial Perpendicular alternando entre las unidades dinámicas Aproximación, Alejamiento y Serpenteo.

Desde el punto de vista teórico, Schleidt (1973) y Heiligenberg (1977) sugirieron que la emisión de señales estereotipadas repetidas ejercen un efecto tónico motivacional sobre el receptor. Sin embargo, no son muchos los ejemplos en la literatura en los que se demuestre esta comunicación en el marco del comportamiento de cortejo (Hopkins 1974a, Hagedorn & Heiligenberg 1985, Dye 1987,

Shumway & Zelick 1988, Dunlap 2002). El análisis de la correlación entre la emisión del chirp por el macho y la interrupción de la DOE por la hembra dentro de las 24 secuencias seleccionadas en este trabajo aporta un nuevo ejemplo de electrocomunicación entre macho y hembra durante el cortejo. A pesar del sesgo introducido por el criterio de selección de las secuencias (presentar un chirp de macho seguido de una interrupción de hembra), la desorganización de la sucesión natural de eventos demostró que la ocurrencia de la interrupción inmediatamente post-chirp (entre  $0$  s y  $+1$  s) se aparta significativamente del valor esperado para  $p=0.05$  (Fig. II-12b). La ocurrencia de interrupciones previas al chirp también resultó significativamente mayor de lo esperado entre  $-12$  s y  $-6$  s. Esto probablemente responde a que las secuencias ocurren en ráfagas: ese aumento en el número de interrupciones antes del chirp corresponde a interrupciones que siguen a un chirp inmediatamente previo.

Dado que las interrupciones suelen durar varios segundos, el valor promedio de interrupciones es mayor después del chirp que antes del mismo aún en las secuencias desorganizadas (Figs. II-12b). Este aparente conflicto se resolvió consignando exclusivamente el comienzo de la interrupción (Fig. II-12c), en donde entendemos se demuestra claramente el aumento de la probabilidad de la interrupción de hembra inmediatamente después de la emisión del chirp por el macho.

## PERSPECTIVAS

En este capítulo se presentaron los datos más recientes de este trabajo de tesis y, por lo tanto, los que se encuentran en una fase más temprana de procesamiento y organización formal. Los resultados presentados aquí constituyen la primera etapa de un proyecto de investigación que involucra la participación de un equipo multidisciplinario en el estudio de la conducta reproductiva de *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. Se resumen a continuación los principales objetivos de este proyecto que está actualmente en desarrollo.

Se prevé completar la caracterización de la conducta de cortejo de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* a partir de la utilización de las categorías conductuales definidas en este estudio, así como ajustar los diferentes

abordajes experimentales: pecera de registro de mayores dimensiones, videofilmación con 2 cámaras de enfoques complementarios, registrar controles (individuos aislados, parejas macho-macho, hembra-hembra) y registrar la conducta en condiciones más naturales utilizando grupos sociales más numerosos.

En colaboración con el Grupo de Tratamiento de Imágenes (GTI) del Instituto de Ingeniería Eléctrica de la Facultad de Ingeniería, se propone automatizar el procesamiento de imágenes y registros eléctricos correspondientes. En este sentido, se prevén las siguientes etapas: a) creación de una interfaz gráfica para visualizar las señales de video y las señales eléctricas y para marcar las siluetas de interés; b) detección primero manual y luego automática de la silueta de los peces; y c) detección automática de patrones de comportamiento específico.

En colaboración con Angel Caputi (Laboratorio de Neurofisiología Comparada, IIBCE), se planea explorar las variaciones sexuales y estacionales de la imagen eléctrica de un pez percibida por un coespecimen cercano y su dependencia de los diferentes despliegues posturales.

Finalmente, se planea explorar las bases circuitales y celulares de las diferencias sexuales y estacionales en la producción de las señales eléctricas propias del cortejo (chirps e interrupciones). Se propone caracterizar los cambios celulares y circuitales que ocurren en el sistema de comando durante el ciclo reproductivo explorando en primer lugar la hipótesis de que existen diferencias estacionales y sexuales en la dotación de receptores glutamatérgicos en las células de relevo. En este marco, se plantea: a) comparar la respuesta electrofisiológica en el núcleo marcapaso bulbar a las inyecciones locales de agonistas y antagonistas glutamatérgicos en individuos adultos sexualmente diferenciados e indiferenciados; b) comparar la respuesta electrofisiológica frente a inyecciones locales de agonistas y antagonistas glutamatérgicos en los núcleos premarcapaso diencefálico (PPn) y sublemniscal (SPPn) en individuos adultos sexualmente diferenciados e indiferenciados para explorar la hipótesis alternativa de que los cambios iniciales ocurran en las regiones centrales que modulan la actividad del núcleo de comando; y c) estudiar la distribución de

receptores glutamatérgicos en el encéfalo de peces sexualmente diferenciados e indiferenciados.

## BIBLIOGRAFIA

- Assunção MIS, Schwassmann HO. 1992. Modos de reprodução do poraquê *Electrophorus electricus* (L.) (Gymnotiformes, Electrophoridae). Congr Latino-Amer Zool 406:102.
- Balon EK. 1975. Reproductive guilds of fishes: a proposal and definition. J Fish Res Board Can 32: 821-864.
- Balon EK. 1981. Additions and amendments to the classification of reproductive styles in fishes. Environ Biol Fishes 6: 377-390.
- Bastian J, Schniederjan S, Nguyenkim J. 2001. Arginine vasotocin modulates a sexually dimorphic communication behavior in the weakly electric fish *Apteronotus leptorhynchus*. J Exp Biol 294:1909-1923.
- Black-Cleworth P. 1970. The role of electrical discharges in the non-reproductive social behavior of *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Pisces). Anim Behav Monogr 3: 1-77.
- Bullock TH. 1969. Species differences in effect on electroreceptor input on electric organ pacemakers and other aspects of behavior in electric fish. Brain Behav Evol 2: 85-118.
- Dulka JG, Maler L. 1994. Testosterone modulates female chirping behavior in the weakly electric fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *Apteronotus leptorhynchus*. J Comp Physiol A 174: 331-343.
- Dunlap KD, Smith GT, Yekta A. 2000. Temperature dependence of electrocommunication signals and their underlying neural rhythms in the weakly electric fish, *Apteronotus leptorhynchus*. Brain Behav Evol 55:155-162.
- Dunlap KD. 2002. Hormonal and body size correlates of electrocommunication behavior during dyadic interactions in a weakly electric fish, *Apteronotus leptorhynchus*. Hormones & Behaviour 41: 187-194.
- Dye J. 1987. Dynamics and stimulus-dependence of pacemaker control during behavioral modulations in the weakly electric fish *Apteronotus*. J Comp Physiol A 161: 175-185.
- Enger PS, Szabo T. 1968. Effect of temperature on the discharge rates of the electric organ of some gymnotids. Comp Biochem Physiol 27: 625-627.
- Engler G, Fogarty CM, Banks JR, Zupanc GKH. 2000. Spontaneous modulations of the electric organ discharge in the weakly electric fish *Apteronotus leptorhynchus*: a biophysical and behavioral analysis. J Comp Physiol A 186: 645-660.
- Hagedorn M, Carr C. 1985. Single electrocytes produce a sexually dimorphic signal in South American electric fish *Hypopomus occidentalis* (Gymnotiformes, Hypopomidae). J Comp Physiol 156: 511-523.
- Hagedorn M Heiligenberg W. 1985. Court and spark: electric signals in the courtship and mating of gymnotoid fish. Anim Behav 33: 254-265.
- Hagedorn M. 1988. Ecology and behavior of a pulse-type electric fish *Hypopomus occidentalis* (Gymnotiformes, Hypopomidae) in a fresh-water stream in Panama. Copeia 2:324-335.
- Hagedorn M, Zelick R. 1989. Relative dominance among males is expressed in the electric organ discharge characteristics of a weakly electric fish. Anim Behav 38: 520-525.

- Heiligenberg W. 1977. Releasing and motivating functions of stimulus patterns in animal behavior: The ends of a spectrum. En: Wenzel BM, Zeigler HP (eds), Tonic functions of sensory systems. Ann NY Acad Sci 290: 60-71.
- Hopkins CD. 1974a. Electric communication: functions in the social behavior of *Eigenmannia virescens*. Behaviour 50: 270-305.
- Hopkins CD. 1974b. Electric communication in the reproductive behavior of *Sternopygus macrurus* (Gymnotoidei). Z Tierpsychol 35:518-535.
- Hopkins CD, Comfort NC, Bastian J, Bass AH. 1990. Functional analysis of sexual dimorphism in an electric fish, *Hypopomus pinnicaudatus*, Order Gymnotiformes. Brain Behav Evol 35: 350-367.
- Hopkins CD. 1991. *Hypopomus pinnicaudatus* (Hypopomidae) a new species of gymnotiform fish from French Guiana. Copeia 1: 151-161.
- Houde AE. 1997. Sex, color, and mate choice in guppies. En: Krebs JR, Clutton-Brock TH (eds), Monographs in behavior and ecology. Princeton Univ Press. Princeton. 224 pp.
- Kawasaki M, Maler L, Rose GJ, Heiligenberg W. 1988. Anatomical and functional organization of the prepacemaker nucleus in gymnotiform electric fish: the accommodation of two behaviors in one nucleus. J Comp Neurol 276: 113-131.
- Kawasaki M, Heiligenberg W. 1989. Distinct mechanisms of modulation in a neuronal oscillator generate different signals in the electric fish *Hypopomus*. J Comp Physiol A 165: 731-741.
- Kawasaki M, Heiligenberg W. 1990. Different classes of glutamate receptors and GABA mediate distinct modulations of a neuronal oscillator, the medullary pacemaker of a gymnotiform electric fish. J Neurosci 10 (12): 3896-3904.
- Keller CH, Kawasaki M, Heiligenberg W. 1991. The control of pacemaker modulations for social communication in the weakly electric fish *Sternopygus*. J Comp Physiol A 169: 441-450.
- Kirschbaum F. 1979. Reproduction of the weakly electric fish *Eigenmannia virescens* (Rhamphichthyidae, Teleostei) in captivity. Behav Ecol Sociobiol 4: 331-355.
- Krebs JR, Davies NB. 1993. An introduction to behavioural ecology. Blackwell Scientific Publ. London. 420 pp.
- Kutz D. 1980. Untersuchungen zum sozial- und fortpflanzungsverhalten des schwachelectrischen fisches *Eigenmannia virescens* (Gymnotoidei, Pisces). Diplomarbeit Univ Köln. 90 pp.
- Larimer JL, MacDonald JA. 1968. Sensory feedback from electroreceptors to electromotor pacemaker centers in gymnotids. Am J Physiol 214: 1253-1261.
- Lehner PN. 1996. Handbook of ethological methods. Cambridge University Press. 2<sup>nd</sup> edition. 672 pp.
- Liley NR, Stacey NE. 1983. Hormones, pheromones, and reproductive behavior in fish. En: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (eds), Fish Physiology. Academic Press. London. Vol IX (Part B): 1-63.
- Lissman H. 1958. On the function and evolution of electric organs in fish. J Exp Biol 35: 156-191.
- Meffe GK, Snellson EE. 1989. Ecology and evolution of livebearing fishes. Prentice Hall, Englewood Cliffs. New Jersey.
- Nelson ME, Mclver MA. 1999. Prey capture in the weakly electric fish *Apteronotus albifrons*: sensory acquisition strategies and electroensory consequences. J Exp Biol 202: 1195-1203.
- Sargent RC, Rush VN, Wisenden BD, Yan HY. 1998. Courtship and mate choice in fishes: integrating behavioral and sensory ecology. Am Zool 38 (1): 82-96.
- Schleidt WM. 1973. Tonic communication: continual effects of discrete signs in animal communication systems. J Theor Biol 42: 359-386.
- Shumway CA, Zelick RD. 1988. Sex recognition and neuronal coding of electric organ discharge waveform in the pulse-type weakly electric fish *Hypopomus occidentalis*. J Comp Physiol A 163: 465-478.
- Silva A, Quintana L, Galeano M, Errandonea P, Macadar O. 1999. Water temperature sensitivity of EOD waveform in *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. J Comp Physiol A 185: 187-197.
- Slater PJB. 1975. Describing sequences of behavior. En: Bateson PPG, Kopfer PH HP (eds), Perspectives in ethology. Plenum Press. New York: 131-153.
- Spiro JE. 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.
- Stoddard PK, Kilburn MD, Patterson KH. 1996. Complex electric signal structure in reproducing gymnotiform electric fish. NeuroSci Abs 179.6.
- Tinbergen N. 1951. The study of instinct. Oxford University Press. New York.
- Westby GWM. 1975. Comparative studies of the aggressive behaviour of two gymnotid electric fish (*Gymnotus carapo* and *Hypopomus artedi*). Anim Behav 23: 192-213.
- Wootton RJ. 1976. The biology of sticklebacks. Academic Press. London. 387 pp.
- Zakon HH, Thomas P, Yan H. 1991. Electric organ discharge frequency and plasma steroid levels during gónada recrudescence in a natural population of the weakly electric fish *Sternopygus macrurus*. J Comp Physiol A 169: 493-499.
- Zupanc CKH, Maler L. 1993. Evoked chirping in the weakly electric fish *Apteronotus leptorhynchus* a quantitative biophysical analysis. Can J Zool 71:2301-2310.

---

## CAPITULO III

### Influencias hormonales y ambientales sobre la forma de onda de la DOE en Gymnotiformes

---

Los peces son animales poiquiloterms, por lo que los cambios de la temperatura ambiente tienen un gran impacto sobre la fisiología de estos animales. La temperatura influye sobre todos los sistemas biológicos actuando a distintos niveles, y puede ser analizada como un factor ambiental o como un parámetro físico.

La temperatura ambiental limita la distribución de los organismos vivos y es un factor importante en la determinación de su actividad. La fisiología de los peces está precisamente ajustada a la temperatura ambiente. Un cambio en la temperatura del agua afecta prácticamente todos sus procesos fisiológicos. Por ejemplo, la temperatura determina directamente la actividad enzimática y las interacciones receptor-ligando (Hazel 1993) y afecta la conducción nerviosa (Harper et al. 1990).

Cada especie de peces teleósteos tiene su rango de temperatura óptima propio. Existen peces estenotérmicos (salmónidos) que sobreviven en un rango pequeño de temperaturas, y peces euriotérmicos que toleran amplios rangos (*Cyprinus carpio*: 0-32 °C, Elliot 1991; Gymnotiformes del clima templado: 8-33 °C, Capítulo I). La mayoría de los peces experimentan a lo largo de su vida cambios importantes de temperatura, especialmente en cuerpos de agua dulce pequeños, y poseen estrategias específicas para hacer frente a estos cambios (Van den Burg 2002). La opción menos costosa desde el punto de vista energético es evitar el cambio de temperatura por movimientos verticales en la columna de agua. La verdadera aclimatación a la nueva temperatura se estima que se produce en 3-4 días. Los cambios graduales de temperatura pueden ser compensados, pero cambios bruscos pueden salirse del rango homeostático y actuar como un estímulo estresante. El estímulo estresante inicia la respuesta al estrés que se caracteriza por la activación de los ejes simpático-cromafín e

hipotálamo-hipófiso-interrenal (Van der Burg 2002).

Muchos animales presentan reproducción cíclica determinada o disparada por cambios ambientales de la temperatura que modifican el equilibrio neuro-endócrino actuando sobre el eje hipotálamo-hipofisario y/o directamente sobre las glándulas endócrinas periféricas. Las variaciones estacionales de la temperatura del agua son uno de los factores temporizadores ("zeitgeber") demostrados que controlan la reproducción periódica en peces de las regiones templada y subtropical (Lam 1983, Prosser & Heath 1991, Kirschbaum 2000). El **Capítulo III-A.** (La temperatura como factor ambiental temporizador del período reproductivo en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* de la zona templada) presenta evidencias sobre el rol de la temperatura y organiza los resultados sobre la hipótesis de que la temperatura del agua es el principal factor ambiental para el inicio de la estación reproductiva en Gymnotiformes de pulso de la zona templada. Los datos de este capítulo complementan el trabajo de campo realizado en una población de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* de la laguna El Tigre presentado en el Capítulo I-B.

La temperatura también actúa como un parámetro físico que afecta el comportamiento animal a través de su acción sobre la transmisión sináptica, integración postsináptica, disparo y conducción del potencial de acción. Estas funciones, a su vez, están determinadas por diferentes propiedades de membrana moduladas por temperatura (Montgomery & MacDonald 1990, Kuyucak & Chung 1994): a) composición de la bicapa lipídica; b) difusión de iones en solución; c) biofísica de los canales iónicos (conductancias, cinéticas, propiedades de compuerta, probabilidad de apertura, etc). El **Capítulo III-B.** (Termosensibilidad de la DOE en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y *Gymnotus carapo*) describe un fenómeno inesperado y

novedoso dependiente de la temperatura que denominamos termosensibilidad de la DOE (cambios persistentes de la forma de onda de la DOE inducidos por saltos de temperatura). En este capítulo se discuten los mecanismos subyacentes a la termosensibilidad de la DOE y la interacción entre los efectos de la temperatura y de las hormonas esteroides gonadales sobre la forma de onda de la DOE.

Este capítulo se organizó tomando como base el artículo de revisión titulado "Environmental and hormonal influences upon EOD waveform in pulse-Gymnotiformes" de los autores Silva A, Quintana L, Ardanaz JL, Macadar O, aceptado para su publicación en el Journal of Physiology Paris. Por otra parte, los resultados de este capítulo forman parte de las siguientes publicaciones que se adjuntan en versión electrónica en el CD anexo:

- The electric organ discharge of *Brachyhypopomus pinnicaudatus*  
Caputi AA, Silva A, Macadar O  
Brain Behavior and Evolution. 1998. 52: 148-158
- Water temperature sensitivity of EOD waveform in *Brachyhypopomus pinnicaudatus*  
Silva A, Quintana L, Galeano M, Errandonea P, Macadar O  
Journal of Comparative Physiology A. 1999. 185: 187-197
- Temperature sensitivity of the electric organ discharge waveform in *Gymnotus carapo*  
Ardanaz JL, Silva A, Macadar O  
Journal of Comparative Physiology A. 2001. 187: 853-864

### III-A. La temperatura como factor ambiental temporizador del período reproductivo en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* de la zona templada

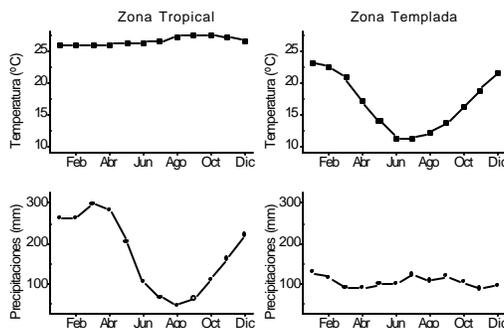
#### ANTECEDENTES

La interacción dinámica de un animal y su ambiente impone requerimientos fisiológicos para lograr el mantenimiento de la homeostasis. El animal se enfrenta a un ambiente cambiante y debe poner en marcha varios mecanismos comportamentales y fisiológicos para favorecer su aclimatación a las nuevas condiciones del entorno. Además de la necesaria adaptación de los organismos vivos a un medio externo variable, los animales sensan determinados cambios ambientales periódicos y utilizan esa información para acompasar sus ritmos biológicos. La existencia de ciclos reproductivos, en particular, demuestra que los animales son capaces de evaluar temporalmente los cambios ambientales y utilizar esta información para ubicar la reproducción en el momento del año en que las condiciones son más propicias para la supervivencia de la cría (Lam 1983). Las variaciones estacionales del fotoperíodo, de la temperatura y de las interacciones entre ambos son demostrados factores temporizadores (zeitgebers) que controlan la reproducción de peces teleósteos de las

regiones templada y subtropical (Lam 1983, Prosser & Heath 1991, Kirschbaum 2000).

Como se detalla en los antecedentes del Capítulo I-B, los ciclos reproductivos de los peces Gymnotiformes fueron analizados previamente sólo en la zona tropical. Los trabajos de Kirschbaum (1979, 1995, 2000) fueron pioneros en desentrañar claves ambientales novedosas vinculadas al disparo de la estación reproductiva en Gymnotiformes. En la zona tropical, aún en ausencia de cambios cíclicos de fotoperíodo y temperatura, estos peces se reproducen en respuesta al aumento del nivel de agua y concomitante disminución de su conductividad eléctrica que ocurren durante la estación lluviosa. Kirschbaum (1979, 1995, 2000) fue capaz de reproducir en cautiverio varias especies de Gymnotiformes remedando artificialmente estas condiciones ambientales propias de la estación lluviosa, sugiriendo la existencia de un mecanismo general en el control ambiental de la reproducción en Gymnotiformes. Sin embargo, en el límite sur de la distribución de Gymnotiformes en América, que se ubica en la zona templada, es poco probable que éstas sean las claves ambientales que

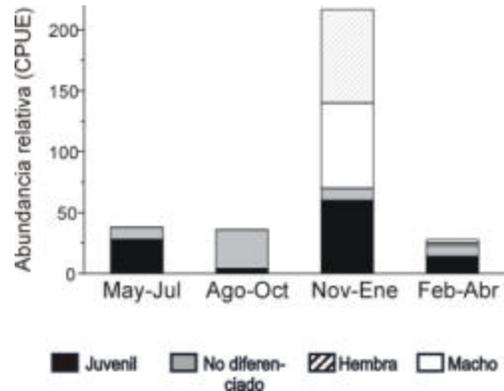
efectivamente señalicen el momento propicio para la reproducción en la Naturaleza. En la Fig. III-1 se representan comparativamente los promedios mensuales de temperatura ambiente (aire) y de precipitaciones obtenidos de dos estaciones meteorológicas ubicadas en la zona tropical (Manaos, 3.13 °S, 60 °O) y templada (Treinta y Tres, 33.18 °S, 54.35 °O), respectivamente. En la zona tropical la temperatura se mantiene relativamente constante a lo largo del año y las precipitaciones varían estacionalmente (su incremento trae aparejado elevación de los niveles de agua y disminución de la conductividad eléctrica). En la zona templada, se observa una situación opuesta: las precipitaciones se mantienen constantes y la temperatura presenta importantes variaciones estacionales.



**Figura III-1.** Cambios estacionales de factores ambientales en las zonas tropical y templada. Los datos fueron obtenidos del Global Historical Climatology Network en [www.worldclimate.com](http://www.worldclimate.com) a partir de dos estaciones meteorológicas: Manaus (3.13 °S, 60 °O) en la zona tropical y Treinta y Tres (33.18 °S, 54.35 °O) en la zona templada. Los valores representan promedios mensuales de más de 40 años en todos los casos.

El eje hipotálamo-hipofisario en teleósteos ocupa un lugar central en la adaptación a los cambios ambientales, aunque no se conoce con precisión la vía por la cual los factores ambientales influyen sobre el sistema neuroendócrino. La región preóptica del hipotálamo se ha vinculado con la percepción de cambios de temperatura en varias especies por contener neuronas sensibles a la temperatura (Nelson & Prosser 1981). En ciprínidos se ha demostrado que las variaciones estacionales de la temperatura son el principal factor ambiental temporizador del período reproductivo. En estos peces se ha podido demostrar la siguiente vía: la temperatura elevada produce un aumento de la respuesta hipofisaria frente al factor

hipotalámico GnRH, lo que resulta en un aumento de la liberación basal de gonadotropina hipofisaria, que a su vez induce madurez gonadal demostrada por aumento del índice gonadosomático y elevación de los niveles de testosterona (Hontela & Peter 1978, Breton et al. 1980a, 1980b, Peter 1981, Razani et al. 1988a, 1988b, Lin et al. 1996).



**Figura III-2.** Estructura de la población de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* en la laguna El Tigre. Se representa la abundancia relativa de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* (CPUE, peces hs<sup>-1</sup>) colectados durante el año: juveniles (negro), adultos sexualmente indiferenciados (gris), hembras (rayado) y machos (blanco).

El estudio de las modificaciones anuales en la estructura de una población de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* de la zona templada fue realizado en la laguna El Tigre (Depto. de Treinta y Tres, 33.18 °S, 54.35 °O) y presentado en el Capítulo IB. Resumiendo estos resultados, el período reproductivo de esta población ocurre entre los meses de noviembre, diciembre y enero, ya que en este momento del año se detectó la presencia de adultos sexualmente diferenciados y un brusco incremento en la abundancia relativa de juveniles (Fig. III-2). El estudio complementario de las variaciones de la histología gonadal a lo largo del año en la misma población de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* confirmó el momento de ocurrencia del período reproductivo (Quintana 2001). En julio, los testículos mostraban abundante número de espermatogonias y muy pocos espermatozoides, y los ovarios presentaban abundantes ovocitos previtelogénicos o en vitelogénesis temprana. En diciembre, los testículos presentaban muchos cistos de espermátidas y espermatozoides en la luz de los tubos

seminíferos, y los ovarios presentaban ovocitos en vitelogénesis proteica avanzada e incluso folículos post-ovulatorios. En resumen, los antecedentes específicos de este trabajo señalan que las variaciones anuales de la madurez gonadal y de la estructura de una población de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* de la zona templada se correlacionan con las variaciones anuales de la temperatura del agua.

## OBJETIVOS

En base a los antecedentes expuestos, se elaboró la siguiente hipótesis de trabajo: el aumento de los valores promedio de la temperatura del agua observados en la Naturaleza es el estímulo que desencadena el período reproductivo en Gymnotiformes del clima templado.

Se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar la diferenciación sexual en *Brachyhypopomus pinnicaudatus*.
- Analizar las variaciones estacionales del dimorfismo sexual de la DOE en machos de *Brachyhypopomus pinnicaudatus*.
- Evaluar el efecto de la temperatura del agua alta y sostenida sobre la diferenciación sexual electrofisiológica en *Brachyhypopomus pinnicaudatus*.

## MÉTODOS

Este trabajo se realizó con ejemplares adultos de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* (n=46) provenientes de la laguna El Tigre (Depto. de Treinta y Tres, 33.18 °S, 54.35 °O).

### Registro de la DOE

Se obtuvieron registros cabeza-cola siguiendo los procedimientos descritos en Caputi et al. (1998) y Silva et al. (1999). Se colocó el pez en un cilindro de plástico fenestrado de 3 cm de diámetro cuyo largo se adapta a la longitud del animal para evitar que los movimientos del pez interfirieran con el registro. Este tubo se sumergió en un recipiente con agua de mayor tamaño (50x40x20 cm) para evitar variaciones de temperatura. Se obtuvieron registros cabeza-cola de la DOE a partir de electrodos ubicados en los extremos de dicho tubo. La señal obtenida se amplificó mediante un amplificador Proan 2 y la señal amplificada se

conectó a una de las entradas de un osciloscopio digital portátil, en cuya pantalla se observó la forma de onda de la DOE registrada en cada caso. Los registros electrofisiológicos digitizados por medio de la tarjeta convertora análogo-digital (Labmaster DMA 120) fueron adquiridos con los programas Axotape o TEK (software especialmente diseñado en nuestro laboratorio).

El control de la temperatura se hizo con un termómetro digital Lutron TM915. La sonda de dicho termómetro se colocó dentro del tubo en la cercanía del pez (1-5 mm). Todos los registros se realizaron a 20-21 °C.

La caracterización de la diferenciación sexual, se realizó en 24 individuos (12 machos y 12 hembras) capturados en los meses de noviembre y diciembre (Fig. III-3). La diferenciación sexual se evaluó por: a) el largo corporal; b) la relación entre las duraciones de ambos componentes de la DOE: duración P2/duración P1 (DP2/DP1); y c) frecuencia de máxima potencia en la representación espectral de potencias de la DOE. La medición de DP2/DP1 se realizó al 10% de la amplitud de cada fase de la DOE (procedimiento modificado de Hagedorn & Carr 1985, Hopkins et al. 1990).

Las variaciones estacionales de la relación DP2/DP1 se evaluaron en peces capturados en junio (n=6), octubre (n=5) y diciembre (n=6). La determinación de sexo se realizó posteriormente por observación directa de las gónadas.

### Aclimatación: inducción experimental de diferenciación sexual

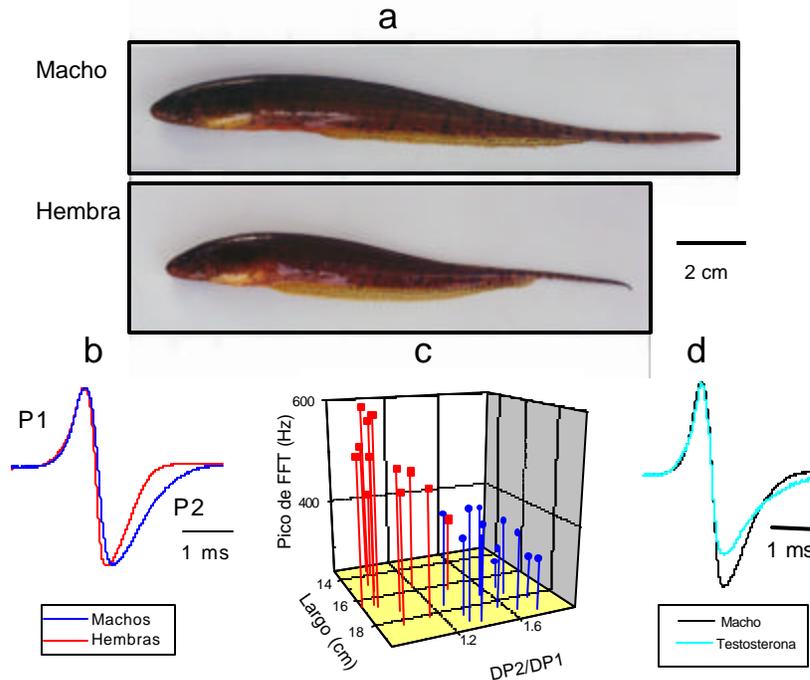
Para el diseño de estos experimentos se tomaron en cuenta los antecedentes relacionados con el mantenimiento o pérdida de la diferenciación sexual en cautiverio. Se ha observado que la expresión del dimorfismo sexual electrofisiológico decae en estas condiciones probablemente debido a un efecto drástico del cautiverio sobre el sistema neuro-endócrino (Landsman 1991, 1993, 1995). El dimorfismo sexual electrofisiológico y morfológico de los machos de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* declina en 15 días de cautiverio (alojamiento en peceras individuales, 20 °C) y desaparece totalmente luego de 1 mes (Silva et al. 1999).

El aumento progresivo de la temperatura promedio del agua observado en la Naturaleza en la época pre-reproductiva se sustituyó en el laboratorio por medio de experimentos de aclimatación. Estos consistieron en colocar ejemplares adultos de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* sexualmente indiferenciados (n=12) en peceras individuales con temperatura elevada y sostenida (28-29 °C) durante 1 mes. Durante este período, el ciclo luz-oscuridad y la conductividad eléctrica del agua se mantuvieron constantes (12:12 hs y 100  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , respectivamente). Cada 10 días, se realizaron

registros de la DOE y se midió la diferenciación electrofisiológica a través del índice DP2/DP1.

Luego de 30 días de aclimatación, los peces fueron sacrificados y se determinó su sexo por observación directa de las gónadas. Este experimento se realizó con peces capturados en

julio de 1999 que se aclimataron en agosto (n=6: 4 machos y 2 hembras) y se repitió con peces capturados en setiembre de 1999 que se aclimataron en octubre (n=6: 4 machos y 2 hembras).



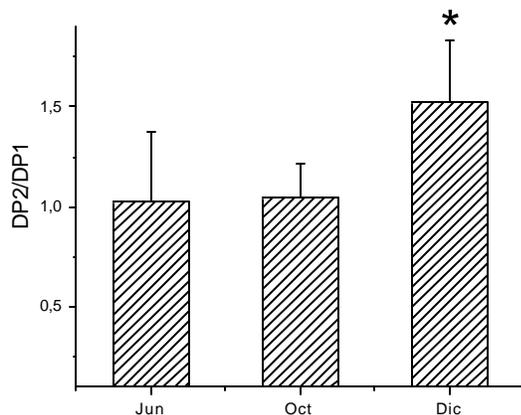
**Figura III-3.** Dimorfismo sexual morfológico y eléctrico en *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. **a.** Ejemplares de adultos sexualmente diferenciados (macho y hembra). **b.** DOEs promediadas de 5 machos (azul) y 5 hembras (rojo) registradas a 21 °C con sus fases cabeza-positiva (P1) y cabeza-negativa (P2). Los registros fueron normalizados en amplitud con respecto a P1 para favorecer comparaciones, por lo que no se agrega calibración de amplitud. **c.** Tres parámetros caracterizan el dimorfismo sexual: largo corporal, significativamente mayor en machos que en hembras (test de t,  $p < 0.01$ ,  $n = 12$ ); relación entre las duraciones de la fase negativa y positiva de la DOE (DP2/DP1), significativamente mayor en machos que en hembras (test de t,  $p < 0.01$ ,  $n = 12$ ); y frecuencia de máxima potencia en la representación espectral de las potencias de la DOE, que fue significativamente menor en machos que en hembras (test de t,  $p < 0.01$ ,  $n = 12$ ). **d.** Registros normalizados superpuestos de las DOEs de un macho sexualmente diferenciado (negro) y de un adulto sexualmente indiferenciado 15 días después de la administración de testosterona (celeste). La testosterona remedia el dimorfismo sexual electrofisiológico, P2 tiene mayor duración en ambos casos (DP2/DP1=1.85 para el macho y 1.99 para el individuo tratado con testosterona).

## RESULTADOS

Durante el período reproductivo, *Brachyhypopomus pinnicaudatus* presenta un dimorfismo sexual morfológico y electrofisiológico inicialmente descrito por Hopkins et al. (1990) y Hopkins (1991). Como se observa en la Fig. III-3a, la hembra presenta un extremo caudal delgado y cilíndrico, y gónadas protruyentes en la

región abdominal ventral. El macho es de mayor tamaño, fundamentalmente a expensas de su filamento caudal encintado. El dimorfismo sexual también se puede observar a nivel de la DOE: la duración de la DOE es mayor en machos por un aumento principalmente de la duración de P2 (Fig. III-3b). Se seleccionaron 3 parámetros para caracterizar cuantitativamente este dimorfismo sexual que se muestran en la Fig. III-3c: a) largo corporal, que fue

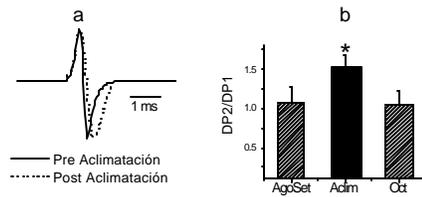
significativamente distinto en machos y hembras (test de t,  $p < 0.01$ ,  $n = 12$ , machos:  $18.3 \pm 0.76$  cm, hembras:  $16.2 \pm 1.5$  cm); b) relación entre las duraciones de la fase negativa y positiva de la DOE (duración P2/duración P1, DP2/DP1) que fue significativamente mayor en machos que en hembras (test de t,  $p < 0.01$ ,  $n = 12$ , machos:  $1.5 \pm 0.18$ , hembras:  $1.05 \pm 0.16$ ); y c) frecuencia de máxima potencia en la representación espectral de las potencias de la DOE, que se relaciona con la duración de la DOE y que fue significativamente menor en machos que en hembras (test de t,  $p < 0.01$ ,  $n = 12$ , machos:  $383.8 \pm 43.12$  Hz, hembras:  $506.6 \pm 64.22$  Hz). Este dimorfismo sexual depende de la acción de hormonas esteroides gonadales actuando directamente sobre el órgano eléctrico (Meyer 1983, Hagedorn & Carr 1985). La diferenciación sexual morfológica y electrofisiológica del macho puede remedarse por administración de andrógenos. Como se muestra en la Fig. III-3d, la DOE de un macho sexualmente diferenciado de *Brachyhyopomus pinnicaudatus* es muy similar a la DOE provocada por testosterona en un adulto indiferenciado: la relación DP2/DP1 es de 1.85 y 1.99, respectivamente.



**Figura III-4.** Variaciones estacionales del dimorfismo sexual eléctrico de machos de *Brachyhyopomus pinnicaudatus*. Se representa la relación de duraciones DP2/DP1 (promedio  $\pm$  desvío estándar) en junio ( $n = 6$ ), octubre ( $n = 5$ ) y diciembre ( $n = 6$ ). Los valores obtenidos en diciembre fueron significativamente mayores que los de junio y que los de octubre (\*, test de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ).

Se seleccionó la relación entre las duraciones de ambas fases de la DOE (DP2/DP1) para evaluar las variaciones estacionales del dimorfismo electrofisiológico de machos de *Brachyhyopomus pinnicaudatus*. Como se observa en la Fig. III-4, la relación DP2/DP1 crece progresivamente durante la transición entre la estación no reproductiva y reproductiva (de junio a diciembre). En junio la relación DP2/DP1 alcanza un valor promedio ( $\pm$  desvío estándar) de  $1.03 \pm 0.14$  y en octubre de  $1.05 \pm 0.17$ . Ambos valores resultaron significativamente menores que el valor de DP2/DP1 observado en diciembre de  $1.52 \pm 0.32$  (\* en Fig. III-4, test de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ,  $n_1 = 6$ ,  $n_2 = 6$ ,  $n_1 = 5$ ,  $n_2 = 6$ ).

Para evaluar el rol que cumple la temperatura en el inicio del período reproductivo, se realizaron experimentos de aclimatación térmica a temperatura elevada ( $28-29$  °C) y se controlaron los efectos sobre el dimorfismo electrofisiológico en machos de *Brachyhyopomus pinnicaudatus*. Se registró la DOE y la relación DP2/DP1 en 4 machos capturados en julio, que luego fueron aclimatados durante el mes de agosto. Como se muestra en un ejemplo en la Fig. II-5a, la duración de P2 se incrementó durante la aclimatación, resultando una DOE similar a la observada en los machos durante el período reproductivo natural o luego de la administración de testosterona (comparar con Fig. III-3). La relación DP2/DP1 aumentó luego de la aclimatación de  $1.18 \pm 0.07$  a  $1.43 \pm 0.17$  (este aumento no fue significativo, test de Mann-Whitney,  $p > 0.05$ ,  $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 4$ ). El mismo experimento se repitió con peces capturados en setiembre y aclimatados a  $28-29$  °C durante octubre. En este caso, la relación DP2/DP1 aumentó de  $1.26 \pm 0.14$  pre-aclimatación a  $1.51 \pm 0.17$  luego de la aclimatación (este aumento no fue significativo, test de Mann-Whitney,  $p > 0.05$ ,  $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 4$ ). Los valores de DP2/DP1 alcanzados por aclimatación son comparables con los observados en la Naturaleza en diciembre. Los valores de DP2/DP1 observados post-aclimatación en octubre se compararon con los provenientes de la Naturaleza de peces colectados en agosto-setiembre y octubre y resultaron significativamente mayores (\* en Fig. III-5b, test de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ,  $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 5$ ,  $n_1 = 4$ ,  $n_2 = 5$ ). En ninguno de los casos se observaron cambios en la morfología externa de los peces antes y después de la aclimatación.



**Figura III-5.** Inducción del dimorfismo sexual eléctrico en machos de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* por aclimatación. **a.** Registros normalizados superpuestos de la DOE de un macho colectado en julio antes (negro) y 30 días después (punteado) de ser aclimatado a temperatura alta y sostenida (28-29 °C). **b.** Se representa la relación DP2/DP1 (promedio ± desvío estándar) de machos colectados del hábitat natural en agosto-setiembre y octubre (barras rayadas, n=5) y de machos colectados en setiembre y aclimatados durante 30 días a 28-29 °C (barra negra, n=4). Los valores obtenidos post-aclimatación fueron significativamente mayores que los valores obtenidos en la Naturaleza en agosto-setiembre y octubre (\*, test de Mann-Whitney, p<0.05).

## DISCUSION

El estudio del ciclo reproductivo de los Gymnotiformes se aborda en este trabajo desde la perspectiva del clima templado. Al no existir en Uruguay (30-35 °S) alternancia de estaciones secas y lluviosas, este estudio se centra en el rol de las variaciones estacionales de la temperatura del agua como factor ambiental temporizador del período reproductivo. La estrategia del estudio lleva a la discusión de tres aspectos encadenados lógicamente: a) ciclo anual de una población de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* considerando cambios de la morfología externa, histología gonadal y de la forma de onda de la DOE; b) correlación de estos cambios con las variaciones estacionales de la temperatura del agua observadas en la Naturaleza; y c) inducción experimental de madurez gonadal y el subsecuente dimorfismo sexual por manipulación de la temperatura.

La madurez sexual a lo largo del ciclo anual de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* fue evaluada directamente a nivel gonadal por Quintana (2001) en machos y hembras. En este trabajo se evaluaron diferencias

sexuales morfológicas (Capítulo I-B) y electrofisiológicas consideradas indicadores de madurez sexual. Estos indicadores deben cumplir con ciertos requisitos para poder ser considerados como tales: a) presentar cambios estacionales correlacionados con la alternancia de las estaciones reproductiva y no reproductiva; b) ser dependientes de hormonas esteroides gonadales; y c) ser inducibles por manipulación del factor ambiental involucrado en el disparo del período reproductivo. En este sentido, el dimorfismo sexual del macho de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* tanto morfológico (ensanchamiento del filamento caudal) como eléctrico (aumento de la duración de P2) cumplieron los requisitos como para ser considerados indicadores de madurez sexual y fueron seleccionados para la realización de este estudio. No se presentaron datos obtenidos en hembras ya que su dimorfismo sexual es más difícil de cuantificar. Por otra parte, los experimentos de aclimatación se hicieron con individuos adultos indiferenciados, que por inspección gonadal posterior resultaron ser mayormente machos.

Se evaluó a lo largo del año la progresión de: a) la composición de la población muestreada en el Tigre (presentada en Capítulo I-B), b) histología gonadal (Quintana 2001) y c) DP2/DP1 (presentada en este capítulo). Las progresiones de estos parámetros son obviamente coherentes e indican la ocurrencia del período reproductivo entre los meses de noviembre y enero. Todos los indicadores de madurez sexual indican que el período reproductivo ocurre en coincidencia con temperaturas del agua elevadas en la naturaleza. Para evaluar si este parámetro era el responsable del desencadenamiento del período reproductivo se realizaron los experimentos de aclimatación a temperaturas elevadas (28 °C) con el fin de sustituir los cambios observados en la Naturaleza pre-reproducción. La aclimatación induce aceleración de la madurez gonadal (Quintana 2001) y del aumento de DP2/DP1, con lo que se confirma la hipótesis inicial. En condiciones artificiales, en el laboratorio, el aumento sostenido de la temperatura del agua es un estímulo ambiental suficiente para desencadenar madurez sexual.

Se plantea que la temperatura promueve, como efecto indirecto a largo plazo, madurez gonadal, que a su vez implica un incremento en los niveles de hormonas esteroides

gonadales responsables del dimorfismo sexual morfológico y electrofisiológico. La vía por la cual la temperatura ejerce estos efectos involucra la activación del eje hipotálamo-hipofisario actuando probablemente a través de la modulación estacional del perfil de liberación de gonadotropinas como ocurre en ciprínidos (Hontela & Peter 1978, Breton et al. 1980a,

1980b, Peter 1981, Razani et al. 1988a, 1988b, Lin et al. 1996). El efecto de las variaciones estacionales del fotoperíodo y su interacción con la temperatura no fueron evaluados en este trabajo y, por ende, su participación como factores ambientales temporizadores del período reproductivo no puede ser descartada.

### III-B. Termosensibilidad de la DOE en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y *Gymnotus carapo*

#### ANTECEDENTES

La DOE, como señal comunicativa, codifica información en dos dimensiones: en la forma de onda de cada descarga individual y en la cadencia de repetición (Moller 1995). Durante interacciones entre coespecímenes, se transfiere información codificada en ambas dimensiones. En el marco de encuentros agonistas, se han demostrado modulaciones de la frecuencia de la DOE en *Gymnotus carapo* (Black-Cleworth 1970, Box & Westby 1970, Valone 1970), aunque no se han reportado hasta la fecha cambios de la forma de onda de la DOE en esta especie. McGregor & Westby (1993) encontraron diferencias individuales de forma de onda en *Gymnotus carapo*, que podrían tener un rol en la comunicación entre coespecímenes, pero estas diferencias no fueron descritas como modulaciones plásticas en un mismo individuo. Un claro ejemplo de modulación reversible de la forma de onda de la DOE individual lo constituye el dimorfismo sexual de la DOE demostrado en varias especies de Gymnotiformes pertenecientes a los géneros *Brachyhypopomus*, *Eigenmannia*, *Apteronotus*, y *Sternopygus* (Hagedorn & Carr 1985, Hagedorn & Heiligenberg 1985, Hopkins et al. 1990, Zakon et al. 1991). El dimorfismo sexual eléctrico incluye, según la especie, cambios de la forma de onda y/o del ritmo de descarga. Otro ejemplo de modulación plástica de la forma de onda fue observado en *Brachyhypopomus occidentalis* y *pinnicaudatus*, quienes presentan variaciones circadianas de amplitud y duración de la DOE en el hábitat natural y en el laboratorio (Franchina 1993, Franchina & Stoddard 1998, Hagedorn 1995, Silva et al. 1999).

La temperatura afecta el ritmo de descarga en Gymnotiformes, como ha sido demostrado en varias especies (Enger & Szabo 1968, Lissman 1958). El valor de la frecuencia en cada momento depende del valor de la temperatura del agua, del tiempo desde que se alcanzó ese valor y del signo del cambio de temperatura, es decir si el valor de temperatura se alcanza a partir de un valor inicialmente mayor o menor (histéresis, Boudinot 1970). Recientemente, Dunlap et al. 2000 mostraron la influencia de la temperatura sobre la frecuencia de descarga en *Apteronotus leptorhynchus*. Esta especie emite continuamente una descarga casi sinusoidal a 600-1000 Hz a partir de un órgano eléctrico especializado de origen neurogénico. Además de la relación lineal entre frecuencia de descarga y temperatura, estos autores demostraron que la amplitud de la DOE aumenta con la temperatura para valores inferiores a 25 °C con  $Q_{10}=2$  y con  $Q_{10}=1.15$  cuando la temperatura asciende por encima de 25 °C. Dado que la amplitud de la DOE está controlada mayormente por corrientes de  $Na^+$ , los autores proponen que este efecto no lineal puede estar relacionado con una sensibilidad diferencial a la temperatura de los diferentes canales de  $Na^+$ .

#### OBJETIVOS

Se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar los efectos de la temperatura sobre la forma de onda de la DOE en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y *Gymnotus carapo*.
- Analizar las variaciones estacionales de la termosensibilidad de la DOE en adultos de *Brachyhypopomus*

*pinnicaudatus* y su asociación temporal con las variaciones estacionales de la temperatura del agua en el hábitat natural.

- Analizar la termosensibilidad de la DOE en individuos juveniles de *Brachyhyopomus pinnicaudatus*.
- Evaluar el efecto de la administración de hormonas esteroides gonadales (andrógenos) sobre la termosensibilidad de la DOE en *Brachyhyopomus pinnicaudatus* y *Gymnotus carapo*.
- Evaluar el efecto de la aclimatación a temperatura alta y sostenida del agua sobre la termosensibilidad de la DOE en *Brachyhyopomus pinnicaudatus* y *Gymnotus carapo*.

## METODOS

Este trabajo se realizó con ejemplares adultos (n=64) y juveniles (n=10) de *Brachyhyopomus pinnicaudatus* provenientes de la laguna El Tigre (Depto. de Treinta y Tres, 33.18 °S, 54.35 °O), con adultos sexualmente diferenciados (n=24) de *Brachyhyopomus pinnicaudatus* del arroyo Cuaró Grande (30.85 °S, 56.33 °O) y con individuos de *Gymnotus carapo* (n=28, 11-24 cm de longitud) provenientes de la Laguna del Sauce (Depto. de Maldonado, 34.74 °S, 55.5 °O).

### Registros de la DOE frente a variaciones de temperatura

Se obtuvieron registros cabeza-cola siguiendo los procedimientos descritos en la Sección Métodos del Capítulo III-A. Para evaluar la termosensibilidad, se utilizaron dos tipos de cambios de temperatura del agua: graduales y escalones. Los cambios graduales fueron impuestos a ejemplares de *Brachyhyopomus pinnicaudatus* (n=5) y *Gymnotus carapo* (n=10) ente 15 y 30 °C en pasos de 23 °C. Los registros electrofisiológicos se realizaron luego de un período de adaptación a la nueva temperatura del agua de aproximadamente 20 min. Todos los peces utilizados en este estudio fueron también sometidos a cambios bruscos de la temperatura del agua (escalones de temperatura). El pez fue colocado dentro del tubo de registro en un recipiente con agua a 20 °C. Luego de un registro en estas condiciones control, se levantó el tubo permitiendo que drene el agua, y se colocó de inmediato en un recipiente con el agua a 30 °C. El pez se mantuvo en esta temperatura durante 30 min y se registró su DOE en 9 oportunidades (en el minuto 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25 y 30). También se evaluó el cambio de la forma de onda de la DOE frente a variaciones naturales de la

temperatura del agua a lo largo del ciclo diario en una estación experimental montada en el arroyo Cuaró Grande, donde se registró la DOE de un grupo de 12 machos y 12 hembras de *Brachyhyopomus pinnicaudatus* cada 2-3 hs durante 48 hs.

La influencia de la temperatura sobre la forma de onda de la DOE implicó principalmente la disminución de la amplitud del último componente cabeza-negativo de la DOE (P2 en *Brachyhyopomus pinnicaudatus* y V4 en *Gymnotus carapo*). Como la amplitud global de la DOE puede variar, se utilizaron dos índices para evaluar la termosensibilidad de la DOE: la relación de amplitudes entre los componentes de la DOE y el índice de termosensibilidad ITS. La relación AP2/AP1 en *Brachyhyopomus pinnicaudatus* se calculó como: la amplitud pico de la fase cabeza-negativa dividido la amplitud pico de la fase cabeza-positiva. La relación AV4/AV3 en *Gymnotus carapo* se calculó como: la amplitud pico de la última fase cabeza-negativa dividido la amplitud pico de la fase cabeza-positiva. Estos indicadores permiten cuantificar los cambios de forma de onda de la DOE en cada momento (AP2/AP1 y AV4/AV3) y compararlos entre individuos (ITS). El ITS resume en un único valor el comportamiento de la forma de onda de un pez frente al cambio de temperatura. El ITS involucra el valor de la relación AP2/AP1 previo al escalón de temperatura a 20 °C y el valor de la relación AP2/AP1 30 min después de impuesto el escalón de temperatura a 30 °C. Se calculó en *Brachyhyopomus pinnicaudatus* como:  $ITS = [(AP2/AP1)_{20^{\circ}C} - (AP2/AP1)_{30^{\circ}C30}] / (AP2/AP1)_{20^{\circ}C}$ .

### Efecto de la madurez sexual sobre la termosensibilidad de la DOE

Se evaluó la termosensibilidad de la DOE en peces juveniles (n=10) de *Brachyhyopomus pinnicaudatus*. Los juveniles se identificaron de acuerdo con los criterios de Franchina (1997) como peces de 37-90 mm de longitud cuya forma, proporción corporal, pigmentación y forma de onda de la DOE se asemejan a las de un adulto sexualmente indiferenciado.

Por otra parte, se evaluó la influencia de la diferenciación sexual inducida por testosterona sobre la termosensibilidad de la DOE en: a) diez adultos sexualmente indiferenciados de *Brachyhyopomus pinnicaudatus* capturados fuera del período reproductivo; y b) ejemplares de *Gymnotus carapo* capturados fuera del período reproductivo (n=8, 11-20 cm) y en la estación pre-reproductiva (n=6, 14-23 cm). Los peces se anestesiaron con frío, se les hizo un pequeño corte en la superficie corporal dorsal y se colocó un pellet de testosterona subcutáneo (100 µg gr<sup>-1</sup> de peso corporal, cedido por Gustavo Somoza). Se evaluó la termosensibilidad de la DOE sometiendo al pez a escalones de temperatura de 20 a 30 °C antes y 5, 10 y 15 días después del

tratamiento hormonal. En *Brachyhypopomus pinnicaudatus*, la aparición del dimorfismo sexual morfológico y electrofisiológico permitió comprobar la efectividad del tratamiento hormonal.

#### *Efecto de la aclimatación sobre la termosensibilidad de la DOE*

Peces capturados fuera del período reproductivo (8 ejemplares de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y 5 ejemplares de *Gymnotus carapo*) fueron aclimatados en el laboratorio a temperatura alta y sostenida (28-29 °C) durante 1 mes como se describió en la Sección Métodos del Capítulo III-A. Se evaluó la termosensibilidad de la DOE mediante escalones de temperatura (20-30-20 °C) antes de la aclimatación. Cada 10 días durante la aclimatación, la temperatura se ascendió gradualmente de 28 a 30 °C, y se evaluó la termosensibilidad de la DOE por escalones de temperatura (30-20-30 °C).

## RESULTADOS

### *Termosensibilidad de la DOE*

La temperatura afecta la forma de onda de la DOE en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y *Gymnotus carapo* como se muestra en la Fig. III-6. Aumentos graduales de la temperatura del agua entre 20 y 30 °C inducen en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* cambios en la forma de onda de la DOE observables en registros cabeza-cola. A 20 °C, la DOE presenta la forma de onda especie-específica exhibiendo dos fases (P1 y P2). A 30 °C, se observa: a) una disminución de la duración de ambas fases de aproximadamente el 50%; y b) una disminución de la amplitud de P2 que provoca una DOE prácticamente monofásica a esta temperatura. En *Gymnotus carapo* se obtienen resultados comparables cuando la temperatura aumenta gradualmente entre 18 y 28 °C como se muestra en la Fig. III-6b: a) la duración de la DOE disminuye a medida que la temperatura aumenta involucrando a sus cuatro componentes (V1, V2, V3 y V4); y b) la amplitud de la última fase cabeza-negativa (V4) disminuye al aumentar la temperatura.

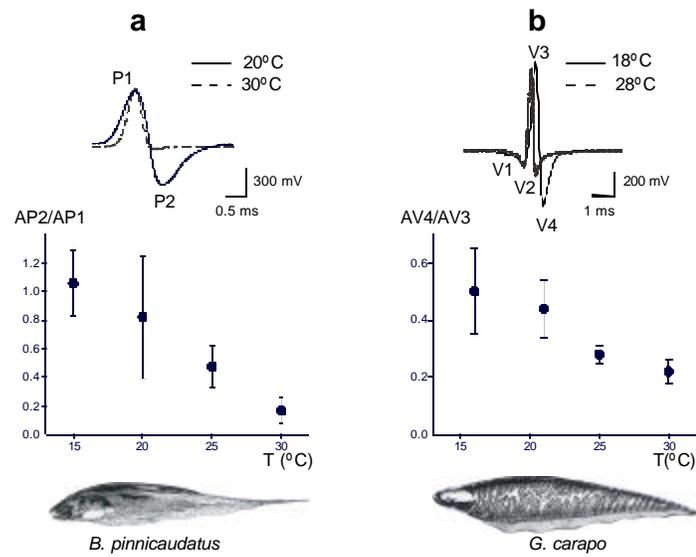
A esta variación de amplitud de la última fase cabeza-negativa de la DOE en función de la temperatura en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y *Gymnotus carapo* le denominamos termosensibilidad de la DOE, y constituye el fenómeno más inesperado e interesante de los efectos de la temperatura sobre la DOE. Se seleccionó la relación entre las amplitudes pico de la DOE como un

parámetro confiable para describir este fenómeno (Fig. III-6, gráficas). En *Brachyhypopomus pinnicaudatus*, el índice AP2/AP1 (amplitud pico de P2 dividido amplitud pico de P1) disminuye de  $1.05 \pm 0.22$  a 15 °C a  $0.17 \pm 0.09$  a 30 °C (n=5). En *Gymnotus carapo*, el índice comparable AV4/AV3 (amplitud pico de V4 dividido amplitud pico de V3) disminuye de  $0.5 \pm 0.15$  a 16 °C a  $0.22 \pm 0.04$  a 30 °C (n=10).

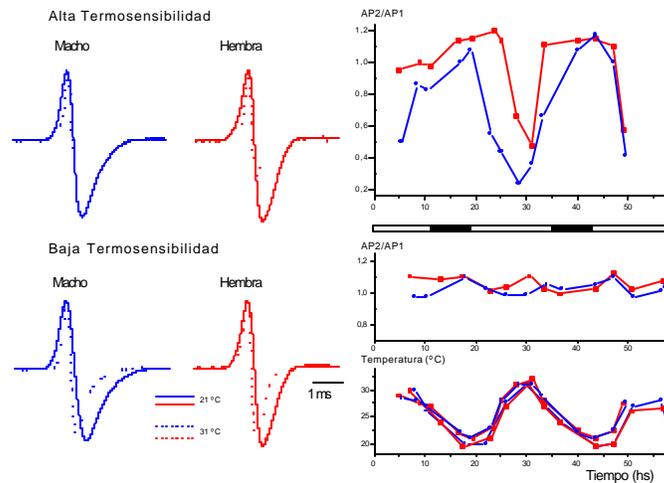
En una estación de registro montada en el Arroyo Cuaró Grande, Depto. de Artigas (30.85 °S, 56.33 °O) al comienzo del período reproductivo, se analizaron las variaciones diarias de la forma de onda de la DOE de machos y hembras de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* en asociación con los cambios de temperatura del agua. Al aumentar la temperatura durante el ciclo diario, se observaron los siguientes cambios en la forma de onda de la DOE que se muestran en la Fig. III-7: a) disminución de la duración de ambas fases (P1 y P2); b) aumento de la pendiente P1-P2; y c) disminución de la amplitud de P2, aunque este efecto no fue constante en todos los peces. A bajas temperaturas (durante la noche y mañana temprana) la relación AP2/AP1 fue uniforme y mayor que 1. A medida que la temperatura del agua aumenta naturalmente, la relación AP2/AP1 se hace más variable decreciendo claramente en algunos casos. Se registraron peces con alta termosensibilidad de la DOE (machos y hembras) que mostraron una disminución sistemática de la relación AP2/AP1 al aumentar la temperatura, y peces con baja termosensibilidad (machos y hembras) en los que la relación AP2/AP1 se mantuvo constante a pesar de las variaciones de temperatura.

### *Variaciones estacionales de la termosensibilidad de la DOE*

La termosensibilidad de la DOE de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* presentó variaciones estacionales como se muestra en la Fig. III-8. En los peces colectados durante el período no reproductivo, la forma de onda de la DOE mostró cambios persistentes cuando se impuso el escalón de temperatura entre 20 y 30 °C, y por lo tanto presentaron alta termosensibilidad. Como se observa en la Fig. III-8a, la forma de onda de la DOE, bifásica a 20 °C, quedó prácticamente monofásica inmediatamente después del salto a 30 °C y persiste así durante toda la



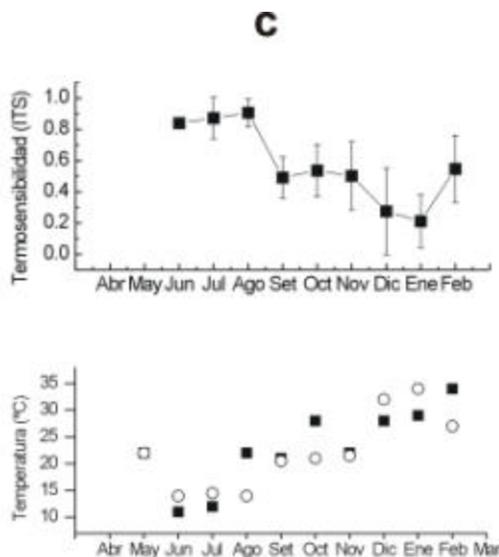
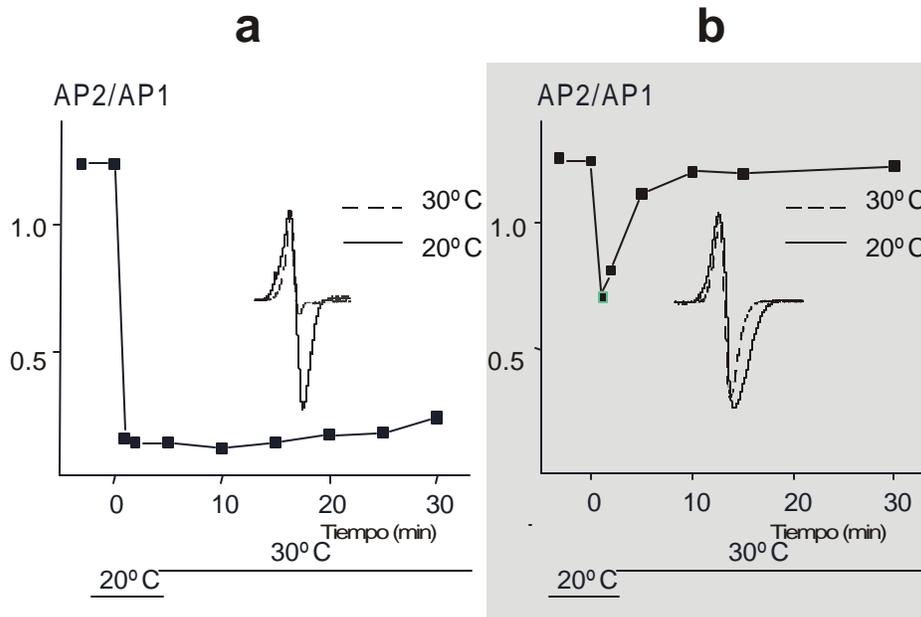
**Figura III-6.** Efectos de la temperatura sobre la forma de onda de la DOE en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y *Gymnotus carapo*. **a.** Registros cabeza-cola de la DOE de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* a 20 °C (línea continua) y a 30 °C (línea punteada) obtenidos de un adulto sexualmente indiferenciado durante cambios graduales de temperatura. Los valores (promedio ± desvío estándar) de la relación entre el pico de amplitudes (AP2/AP1) se representan en función de la temperatura (n=5). **b.** Registros cabeza-cola de la DOE de un ejemplar de *Gymnotus carapo* a 18 °C (línea continua) y a 28 °C (línea punteada) durante cambios graduales de temperatura. Los valores (promedio ± desvío estándar) de la relación entre el pico de amplitudes (AV4/AV3) se representan en función de la temperatura (n=10).



**Figura III-7.** Termosensibilidad de la DOE en una población natural de *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. **Alta Termosensibilidad:** Registros normalizados de la DOE de un macho y una hembra obtenidos a temperaturas extremas durante el ciclo diario en el hábitat natural (Arroyo Cuaró Grande). La relación de amplitudes AP2/AP1 del macho (azul) y de la hembra (rojo) se representan a lo largo de 48 hs, y muestra importantes cambios correlacionados con las variaciones diarias de temperatura (gráfica inferior). La barra horizontal representa el ciclo luz (blanco)-oscuridad (negro). **Baja Termosensibilidad:** Registros normalizados de la DOE de un macho y una hembra obtenidos en las mismas condiciones. La relación de amplitudes AP2/AP1 del macho (a azul) y de la hembra (rojo) se representan a lo largo de 48 hs, y muestra poco cambio. En la gráfica inferior, se representan los valores de la temperatura del agua medidos en cada uno de los registros de la DOE durante el período de 48 hs.

duración del escalón de temperatura. En cambio, los peces colectados durante el período reproductivo presentaron baja termosensibilidad de la DOE (Fig. III-8b). La DOE sólo mostró cambios transitorios en su forma de onda al imponerse el escalón de temperatura que rápidamente se adaptaron; la DOE recupera su forma bifásica en menos de 10 min a 30 °C. El índice de termosensibilidad de la DOE (ITS) se calculó en ejemplares adultos de *Brachyhyopomus*

*pinnicaudatus* (n=46) colectados del hábitat natural en distintos momentos del año (Fig. III-8c). El ITS tuvo valores altos entre junio y agosto durante la estación no reproductiva en asociación con temperaturas del agua bajas en la Naturaleza. En cambio, el ITS fue bajo durante los meses de diciembre y enero correspondientes a la estación reproductiva en asociación con temperaturas del agua elevadas.

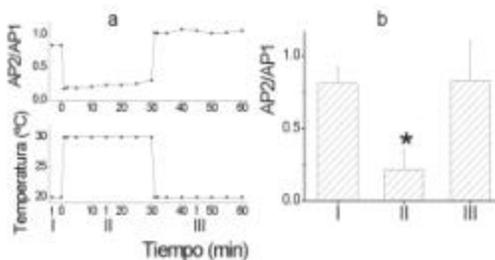


**Figura III-8.** Cambios estacionales de la termosensibilidad de la DOE en *Brachyhyopomus pinnicaudatus*. **a.** La amplitud de P2 en registros normalizados disminuye sostenidamente cuando se impone un escalón de temperatura entre 20 (línea continua) y 30 °C (línea punteada) a un adulto sexualmente indiferenciado colectado durante la estación no reproductiva. Se representa la relación de amplitudes AP2/AP1 durante el escalón de temperatura que indica una alta termosensibilidad de la DOE. **b.** La amplitud de P2 en registros normalizados disminuye poco y transitoriamente cuando se impone un escalón de temperatura entre 20 (línea continua) y 30 °C (línea punteada) a una hembra sexualmente diferenciada colectada durante la estación reproductiva. Se representa la relación de amplitudes AP2/AP1 durante el escalón de temperatura que indica una baja termosensibilidad de la DOE. **c.** La termosensibilidad de la DOE fue evaluada a lo largo del ciclo anual en adultos obtenidos en la laguna El Tigre. Se representan los valores del ITS (promedio ± desvío estándar) a lo largo del año (gráfica superior). En la gráfica inferior se representan los valores de temperatura medidos en la laguna El Tigre en dos años consecutivos (ídem Fig. I-7). Se observan valores altos del ITS durante el período no-reproductivo asociados a bajas temperaturas del agua y valores bajos del ITS durante el período reproductivo asociados a altas temperaturas del agua.

### Modulaciones de la termosensibilidad de la DOE por madurez sexual y temperatura

Para correlacionar experimentalmente la termosensibilidad de la DOE con la madurez sexual, se evaluó la termosensibilidad en dos poblaciones confiablemente diferentes en cuanto a su perfil hormonal esteroideo: individuos juveniles e individuos tratados con testosterona.

El estado juvenil es el período en el cual los peces presentan la mayoría de las características del adulto excepto sus gónadas maduras (Blaxter 1988). Se seleccionaron individuos juveniles de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* siguiendo los criterios de Franchina (1997). Como se muestra en la Fig. III-9, la forma de onda de la DOE de los juveniles mostró cambios permanentes frente a la imposición de escalones de temperatura (20-30 °C); i.e. los juveniles presentaron alta termosensibilidad de la DOE. Se comparó la relación AP2/AP1 obtenida pre-escalón a 20 °C (I) con la obtenida 15 min post-escalón a 30 °C (II) y resultaron significativamente distintas (test de t pareado,  $p < 0.01$ ,  $n = 10$ ). La relación AP2/AP1 obtenida 15 min post-escalón a 30 °C (II) también resultó significativamente distinta de la obtenida post-escalón a 20 °C (III) (test de t pareado,  $p < 0.01$ ,  $n = 10$ ).



**Figura III-9.** Termosensibilidad de la DOE en individuos juveniles de *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. **a.** Se representa la relación AP2/AP1 en un individuo durante el escalón de temperatura entre 20 y 30 °C. Las flechas señalan los puntos seleccionados para el procesamiento estadístico (I, II y III). **b.** Las barras representan el valor promedio ( $\pm$  desvío estándar) de la relación AP2/AP1 de la muestra. A 30 °C, la relación AP2/AP1 fue significativamente menor que a 20 °C (\*, test de t pareado,  $p < 0.01$ ,  $n = 10$ ).

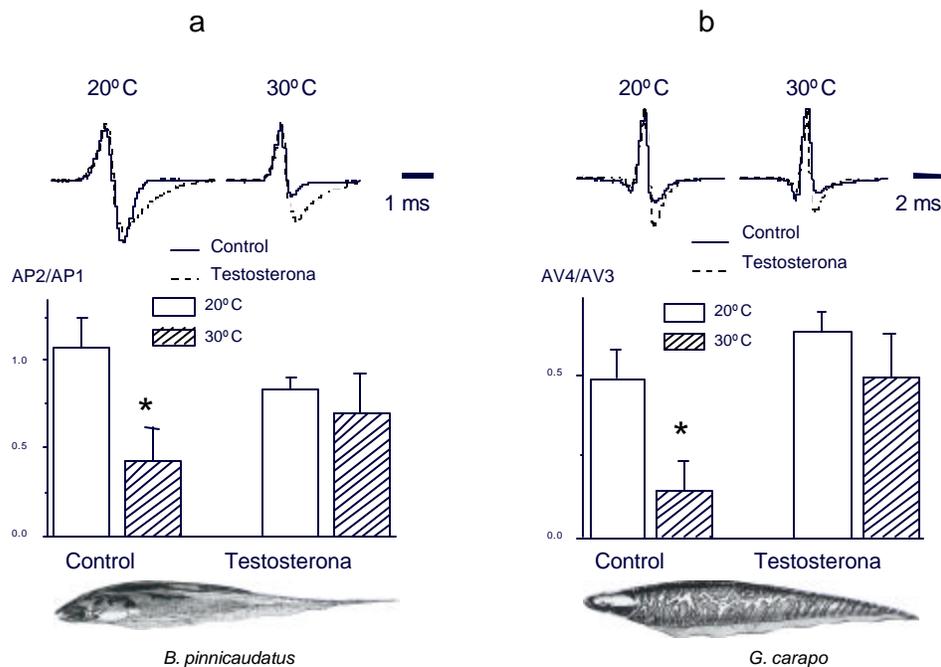
El efecto de las hormonas esteroideas sobre la termosensibilidad de la DOE se evaluó en ejemplares adultos de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* por administración de testosterona. Como se muestra en la Fig. III-10a, 15 días después del tratamiento, la testosterona provocó cambios en la forma de onda de la DOE caracterizados por: a) aumento de la duración de P2 observado a 20 y 30 °C; y b) disminución de la termosensibilidad de la DOE. Antes del tratamiento con testosterona, se observó una disminución permanente en la amplitud de P2 al aumentar la temperatura (escalón 20-30 °C). Se comparó la relación AP2/AP1 obtenida pre-escalón a 20 °C con la obtenida 15 min post-escalón a 30 °C y resultaron significativamente distintas (\* en Fig. III-10a, test de t pareado,  $p < 0.01$ ,  $n = 10$ ), confirmando una termosensibilidad de la DOE alta en estos peces. Quince días después de la administración de testosterona, la forma de onda de la DOE se hizo resistente frente al escalón de temperatura: la relación AP2/AP1 pre-escalón a 20 °C y post-escalón a 30 °C no resultaron significativamente distintas (test de t pareado,  $p > 0.05$ ,  $n = 10$ ).

Aunque no se constató ningún signo de dimorfismo sexual en *Gymnotus carapo* en la Naturaleza, la administración de testosterona indujo cambios de la forma de onda de la DOE registrada a 20 °C principalmente caracterizados por un aumento de la duración de V4 (Fig. III-10b). Los efectos de la testosterona sobre la termosensibilidad de la DOE fueron diferentes a lo largo del año: a) en peces capturados en octubre (estación pre-reproductiva) se observó una disminución de la termosensibilidad de la DOE 10 días después del tratamiento (Fig. III-10b); y b) en peces capturados en junio (estación no reproductiva) no se observaron cambios de la termosensibilidad de la DOE 10 días después del tratamiento. Antes de la administración de testosterona en la estación pre-reproductiva, se observó una disminución permanente en la amplitud de V4 al aumentar la temperatura (escalón 20-30 °C). Se comparó la relación AV4/AV3 obtenida pre-escalón a 20 °C con la obtenida 15 min post-escalón a 30 °C y resultaron significativamente distintas (\* en Fig. III-10b, test de t pareado,  $p < 0.01$ ,  $n = 6$ ), confirmando una termosensibilidad de la DOE alta en estos peces. Diez días después de la administración de testosterona, la forma de onda de la DOE se hizo resistente frente al escalón de temperatura: la relación AV4/AV3 pre-escalón a 20 °C y post-escalón a 30 °C

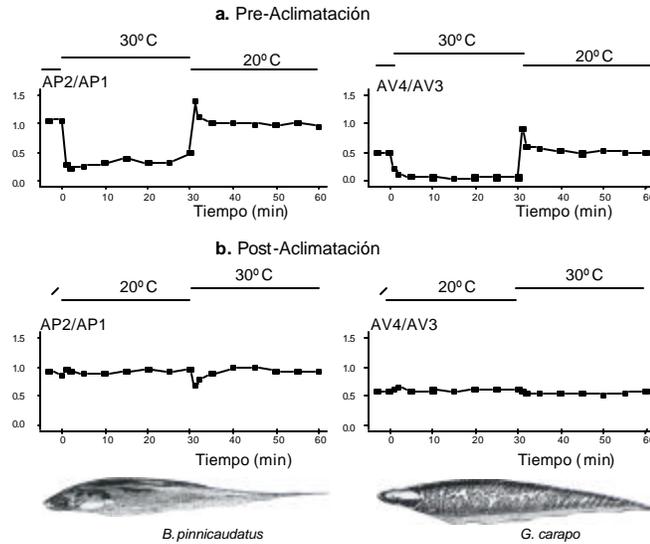
no resultaron significativamente distintas (test de t pareado,  $p > 0.05$ ,  $n = 6$ ). En la estación no reproductiva, la relación AV4/AV3 pre-escalón a 20 °C y post-escalón a 30 °C resultaron significativamente distintas antes y después del tratamiento hormonal (test de t pareado,  $p < 0.05$ ,  $n = 8$ ).

Se evaluó el efecto de la aclimatación a temperatura elevada y sostenida sobre la termosensibilidad de la DOE de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y *Gymnotus carapo*. Como se muestra en la Fig. III-11a, peces recién capturados de ambas especies

mostraban alta termosensibilidad de la DOE antes de la aclimatación: la relación AP2/AP1 de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y la relación AV4/AV3 de *Gymnotus carapo* disminuyeron en forma persistente al aplicar el escalón de temperatura de 20 a 30 °C. Luego de la aclimatación (Fig. III-11b), la relación AP2/AP1 en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y la relación AV4/AV3 en *Gymnotus carapo* se mantuvieron relativamente constantes a pesar de los saltos de temperatura impuestos, indicando que los peces disminuyeron su termosensibilidad por aclimatación.



**Figura III-10.** Modulación de la termosensibilidad de la DOE por administración de testosterona en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y *Gymnotus carapo*. a. Registro de la DOE en un individuo adulto sexualmente indiferenciado de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* a 20 y 30 °C antes (línea continua) y 15 días después de la administración de testosterona (línea punteada). Se representa la relación de amplitudes AP2/AP1 (promedio  $\pm$  desvío estándar) en los peces control y tratados a 20 (blanco) y 30 °C (barras rayadas). Antes del tratamiento hormonal, los peces mostraban alta termosensibilidad de la DOE (\*, test de t pareado,  $p < 0.01$ ,  $n = 10$ ), mientras que no se observó cambio significativo de la relación AP2/AP1 a 20 y 30 °C post-tratamiento. b. Registro de la DOE de un individuo de *Gymnotus carapo* a 20 y 30 °C antes (línea continua) y 10 días después de la administración de testosterona (línea punteada). Se representa la relación de amplitudes AV4/AV3 (promedio  $\pm$  desvío estándar) en los peces control y tratados a 20 (blanco) y 30 °C (barras rayadas). Antes del tratamiento hormonal, los peces mostraban alta termosensibilidad de la DOE (\*, test de t pareado,  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ), mientras que no se observó cambio significativo de la relación AP2/AP1 a 20 y 30 °C post-tratamiento.



**Figura III-11.** Modulación de la termosensibilidad de la DOE por aclimatación en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y *Gymnotus carapo*. **a.** Las relaciones AP2/AP1 de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y AV4/AV3 de *Gymnotus carapo* se representan durante escalones de temperatura 20-30-20 °C y demuestran alta termosensibilidad de la DOE. **b.** Después de 1 mes de aclimatación a 28-29 °C, las relaciones AP2/AP1 y AV4/AV3 se modifican sólo transitoriamente durante escalones de temperatura 28-30-20 °C. En ambos ejemplos, la termosensibilidad de la DOE disminuye por aclimatación.

## DISCUSION

La termosensibilidad de la DOE observada en Gymnotiformes de la zona templada constituye un efecto de la temperatura sobre la DOE no descrito previamente a nuestro estudio (Caputi et al. 1998, Silva et al. 1999, Ardanaz et al. 2001). Además de los esperados efectos de la temperatura sobre la duración y frecuencia de la DOE, el aumento de la temperatura (dentro del rango observado en la Naturaleza en la zona templada) produce una importante disminución de la amplitud del último componente cabeza-negativo de la DOE (P2 en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y V4 en *Gymnotus carapo*).

La termosensibilidad de la DOE de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y *Gymnotus carapo* es probablemente el mismo fenómeno. Aunque la forma de onda de la DOE de *Gymnotus carapo* es más compleja que la de *Brachyhypopomus pinnicaudatus*, los mecanismos de generación del pulso en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* (P1-P2) son similares a los mecanismos de generación de

los componentes V3-V4 en *Gymnotus carapo* en la región caudal. La forma de onda trifásica de la DOE en *Gymnotus carapo* depende de: a) el patrón de inervación de los electrocitos sobre sus caras rostral y caudal; b) la activación coordinada de ambas caras de los electrocitos; y c) las diferentes propiedades de membrana de los electrocitos a lo largo del órgano eléctrico (Trujillo-Cenóz et al. 1984, Macadar et al. 1989, Trujillo-Cenóz & Echagüe 1989). Las diferentes porciones del órgano eléctrico participan en forma distinta en la generación de los componentes de la DOE en *Gymnotus carapo*: por ejemplo, V3 es generado por activación sináptica de las caras caudales de todos los electrocitos, mientras que V4 se genera principalmente en el 25% caudal del órgano eléctrico y depende de la invasión de las corrientes de acción de V3 sobre las caras rostrales de los electrocitos (Caputi et al. 1989, Caputi 1999). El órgano eléctrico de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* está compuesto exclusivamente por electrocitos inervados caudalmente, por lo que genera una DOE bifásica (Trujillo-Cenóz et al. 1984). P1 se genera por activación sináptica

sincrónica de las caras caudales de los electrocitos y P2 depende de la propagación de estos potenciales de acción a las caras rostrales (Caputi et al. 1998, Caputi 1999).

Los cambios de temperatura ponen en marcha múltiples mecanismos de compensación que actúan sobre el sistema nervioso. Por ejemplo, un aumento de la temperatura produce aumento de la amplitud del potencial de acción presináptico y disminución de su duración, efectos que tienen acciones contrarias sobre la ganancia sináptica (Montgomery & McDonald 1990). Estos efectos compensatorios hacen posible la conservación de la coordinación sensorio-motora en animales poiquiloterms que deben enfrentar importantes cambios de temperatura. La termosensibilidad de la DOE parece evidenciar una falla de estos mecanismos de compensación. Cuando la temperatura se modifica de 20 a 30 °C, la forma de onda de la DOE cambia profundamente (Fig. III-6), perdiendo inclusive su forma característica especie-específica, lo que pone en riesgo su función comunicativa.

#### *Mecanismos subyacentes a la termosensibilidad de la DOE*

El primer punto a dilucidar es si la termosensibilidad de la DOE es un fenómeno periférico que depende de las propiedades de los electrocitos o si es un fenómeno central que depende del patrón de descarga. En *Gymnotus carapo*, Schuster (2000) observó cambios en la forma de onda de la DOE al retomar la descarga luego de una pausa. El efecto aislado de la frecuencia sobre la forma de onda fue explorado comandando el tracto electromotor bulbo-espinal a temperatura constante (23 °C) en *Gymnotus carapo* (Ardanaz et al. 2001). Los cambios de frecuencia afectan la relación AV4/AV3 en menor proporción que la temperatura, por lo que se concluye que la termosensibilidad de la DOE no puede ser explicada completamente por el aumento de frecuencia provocado por el aumento de temperatura.

Por otra parte, el efecto de la temperatura sobre la forma de onda de la DOE (AV4/AV3) depende de la conductividad del medio, lo que confirma la participación del órgano eléctrico en el origen del fenómeno (Ardanaz et al. 2001). La eficacia de las corrientes de acción para excitar las caras rostrales de los electrocitos depende de la temperatura y de

la resistencia externa del pez. En un medio de alta conductividad (solución salina), el flujo de corriente es mayor y el efecto de la temperatura sobre la forma de onda de la DOE es menor. En un medio de baja conductividad (agua destilada), los efectos de la temperatura sobre la forma de onda fueron máximos.

Para investigar los mecanismos celulares de la termosensibilidad de la DOE, se debe tener en cuenta el efecto diferente de la temperatura sobre los distintos componentes de la DOE: el componente cabeza-positivo (P1 y V3) se ve menos afectado por la temperatura que el componente cabeza-negativo tardío (P2 y V4). De acuerdo con sus mecanismos diferenciales de generación, se concluye que la activación sináptica de las caras caudales de los electrocitos (responsable de P1 y V3) es menos sensible a la temperatura que la propagación de las corrientes de acción a la cara rostral de los electrocitos (responsable de P2 y V4). Datos preliminares obtenidos de preparaciones de órgano eléctrico "in vitro" indican que la resistencia de entrada del electrocito disminuye al aumentar la temperatura en *Gymnotus carapo* y *Brachyhyppopomus pinnicaudatus* mientras que el nivel de disparo no se modifica (Ardanaz 1998, Sierra comunicación personal). A mayores temperaturas, las mismas corrientes de acción derivadas de los potenciales de acción disparados en las caras caudales de los electrocitos por activación sináptica generarían caídas de voltaje menores en las caras rostrales, disminuyendo su probabilidad de disparo. La temperatura provoca efectos similares sobre la excitabilidad de membrana y la resistencia de entrada en el músculo sartorio de la rana (Del Castillo & Machne 1953), músculo extraocular de teleósteos (MacDonald & Balnave 1984), célula de Mauthner (Preuss comunicación personal) y neuronas hipotálamicas de rata (Griffin & Boulant 1995). La disminución de la resistencia de entrada del electrocito al aumentar la temperatura implica que las corrientes iónicas normalmente activas en reposo aumentan su conductividad con el aumento de temperatura. En el órgano eléctrico, se identificaron, además de canales de pérdida, canales de K<sup>+</sup> activos en reposo en *Gymnotus carapo* (Sierra comunicación personal) y de K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> en *Sternopygus* (Ferrari & Zakon 1993). La disminución de la resistencia de entrada al aumentar la temperatura puede explicar la disminución de

las amplitudes de P2 y V4: las corrientes de acción originadas por la activación sináptica de caras caudales generarían una caída de potencial menor que podría no llegar al nivel de disparo o disminuir la probabilidad de disparo del potencial de acción en las caras rostrales. Ese efecto diferencial de la temperatura sobre las caras caudales y rostrales de los electrocitos se podría explicar por: a) diferente factor de seguridad para la activación sináptica que para la propagación caudo-rostral de las corrientes de acción; y b) diferentes mecanismos compensatorios del efecto de la temperatura sobre la transmisión sináptica y sobre la propagación caudo-rostral del potencial de acción.

#### Variaciones estacionales de la termosensibilidad de la DOE

La termosensibilidad de la DOE en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* varía a lo largo del año siendo alta durante el invierno (baja temperatura del agua) y baja durante el verano (alta temperatura del agua) (Fig. III-8). La conexión entre las variaciones estacionales de la termosensibilidad de la DOE y el ciclo reproductivo de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* se vio reforzada por los datos de histología gonadal que muestran una poderosa correlación negativa entre la termosensibilidad de la DOE y la madurez gonadal en machos y hembras (Quintana 2001).

La termosensibilidad de la DOE puede ser considerada como un indicador de madurez sexual no dependiente del sexo, que puede ser especialmente útil para identificar hembras maduras por procedimientos de registro no invasivos. Una hembra madura puede ser más fácilmente identificada por su baja termosensibilidad que por su discutido dimorfismo sexual eléctrico.

A diferencia de *Brachyhypopomus pinnicaudatus*, no se ha estudiado el desarrollo ontogénico en *Gymnotus carapo* y se desconocen el momento y mecanismos de adquisición de madurez sexual en esta especie. En *Gymnotus carapo*, no hemos encontrado diferencias estacionales de la termosensibilidad de la DOE ni evidencias morfológicas ni electrofisiológicas de dimorfismo sexual a lo largo del año.

La termosensibilidad de la DOE implica importantes cambios de forma de onda que pueden afectar la función

electrocomunicativa, particularmente la identificación de coespecímenes. La disminución observada de la termosensibilidad correlacionada con la diferenciación sexual tiende a preservar el ya demostrado valor comunicativo de la DOE en el contexto de la reproducción (Hopkins 1974a, 1974b, Hagedorn & Heiligenberg 1985, Hagedorn & Carr 1985, Hopkins et al. 1990, Hopkins 1991, Zakon et al. 1991). Podría considerarse que los Gymnotiformes de la zona templada alcanzan la plenitud comunicativa durante la estación reproductiva.

Nuestros registros fueron obtenidos a partir de electrodos ubicados en la cercanía de la cabeza y la cola del pez, por lo que se obtienen DOEs con formas de onda hipersimplificadas. Hasta el momento, no se ha intentado registrar los efectos de la temperatura sobre la imagen eléctrica percibida por un coespecimen cercano (Aguilera et al. 2001). De todas maneras, la imagen eléctrica de un coespecimen cercano registrada a nivel de la fovea se correlaciona bien con el registro cabeza-cola de la DOE.

Los mecanismos celulares y subcelulares subyacentes a la termosensibilidad de la DOE no han sido explorados aún. Para estudiarlos, es necesario tener en cuenta dos aspectos plásticos de este fenómeno: a) los cambios transitorios de temperatura modifican las propiedades de membrana de los electrocitos; y b) los cambios graduales estacionales de la temperatura del agua determinan el disparo del período reproductivo y también inducen indirectamente cambios de las propiedades de membrana probablemente a través de la acción de hormonas esteroides. Estos efectos de la temperatura a largo plazo afectan, a su vez, la respuesta de los electrocitos a escalones transitorios de temperatura. No se han observado diferencias entre machos y hembras en las variaciones estacionales de la termosensibilidad de la DOE ni en su modulación por testosterona o aclimatación. Por lo tanto, se postula que las hormonas esteroides ejercen una modulación estacional no dependiente del sexo. Dentro de los peces teleósteos, los andrógenos aumentan frecuentemente en ambos sexos en el contexto de la reproducción (Liley & Stacey 1983). Los andrógenos podrían actuar, por ejemplo, sobre los tejidos pasivos mejorando la propagación de los potenciales de acción

hacia las caras rostrales en la estación reproductiva. En cualquier caso, es difícil interpretar los cambios de la forma de onda de la DOE observados durante los transitorios de los escalones de temperatura, especialmente en los peces con baja termosensibilidad. Es posible que frente a ese cambio brusco y no fisiológico de temperatura ambiente, se pongan en marcha mecanismos neurales y no neurales (vásculomotores?) para compensar el shock térmico.

#### *Termosensibilidad de la DOE y diferenciación sexual*

Como se describiera previamente en varias especies de Gymnotiformes (Meyer 1983, Bass & Hopkins 1985, Hagedorn & Carr 1985, Mills & Zakon 1987), la administración de testosterona remeda el dimorfismo sexual del macho de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* incrementando principalmente la duración de P2 de todos los peces de la muestra. El efecto observado de la testosterona sobre la forma de onda de la DOE de *Gymnotus carapo* a 20 °C constituye el primer reporte de modulación hormono-dependiente de la DOE en esta especie. El efecto (aumento de la duración de V4) es comparable al observado en *Brachyhypopomus pinnicaudatus*, ya que V4 responde a un mecanismo homólogo al componente P2 de la DOE de *Brachyhypopomus pinnicaudatus*.

Las hormonas esteroides gonadales afectan la termosensibilidad de la DOE en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y *Gymnotus carapo*. La administración de testosterona evoca la disminución de la termosensibilidad en ambas especies. En coherencia con esto, individuos juveniles de *Brachyhypopomus pinnicaudatus*, que por definición poseen gónadas inmaduras y por ende niveles despreciables de hormonas esteroides gonadales, muestran homogéneamente alta termosensibilidad de la DOE. Las diferencias en la modulación de la termosensibilidad de la DOE por testosterona observadas en *Gymnotus carapo* en distintos momentos del año dependen probablemente de variaciones estacionales de los niveles de las hormonas esteroides gonadales. La administración de testosterona exógena induce acciones diferentes sobre la termosensibilidad de la DOE dependiendo del perfil natural de las hormonas esteroides endógenas.

Como se describiera en el Capítulo III-A, el aumento sostenido de la temperatura del agua es un estímulo ambiental suficiente para desencadenar madurez sexual en *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. La disminución de la termosensibilidad de la DOE observada por aclimatación a temperatura elevada y sostenida aporta evidencias adicionales sobre la relación de este fenómeno con la madurez sexual y confirma que puede ser modulado directamente por la temperatura del agua aislada de otros factores ambientales.

En resumen, postulamos que la termosensibilidad de la DOE constituye un indicador novedoso de madurez sexual. Varias evidencias presentadas en este capítulo sostienen este postulado: a) la termosensibilidad de la DOE en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* muestra variaciones estacionales (en machos y hembras) negativamente correlacionadas con su ciclo reproductivo natural (Fig. III-8); b) la termosensibilidad de la DOE de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y *Gymnotus carapo* depende de los niveles de hormonas esteroides gonadales (andrógenos) (Figs. III-9 y 10); y c) la termosensibilidad de la DOE es modulable por manipulación de la temperatura, factor ambiental involucrado en el disparo del período reproductivo en la zona templada, en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y *Gymnotus carapo* (Fig. III-11). Nosotros postulamos que existe una interacción entre los efectos de la temperatura y de las hormonas esteroides sobre la forma de onda de la DOE en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y *Gymnotus carapo*. El aumento de la temperatura del agua observado en la transición entre la estación no-reproductiva y reproductiva influye al eje hipotálamo-hipofisario induciendo madurez gonadal. Esto conduce al aumento de los niveles de hormonas esteroides, quienes son responsables de los diferentes indicadores de madurez sexual: dimorfismo sexual morfológico, electrofisiológico y termosensibilidad de la DOE. Este trabajo deja planteadas interesantes preguntas para explorar en el futuro que permitirán dilucidar la vía neuro-endócrina de acción de la temperatura ambiental y los mecanismos celulares y subcelulares de los efectos de la temperatura a corto y largo plazo.

## BIBLIOGRAFIA

- Aguilera AP, Castelló ME, Caputi AA. 2001. Electroreception in *Gymnotus carapo*: differences between self-generated and conspecific-generated signal carriers. *J Exp Biol* 204: 185-198.
- Ardanaz JL. 1998. Efectos de la temperatura sobre la forma de onda de la descarga del órgano eléctrico en *Gymnotus carapo*. Tesis de Maestría. PEDECIBA. Montevideo.
- Ardanaz JL, Silva A, Macadar O. 2001. Sensitivity of EOD waveform in *Gymnotus carapo*: a peripheral phenomenon modulated by steroid hormones. *J Comp Physiol A* 187: 853-864.
- Bass AH, Hopkins CD. 1985. Hormonal control of sex differences in the electric organ discharge (EOD) of mormyrid fishes. *J Comp Physiol A* 156: 587-604.
- Black-Cleworth P. 1970. The role of electrical discharges in the non-reproductive social behavior of *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Pisces). *Anim Behav Monogr* 3: 1-77.
- Blaxter JHS. 1988. Pattern and variety in development. En Hoar WS, Randal DJ (eds) *Fish Physiology*. Vol IXA. Academic Press. San Diego: 1-58.
- Boudinot M. 1970. The effect of decreasing and increasing temperature on the frequency of the electric organ discharge in *Eigenmannia sp.* *Comp Biochem Physiol* 37: 601-603.
- Box HO, Westby GWM. 1970. Behaviour of electric fish (*Gymnotus carapo*) in a group membership experiment. *Psychon Sci* 21: 27-28.
- Breton B, Horoszewicz L, Billard R, Bieniarz K. 1980a. Temperature and reproduction in tench: Effect of a rise in the annual temperature regime on gonadotropin level, gametogenesis, and spawning. I. The male. *Reprod Nutr Dev* 20: 105-118.
- Breton B, Horoszewicz L, Bieniarz K, Epler P. 1980b. Temperature and reproduction in tench: Effect of a rise in the annual temperature regime on gonadotropin level, gametogenesis, and spawning. II. The female. *Reprod Nutr Dev* 20: 1011-1024.
- Caputi AA, Macadar O, Trujillo-Cenóz O. 1989. Waveform generation in *Gymnotus carapo*. III. Analysis of the fish body as an electric source. *J Comp Physiol A* 165: 361-370.
- Caputi AA, Silva A, Macadar O. 1998. The EOD of *Brachyhyopomus pinnicaudatus*: The effect of environmental variables on waveform generation. *Brain Behav Evol* 52: 148-158.
- Caputi AA. 1999. The electric organ discharge of pulse gymnotiforms: the transformation of a simple impulse into a complex spatio-temporal electromotor pattern. *J Exp Biol* 202: 1229-1241.
- Del Castillo J, Machne X. 1953. Effect of temperature on the passive electrical properties of the muscle fibre membrane. *J Physiol Lond* 120: 431-434.
- Dunlap KD, Smith GT, Yekta A. 2000. Temperature dependence of electrocommunication signals and their underlying neural rhythms in the weakly electric fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *Brain Behav Evol* 55: 152-162.
- Elliot JM. 1981. Some aspects of thermal stress on freshwater teleosts. En: Pckering AD (ed) *Stress and fish*. Academic Press. Londod: 209-246.
- Enger PS, Szabo T. 1968. Effect of temperature on the discharge rates of the electric organ of some gymnotids. *Comp Biochem Physiol* 27: 625-627.
- Ferrari MB, Zakon HH. 1993. Conductances contributing to the action potential of *Sternopygus electrocytes*. *J Comp Physiol A* 173: 281-292.
- Franchina CR. 1993. The waveform of the weakly electric fish *Hypopomus pinnicaudatus* changes daily in the male. *J Comp Physiol A* 173: 742.
- Franchina CR. 1997. Ontogeny of the electric organ discharge and the electric organ in the weakly electric pulse fish *Brachyhyopomus pinnicaudatus* (Hypopomidae, Gymnotiformes). *J Comp Physiol A* 181: 111-119.
- Franchina CR, Stoddard PK. 1998. Plasticity of the electric organ discharge waveform of the electric fish *Brachyhyopomus pinnicaudatus*. I. Quantification of day-night changes. *J Comp Physiol A* 183: 759-768.
- Griffin JD, Boulant JA. 1995. Temperature effects on membrane potential and input resistance in rat hypothalamic neurons. *J Physiol* 488.2: 407-418.
- Hagedorn M, Carr C. 1985. Single electrocytes produce a sexually dimorphic signal in South American electric fish, *Hypopomus occidentalis* (Gymnotiformes, Hypopomidae). *J Comp Physiol A* 156: 511-523.
- Hagedorn M, Heiligenberg W. 1985. Court and spark: electric signals in the courtship and mating of gymnotoid fish. *Anim Behav* 33: 254-265.
- Hagedorn M. 1995. The electric fish *Hypopomus occidentalis* can rapidly modulate the amplitude and duration of its electric organ discharges. *Anim Behav* 49: 1409-1413.
- Harper AA, Watt PW, Hancock NA, MacDonald AG. 1990. Temperature acclimation effects on carp nerve: a comparison of nerve conduction, membran fluidity and lipid composition. *J Exp Biol* 154: 305-320.
- Hazel JR. 1993. Thermal biology. En: Evans DH (ed) *The physiology of fishes*. CRC Press. London:
- Hontela A, Peter RE. 1978. Daily cycle in serum gonadotropin levels in the goldfish: effects of photoperiod, temperature, and sexual condition. *Can J Zool* 56: 2430-2442.
- Hopkins CD. 1974a. Electric communication: functions in the social behavior of *Eigenmannia virescens*. *Behaviour* 50: 270-305.
- Hopkins CD. 1974b. Electric communication in the reproductive behavior of *Sternopygus macrurus* (Gymnotoidei). *Z Tierpsychol* 35:518-535.
- Hopkins CD, Comfort NC, Bastian J, Bass AH. 1990. Functional analysis of sexual dimorphism in an electric fish, *Hypopomus pinnicaudatus*, Order Gymnotiformes. *Brain Behav Evol* 35: 350-367.
- Hopkins CD. 1991. *Hypopomus pinnicaudatus* (Hypopomidae) a new species of gymnotiform fish from French Guiana. *Copeia* 1: 151-161.
- Kirschbaum F. 1979. Reproduction of the weakly electric fish *Eigenmannia virescens* (Rhamphichthyidae, Teleostei) in captivity. *Behav Ecol Sociobiol* 4: 331-355.
- Kirschbaum F. 1995. Taxonomy, zoogeography and general ecology of South American knifefishes (Gymnotiformes). En: Moller P (ed.) *Electric Fishes. History and behavior*. Chapman & Hall. London: 446-464.
- Kirschbaum F. 2000. The breeding of tropical freshwater fishes through experimental variation of exogenous parameters. *Aqua Geographia* 20: 95-105.
- Kuyucak S, Chung SH. 1994. Temperature dependence of conductivity in electrolyte solutions and ionic channels of biological membranes. *Biophys Chem* 52: 15-24.
- Lam TJ. 1983. Environmental influences on gonadal activity in fish. En: Hoar WS, Randal DJ, Donaldson EM, (eds.) *Fish Physiology*. Vol IX. Academic Press. New York: 65-116.

- Landsman RE. 1991. Captivity affects behavioral physiology: plasticity in signaling sexual identity. *Experientia* 47: 31-38.
- Landsman RE. 1993. The effects of captivity on the electric organ discharge and hormone levels in *Gnathonemus petersii* (Mormyriiformes). *J Comp Physiol A* 172: 619-631.
- Landsman RE. 1995. Sources of plasticity in behavior and its physiology: sex, hormones, environment and the captivity model. En: Moller P (ed) *Electric fishes. History and behavior*. Chapman & Hall. London: 303-343.
- Liley NR, Stacey NE. 1983. Hormones, pheromones, and reproductive behavior in fish. En: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (eds.) *Fish Physiology*. Vol IX. Academic Press. New York: 1-63.
- Lin X, Lin H, Peter RE. 1996. Direct influences of temperature on Gonadotropin-II release from perfused pituitary fragments of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in vitro. *Comp Biochem Physiol* 114A: 341-347.
- Lissman H. 1958. On the function and evolution of electric organs in fish. *J Exp Biol* 35: 156-191.
- Macadar O, Lorenzo D, Velluti JC. 1989. Waveform generation of the electric organ discharge in *Gymnotus carapo*. II. Electrophysiological properties of single electrocytes. *J Comp Physiol A* 165: 353-360.
- MacDonald JA, Balnave RJ. 1984. Miniature end plate currents from teleost extraocular muscle. *J Comp Physiol A* 147: 649-659.
- McGregor PK, Westby GWM. 1993. Individually characteristic EOD waveforms and discrimination by *Gymnotus carapo*. *J Comp Physiol A* 173: 741.
- Meyer JH. 1983. Steroid influences upon the discharge frequencies of a weakly electric fish. *J Comp Physiol A* 153: 29-37.
- Mills A, Zakon HH. 1987. Coordination of EOD frequency and pulse duration in weakly electric wave fish: the influence of androgens. *J Comp Physiol A* 161: 417-430.
- Moller P. 1995. Social interactions in free-swimming fish. En: Moller P (ed) *Electric Fishes. History and behavior*. Chapman & Hall. London: 235-266.
- Montgomery JC, MacDonald JA. 1990. Effects of temperature on nervous system: implications for behavioral performance. *Am J Physiol* 259: R191-R196.
- Nelson DO, Prosser CL. 1981. Intracellular recordings from thermosensitive preoptic neurons. *Science* 213: 787-789.
- Peter RE. 1981. Gonadotropin secretion during reproductive cycles in teleosts: Influences of environmental factors. *Gen Comp Endocrinol* 45: 294-305.
- Prosser CL, Heath JE. 1991. Temperature. En: Prosser CL (ed) *Environmental and metabolic animal physiology*. Wiley-Liss. New York: 109-165.
- Quintana L. 2001. Efecto de la temperatura sobre la madurez sexual y la termosensibilidad en *Brachyhyopomus pinnicaudatus*. Tesis de Maestría. PEDECIBA. Montevideo. 62 pp.
- Razani H, Hanyu I, Aida K. 1988a. Environmental influences on ovarian activity and related hormones in yearling goldfish. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54(9): 1505-1511.
- Razani H, Hanyu I, Aida K. 1988b. Environmental influences on testicular activity and related hormones in yearling goldfish. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54(9): 1513-1520.
- Schuster S. 2000. Changes in the electric organ discharge after pausing the electromotor system of *Gymnotus carapo*. *J Exp Biol* 203: 1433-1446.
- Silva A, Quintana L, Galeano M, Errandonea P, Macadar O. 1999. Water temperature sensitivity of the EOD waveform in *Brachyhyopomus pinnicaudatus*. *J Comp Physiol A* 185(2): 187-197.
- Trujillo-Cenóz O, Echagüe JA, Macadar O. 1984. Innervation pattern and electric organ discharge waveform in *Gymnotus carapo*. *J Neurobiol* 15: 273-281.
- Trujillo-Cenóz O, Echagüe JA. 1989. Waveform generation of the electric organ discharge in *Gymnotus carapo*. I. Morphology and innervation of the electric organ. *J Comp Physiol A* 165: 343-351.
- Valone JA. 1970. Electrical emissions in *Gymnotus carapo* and their relation to social behavior. *Behaviour* 37: 1-14.
- Van den Burg EH. 2002. Neuroendocrine control of temperature acclimation in teleost fish. PhD Thesis. Katholieke Universiteit Nijmegen. 111 pp.
- Zakon HH, Thomas P, Yan HY. 1991. Electric organ discharge frequency and plasma steroid levels during gónada recrudescence in a natural population of the weakly electric fish *Sternopygus macrurus*. *J Comp Physiol A* 169: 493-499.

---

## CAPITULO IV

### Modulación de la amplitud de la DOE por AMPc en *Sternopygus macrurus*

---

El contenido de este capítulo surge de la pasantía experimental que realicé en el laboratorio de Harold Zakon (Co-orientador) en la Universidad de Texas en Austin durante el mes de noviembre de 2000. En esa oportunidad, me integré a una de sus líneas de trabajo y tuve a mi cargo la realización de los experimentos comportamentales para evaluar la modulación de la forma de onda de la DOE de *Sternopygus* por activación de la PKA. Estos datos complementaron el trabajo de McAnelly quien evaluó el efecto de la activación de la PKA sobre el potencial de acción de los electrocitos. Ambos abordajes se aunaron en un manuscrito titulado: "Cyclic AMP modulates electrical signaling in a weakly electric fish" de los autores McAnelly L, Silva A, y Zakon HH, que fue enviado para su publicación a la revista Journal of Comparative Physiology A.

#### ANTECEDENTES

*Sternopygus macrurus* es un Gymnotiforme que emite una DOE casi sinusoidal consistente en pulsos monofásicos muy regularmente espaciados cuya frecuencia varía entre 50 y 200 Hz (Hopkins 1974). Los machos maduros descargan a menor frecuencia que las hembras maduras (50-90 Hz y 110-200 Hz, respectivamente), mientras que los juveniles y adultos sexualmente indiferenciados presentan frecuencias de valores intermedios (Hopkins 1974, Zakon et al. 1991, Mills & Zakon 1987). Dentro del rango correspondiente a su sexo y edad, cada individuo descarga a una frecuencia propia que se mantiene estable durante días (Bullock 1969).

El dimorfismo sexual electrofisiológico de *Sternopygus macrurus* y sus bases celulares y subcelulares han sido extensamente estudiados. Los machos emiten DOEs de mayor duración y baja frecuencia en correlación con altos niveles de andrógenos (Meyer 1983, Mills & Zakon 1987, 1991,

Zakon et al. 1991). Los esteroides actúan directamente sobre el órgano eléctrico alterando las propiedades eléctricas de los electrocitos (Dunlap et al. 1997, Few & Zakon 1998). La corriente de  $\text{Na}^+$  se activa e inactiva más rápidamente en peces de alta frecuencia de descarga y más lentamente en peces de bajas frecuencias (Ferrari et al. 1995). Las cinéticas de las corrientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  covarían y la corriente de  $\text{K}^+$  también se activa más rápidamente en peces de alta frecuencia (McAnelly & Zakon 2000). La administración de andrógenos enlentece la cinética de la corriente de  $\text{Na}^+$ , en tanto que la administración de estrógenos la acelera (Ferrari et al. 1995, Dunlap et al. 1997).

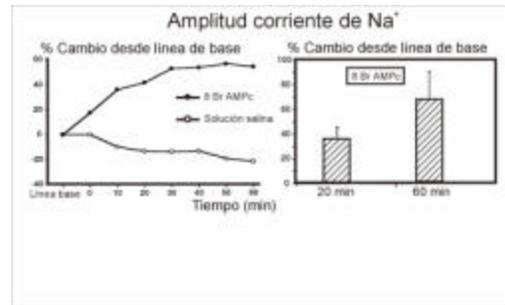
La capacidad de regular la amplitud de la DOE determina la distancia efectiva del campo eléctrico y, por lo tanto, afecta la capacidad electrolocativa de estos peces y también su capacidad para detectar coespecímenes o ser detectados por predadores electrosensibles. Durante mucho tiempo, se asumió que la amplitud de la DOE estaba determinada por atributos fijos del órgano eléctrico (morfológicos y fisiológicos). Sin embargo, varios estudios encontraron que la amplitud de la DOE puede ser influida por interacciones sociales o por el ciclo circadiano y que esos cambios pueden ocurrir en decenas de minutos. En *Eigenmannia*, Hagedorn & Heiligenberg (1985) reportaron un aumento importante en la amplitud de la DOE del macho dominante hacia el atardecer, que no pudieron medir con precisión dadas las condiciones de registro (grupo de peces nadando libremente en una pecera diseñada para el estudio de la conducta reproductiva). En *Brachyhypopomus occidentalis*, Hagedorn & Zelick (1989), observaron cambios rápidos en la forma de onda de la DOE durante interacciones agresivas: cuando se enfrentan dos machos con DOEs comparables, la DOE del perdedor disminuye en amplitud y duración en pocas horas. Hagedorn (1995) registró modulaciones diarias de la amplitud

de la DOE en machos y hembras de *Brachyhyppomus occidentalis*. En *Brachyhyppomus pinnicaudatus*, Franchina & Stoddard (1998) demostraron que la DOE del macho (pero no de la hembra) aumenta en amplitud y duración durante la noche. Este aumento comienza aún antes del atardecer, mantiene su ritmo circadiano en condiciones de oscuridad constante y depende de estímulos sociales (por ejemplo, de la presencia de coespecímenes, Franchina et al. 2001).

La modulación de la amplitud de la DOE es probablemente el resultado de la regulación dinámica de fenómenos biofísicos a través de mecanismos que tienen aplicaciones mucho más generales. La suma de las corrientes de acción de los electrocitos simultáneamente activados producen cada pulso de la DOE. La forma de onda de la DOE está entonces moldeada por las propiedades biofísicas de los electrocitos que en *Sternopygus macrurus* están determinadas mayormente por corrientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (Ferrari & Zakon 1993, Ferrari et al. 1995, McAnelly & Zakon 2000). Los aumentos de la amplitud de la DOE observados en *Eigenmannia* y *Brachyhyppomus* podrían deberse a un aumento de la corriente generada por cada electrocito. En *Sternopygus macrurus*, la magnitud de la corriente de  $\text{Na}^+$  aumenta aproximadamente 20 min después de la activación de la PKA por el análogo del AMPc (8 Br-AMPc) en el órgano eléctrico aislado (McAnelly & Zakon 1996, Fig. IV-1). La activación de la PKA modula la magnitud pero no la duración de la corriente de  $\text{Na}^+$  ya que no tiene efecto sobre la cinética de activación ni de inactivación (McAnelly & Zakon 1996). En electrocitos de *Electrophorus electricus*, contrariamente, el AMPc provoca una disminución de la corriente de  $\text{Na}^+$  (Emerick et al. 1993).

El AMPc actúa como segundo mensajero intracelular de muchas hormonas y neuromoduladores (Kennedy 1992). La mayoría de los efectos del AMPc se deben a la activación de la PKA, que a su vez fosforila una amplia variedad de proteínas cuyas actividades son reguladas por fosforilación. El AMPc activa a la PKA uniéndose a sus subunidades regulatorias, lo que provoca un cambio conformacional en las mismas que lleva a la liberación de las subunidades catalíticas, que así se activan. La explicación más plausible del efecto de la activación de la PKA sobre la corriente de  $\text{Na}^+$  del electrocito

de *Sternopygus* es que la PKA actúe directamente sobre el canal de  $\text{Na}^+$  aumentando su probabilidad de apertura (McAnelly & Zakon 1996). Sin embargo, la PKA también podría afectar el canal de  $\text{Na}^+$  actuando indirectamente a través de otros sustratos, o induciendo la síntesis de nuevos canales de  $\text{Na}^+$ , o la incorporación de canales de  $\text{Na}^+$  a la membrana a partir de un reservorio citosólico (McAnelly & Zakon 1996).



**Figura IV-1.** Efecto del 8 Br-AMPc sobre la corriente de  $\text{Na}^+$  en electrocitos del *Sternopygus macrurus*. **a.** Curso temporal de la activación de la PKA en dos células representativas: luego de la administración de 8 Br-AMPc (1 mM, círculos negros) y de solución salina (círculos blancos). El 8 Br-AMPc produce un aumento sostenido de la magnitud de la corriente de  $\text{Na}^+$  a diferencia de la disminución gradual que se observa en los controles. **b.** Aumento de la magnitud de la corriente de  $\text{Na}^+$  (media y error estándar) 20 min y 60 min después de la administración de 8 Br-AMPc (1 mM). Modificada de McAnelly & Zakon 1996.

En este trabajo se evalúa si la regulación biofísica de los canales tiene su contrapartida a nivel comportamental, es decir si tiene efectos sobre la DOE. Se propone que el aumento de la corriente de  $\text{Na}^+$  dependiente de la PKA sea responsable del aumento de la amplitud de la DOE in vivo.

## OBJETIVOS

Se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar el efecto del AMPc sobre la forma de onda de la DOE.
- Evaluar la correlación entre los cambios de forma de la DOE y las propiedades biofísicas de los canales.

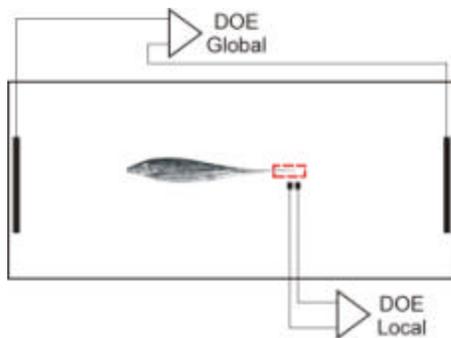
## METODOS

Los ejemplares de *Sternopygus macrurus* se obtuvieron de acuarios comerciales y se alojaron en pares en el laboratorio en condiciones de temperatura y conductividad controladas (23-24 °C, 600-750  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , respectivamente) durante al menos 4 semanas. Se utilizaron peces de 20-40 cm de longitud, que corresponden a juveniles tardíos o adultos jóvenes según los criterios establecidos por Hopkins (1974). Se seleccionaron peces con frecuencias de descarga intermedias (70-90 Hz a 23-24 °C) mantenidos en cautiverio en ambiente no reproductivo.

### Registros de la DOE

Cada pez se aisló en la pecera de registro (75 x 30 x 30 cm, 50 l) durante 1 hs previa al registro en las mismas condiciones de temperatura y conductividad que en el acuario de alojamiento. El pez se inmovilizó en una red eléctricamente transparente que se ubicó en el centro de la pecera de registro. Todos los registros se realizaron durante el día (9:00-17:00 hs).

Se realizaron dos tipos de registros de la DOE: a) cabeza-cola, o registro global de la DOE, a partir de electrodos de carbón ubicados en ambos extremos de la pecera (Fig. IV-2); y b) caudal, o registro local de la DOE, que se obtuvo con un electrodo bipolar (con ambos extremos separados 1 cm) ubicado en el extremo caudal del pez (Fig. IV-2). Las señales fueron amplificadas (amplificador de AC Grass P15) digitizadas y almacenadas en una computadora a través de una interfase (TL-1 DMA, Axon Instruments) y posteriormente analizados utilizando el software pClamp (Axon Instruments).



**Figura IV-2.** Diseño experimental para el registro de la DOE global y local. El registro global refleja la actividad de todas las células del órgano eléctrico. El registro local refleja la actividad de los electrocitos caudales principalmente, por lo que registra más precisamente el efecto del 8 Br-AMPc que fue administrado en el apéndice caudal.

En primera instancia, se evaluó la estabilidad de los registros electrofisiológicos en 5 peces intactos utilizados como control. Se midió la amplitud, duración y frecuencia de la DOE cada 30 min durante 120 min. No se observaron cambios significativos en los parámetros analizados, demostrando que las condiciones de registro no afectaban la DOE en forma apreciable.

Se estudió el efecto de la administración del análogo permeable del AMPc (8 Br-AMPc, Sigma, 50 mM en solución salina, pH=7.2) en 6 peces utilizando 5 peces como control, a los que se les administró solución salina (NaCl 114 mM, KCl 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 4 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, HEPES 5 mM, glucosa 6 mM, pH=7.2). Ambas sustancias (volumen total = 0.1-0.2 ml) se administraron en forma subcutánea en 3 diferentes puntos del apéndice caudal.

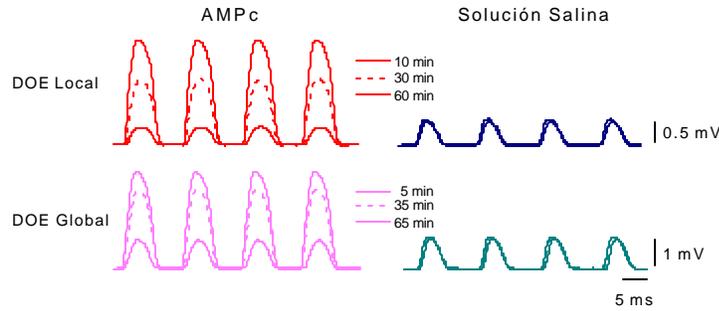
La amplitud del registro local de la DOE es muy sensible a la posición relativa del electrodo bipolar con respecto al pez. Por esta razón, las inyecciones de 8 Br-AMPc y solución salina se realizaron inmediatamente antes de ubicar al pez en el dispositivo de registro y sólo se procesaron los datos en los que el pez se mantuvo prácticamente inmóvil durante la sesión de registro. Se tomaron medidas de la DOE global y local, alternativamente, cada 5 min durante 90 min después de la inyección.

## RESULTADOS

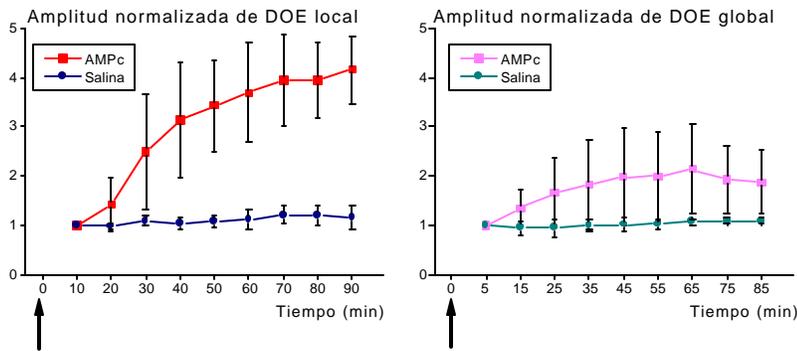
La amplitud inicial de la DOE presentó variaciones individuales, pero no fue significativamente diferente en los peces tratados con AMPc y con solución salina. La amplitud inicial de la DOE global fue de  $2.68 \pm 0.46$  mV y  $2.56 \pm 0.6$  mV con solución salina y AMPc, respectivamente; y la amplitud inicial de la DOE local fue de  $1.42 \pm 0.3$  mV y  $0.88 \pm 0.18$  mV con solución salina y AMPc, respectivamente.

Como se muestra en la Fig. IV-3, las amplitudes de la DOE global y local aumentaron gradualmente en respuesta a la administración de 8 Br-AMPc. Treinta minutos después de la inyección, el 8 Br-AMPc provocó un aumento significativo de la amplitud de la DOE local con respecto a sus valores iniciales (test de t,  $p < 0.05$ ,  $n=6$ ) y con respecto a la amplitud de la DOE local registrada en peces tratados con solución salina durante el mismo tiempo (test de t,  $p < 0.05$ ,  $n_{\text{AMPc}}=6$ ,  $n_{\text{salina}}=5$ ).

El aumento de la DOE local (en valores normalizados para favorecer las comparaciones) alcanzó un máximo 60-70



**Figura IV-3.** La activación de la PKA induce un aumento de la amplitud de la DOE. En los registros global y local, la forma de onda de la DOE permaneció incambiada 30 y 60 min después de la administración de solución salina. La inyección de 8 Br-AMPc produjo un marcado aumento de la amplitud de la DOE medido 30 min después, que fue aun mayor a los 60 min. La frecuencia de la DOE no se modificó.



**Figura IV-4.** El aumento de la amplitud de la DOE provocado por AMPc se inicia gradualmente y alcanza un máximo 60-70 min post-inyección. Las flechas indican el momento de inyección. Los valores de amplitud de la DOE se normalizaron con respecto a su valor a 5 min (DOE global) y a 10 min (DOE local) post-inyección. Los datos mostrados indican valores promedio  $\pm$  desvío estándar. En el punto de efecto máximo (60-65 min post-inyección de 8 Br-AMPc), la amplitud normalizada de la DOE global aumentó 2.141 veces ( $\pm$  0.9158,  $p=0.0314$  en comparación con la administración de solución salina) y la amplitud normalizada de la DOE local aumentó 3.697 veces ( $\pm$  1.009,  $p=0.0003$ ).

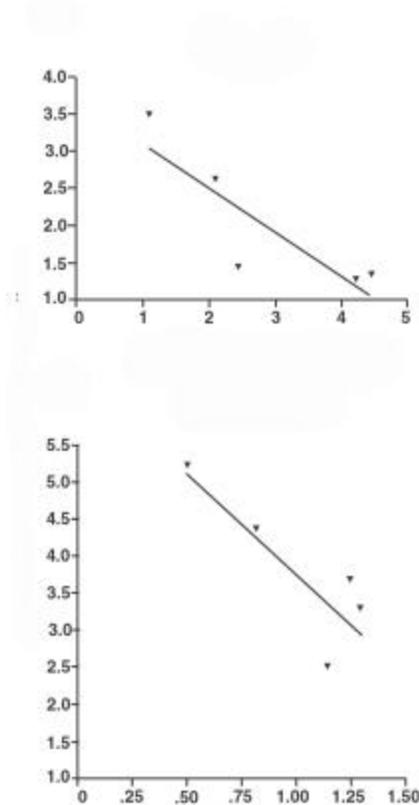
min después de la administración de 8 Br-AMPc (Fig. IV-4). Este curso temporal se asemeja al observado en el aumento de la corriente de  $\text{Na}^+$  del electrocito mediado por 8 Br-AMPc (McAnelly & Zakon 1996, comparar con Fig. IV-1).

El aumento de la amplitud de la DOE global (en valores normalizados) fue menor que el aumento observado en los registros locales (Figs. IV-3, IV-4). De todas maneras, 55 min post-inyección, la amplitud de la DOE global fue significativamente mayor en los peces tratados con 8 Br-AMPc que en los peces inyectados con solución salina (test de t,  $p<0.05$ ,  $n_{\text{AMPc}}=6$ ,  $n_{\text{salina}}=5$ ).

La amplitud de la DOE global y local en los peces tratados con solución salina no mostró cambios significativos a lo largo del tiempo de registro (Figs. IV-3, IV-4).

Se seleccionó el tiempo 60 min post-inyección de 8 Br-AMPc para comparar parámetros adicionales de la DOE por las siguientes razones: a) es un punto cercano al máximo del efecto del 8 Br-AMPc sobre ambos registros de la DOE (local y global); y b) la amplitud de las DOEs local y global fueron significativamente mayores que las observadas en peces tratados con solución salina en este punto.

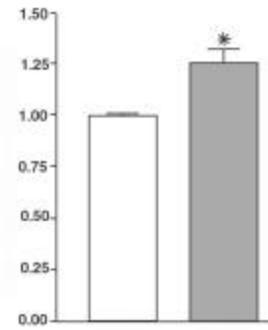
La magnitud de la respuesta al 8 Br-AMPc dependió aparentemente de la amplitud inicial de la DOE. Los peces con amplitudes iniciales de la DOE menores mostraron una respuesta mayor a la inyección de 8 Br-AMPc que los peces con amplitudes iniciales de la DOE mayores (Fig. IV-5). Estas observaciones no mostraron significancia estadística.



**Figura IV-5.** El incremento de la amplitud de la DOE provocado por AMPc tiende a ser mayor cuando la amplitud inicial de la DOE es menor (registros locales:  $r^2=0.7101$ ,  $p=0.0731$ ; registros globales:  $r^2=0.7485$ ,  $p=0.0582$ ).

La duración de la DOE local (pero no de la global) aumentó significativamente 60 min luego de la administración de 8 Br-AMPc con respecto a los controles tratados con solución salina (Fig. IV-6). Este efecto se constató midiendo la duración de la DOE en la base del pulso y al 50% de su amplitud pico.

La frecuencia de la DOE, medida tanto en los registros locales como globales, no se modificó por el tratamiento con 8 Br-AMPc.



**Figura IV-6.** La duración de la DOE registrada localmente aumentó luego de la administración de AMPc. La duración de la DOE de peces tratados con AMPc se incrementó 1.25 veces ( $\pm 0.104$ ) con respecto a sus valores iniciales medidos al 50% de su amplitud pico 60 min después del tratamiento. En las mismas condiciones, la duración de la DOE en peces tratados con solución salina correspondió al 0.981 ( $\pm 0.017$ ) de sus valores iniciales ( $p=0.043$ ).

## DISCUSION

En este estudio se demostró que la administración de AMPc provoca: a) un aumento de la magnitud de la DOE que se duplicó y hasta cuatuplicó; y b) un aumento del 25% de la duración de la DOE. En concordancia con esto, los registros intracelulares realizados en electrocitos por McAnelly (McAnelly et al. enviado a JCP-A) verificaron que la administración de AMPc provocó: a) un aumento de la amplitud y duración del potencial de acción de aproximadamente 25%; y b) una disminución de la resistencia de membrana del electrocito. Estos datos son coherentes con el hallazgo previo de que la activación de la PKA vía AMPc provoca un aumento de la magnitud de la corriente de  $Na^+$  en el órgano eléctrico aislado de *Sternopygus* (McAnelly & Zakon 1996).

### *Aumento de la magnitud de la DOE por 8 Br-AMPc*

La inyección de 8 Br-AMPc implicó un aumento de la magnitud de la DOE que duplicó su amplitud inicial en los registros globales y la cuatuplicó en los registros locales. Las diferentes respuestas observadas en ambos tipos de registro se pueden explicar por varios factores. En primer lugar, las inyecciones de 8 Br-AMPc se realizaron sólo en el apéndice caudal circunscribiendo el efecto máximo a esta zona. El órgano eléctrico de *Sternopygus*

(como en todos los Gymnotiformes) se extiende a lo largo de casi toda la superficie ventral del pez y no está completamente aislado permitiendo el flujo de corrientes locales (Caputi & Budelli 1995, Rasnow & Bower 1996, Caputi 1999). Por lo tanto, los registros realizados en una región del órgano eléctrico reflejarán las corrientes que fluyen por esa región. Otro factor importante es que los electrocitos de la región caudal del órgano eléctrico son más pequeños y están más densamente distribuidos que en el resto del órgano eléctrico, resultando en una mayor generación de corriente en este extremo.

La frecuencia de descarga de la DOE no fue afectada por la administración de 8 Br-AMPc en el extremo caudal del pez, hecho esperable dado que el ritmo de descarga está controlado por el núcleo marcapaso bulbar. En cambio, la duración de cada pulso de la DOE aumentó por inyección de 8 Br-AMPc. El 25% de aumento de la duración de la DOE observado en los registros locales coincide exactamente con el 25% de aumento de la duración del potencial de acción observado en los registros intracelulares en electrocitos (McAnelly et al. enviado a JCP-A).

Se observó que la magnitud de la DOE se relaciona negativamente con su amplitud inicial. Esta misma tendencia se verificó a nivel del electrocito: el efecto del 8 Br-AMPc sobre la amplitud potencial de acción del electrocito depende de su amplitud inicial (McAnelly et al. enviado a JCP-A). Esto posiblemente corresponda a diferencias individuales en el nivel de fosforilación basal de los canales de  $\text{Na}^+$  en el órgano eléctrico. Si los canales de  $\text{Na}^+$  estuvieran inicialmente fosforilados, la activación de la PKA por adición de 8 Br-AMPc sólo provocaría la fosforilación de unos pocos canales y, por lo tanto menor efecto sobre la magnitud de la corriente de  $\text{Na}^+$ , lo que resultaría en un efecto también menor sobre el potencial de acción del electrocito y sobre la DOE.

#### *Rol funcional de la modulación de la amplitud de la DOE*

El aumento de la amplitud de la DOE por AMPc enfrenta a un problema de relación costo-beneficio: una DOE más potente le permite al pez mejorar su capacidad electrolocativa espacialmente; y por otra parte, lo hace más vulnerable a potenciales predadores electrosensibles y es metabólicamente más costosa de mantener

(Westby 1988, Stoddard 1999). Por lo tanto, sería beneficioso contar con un mecanismo que controlara adaptativamente la magnitud de la DOE; es decir que incrementara la amplitud de la DOE durante interacciones sociales y la disminuyera en períodos de reposo o aislamiento. Estos cambios adaptativos de la amplitud de la DOE fueron constatados en *Eigenmannia* y *Brachyhypopomus* por varios autores en diversas situaciones comportamentales (Hagedorn & Heiligenberg 1985, Hagedorn 1995, Franchina & Stoddard 1998, Franchina et al. 2001).

El ejemplo mejor estudiado es el de *Brachyhypopomus pinnicaudatus*, cuya DOE aumenta de amplitud durante la noche cuando los peces están activos y disminuye en el día cuando los peces se encuentran en reposo (Franchina & Stoddard 1998, Franchina et al. 2001). Esta variación circadiana de la amplitud de la DOE fue observada sólo en machos sexualmente diferenciados y se incrementa por la presencia de otro macho de la misma especie. En *Brachyhypopomus* no se exploró el efecto de la administración de AMPc sobre la amplitud de la DOE, pero se postuló que las hormonas esteroides (a través de una cascada de segundos mensajeros) podrían afectar las propiedades de los canales iónicos en minutos (Erulkar & Wetzel 1987, Harrelson & McEwen 1987). Para verificar la conexión entre el aumento de la amplitud de la DOE AMPc dependiente y este posible significado funcional en *Sternopygus*, es necesario explorar la existencia de un ciclo circadiano de amplitud de la DOE comparable al observado en *Brachyhypopomus*.

Los cambios circadianos máximos de amplitud de la DOE global en *Brachyhypopomus* son del 25%, mientras que el AMPc indujo un aumento del 200% en la amplitud de la DOE global en *Sternopygus*. Esta importante diferencia podría tener varias explicaciones. En primer lugar, los cambios observados en *Brachyhypopomus* fueron provocados por un estímulo natural, en tanto el aumento observado en *Sternopygus* se produjo luego de un tratamiento farmacológico. Si ambas especies usaran el mismo mecanismo para la regulación de la amplitud de la DOE, es posible que tuvieran la misma capacidad máxima para modular la amplitud de la DOE en un amplio rango pero que sólo una pequeña porción de este rango estuviera modulada por estímulos naturales.

Si esto fuera así, la amplitud de la DOE de *Brachyhypopomus* se incrementaría en un porcentaje similar al de *Sternopygus* (200%) frente a la administración de AMPc (experimento no realizado hasta el momento). Una segunda posibilidad es que las diferencias en la modulación de amplitud de la DOE observadas en *Brachyhypopomus* y *Sternopygus* revelen verdaderas diferencias específicas. *Brachyhypopomus* descarga en pulsos y modula su ritmo de descarga aumentándolo en encuentros agonistas o con fines electrolocativos, y enlenteciéndolo durante el reposo. *Sternopygus*, cuya DOE se asemeja a una onda sinudoidal, emite su descarga a una frecuencia basal estable que no enlentece ni interrumpe en períodos de reposo. Por lo tanto, desde el punto de vista metabólico, podría ser más eficiente para un pez “de onda” tener mayor capacidad de modular la amplitud de su descarga. Finalmente, también es posible que la regulación de la amplitud de la DOE ocurra por mecanismos diferentes en estas dos especies.

#### *Posibles mecanismos del aumento de la amplitud de la DOE*

La amplitud de la DOE puede incrementarse por tres mecanismos diferentes aunque no mutuamente excluyentes: a) por incremento del número de electrocitos activos: este mecanismo requiere la existencia de un conjunto de electrocitos inactivos que puedan ser reclutados para aumentar la amplitud de la DOE; b) por aumento de la sincronización de la descarga de los electrocitos; y c) por aumento de la corriente generada por que cada electrocito. Los datos previos de McAnelly & Zakon (1996) dan soporte a la participación del aumento del aporte de cada electrocito, ya que muestran que el AMPc produce un aumento de hasta 50% de la magnitud de la corriente de  $\text{Na}^+$  en los electrocitos de *Sternopygus*.

Este aumento de la corriente de  $\text{Na}^+$  provocado por AMPc constatado mediante la técnica de clampeo de voltaje sólo se acompañaría de un aumento de la corriente generada en el electrocito no clampeado si el potencial de acción no alcanzara previamente el  $E_{\text{Na}}$ . El pico del potencial de acción en el electrocito de *Sternopygus* alcanza entre +10 y +30 mV y puede alcanzar entre +40 y +50 mV después de la administración de AMPc (McAnelly et al. enviado a JCP-A), lo que demuestra que cada electrocito genera

efectivamente más corriente bajo el efecto del AMPc. Sin embargo, queda aún por explicar cómo ese aumento de corriente pueda generar el aumento de la amplitud de la DOE observado post-AMPc.

Para explicar este fenómeno, puede representarse el órgano eléctrico de *Sternopygus* por su circuito equivalente de Thévenin (Heiligenberg 1975, Caputi & Budelli 1995). La contribución de cada electrocito aparece como potenciada por la sincronización de todos los electrocitos de la misma región del órgano eléctrico. El aumento de la activación de los canales de  $\text{Na}^+$  genera, al mismo tiempo, un aumento de la corriente de acción y una disminución de la resistencia de membrana. Se plantea, entonces, que el efecto del AMPc en el órgano eléctrico incluye un aumento de la fuerza electromotriz y una disminución de la resistencia interna, y que ambos efectos contribuyen a generar una mayor corriente en el agua. Se planea tomar medidas directas de la fuerza electromotriz y componentes resistivos mediante el procedimiento de la trampa de aire (Caputi et al. 1989).

## BIBLIOGRAFIA

- Bullock TH. 1969. Species differences in effect of electroreceptor input on electric organ pacemakers and other aspects of behavior in electric fish. *Brain Behav Evol* 2: 85-118.
- Caputi A, Macadar O, Trujillo-Cenóz O. 1989. Waveform generation of the electric organ discharge in *Gymnotus carapo*. III. Analysis of the fish body as an electric source. *J Comp Physiol A* 165:361-370.
- Caputi A, Budelli R. 1995. The electric image in weakly electric fish: I. A data-based model of waveform generation in *Gymnotus carapo*. *Journal of Computational Neuroscience* 2: 131-147.
- Caputi 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.
- Dunlap KD, McAnelly ML, Zakon HH. 1997. Estrogen modifies an electrocommunication signal by altering the electrocyte sodium current in an electric fish, *Sternopygus*. *J Neurosci* 17: 2869-2875.
- Emerick M, Shenkel S, Agnew W. 1993. Regulation of the eel electroplax  $\text{Na}^+$  channel and phosphorylation of residues on amino- and carboxy-terminal domains by cAMP dependent protein kinase. *Biochemistry* 32: 9435-9444.
- Erukhar SD, Wetzel DM. 1987. Steroid effects on excitable membranes. En: Strauss III JF, Pfaff DW (eds) *Current topics in membranes and transport*. Vol 31. Academic Press. New York: 141-190.
- Ferrari MB, Zakon HH. 1993. Conductances contributing to the action potential of *Sternopygus* electrocytes. *J Comp Physiol A* 173: 281-292.

- Ferrari MB, McAnelly ML, Zakon HH. 1995. Individual variation in and androgen-modulation of the sodium current in electric organ. *J Neurosci* 15: 4023-4032.
- Few WP, Zakon HH. 1998. Androgens act locally to broaden electric organ pulse duration. Abstract del Fifth International Congress of Neuroethology. UCSD La Jolla, California: 323.
- Franchina C, Stoddard P. 1998. Plasticity of the electric organ discharge waveform of the electric fish *Brachyhyopomus pinnicaudatus* I. quantification of day-night changes. *J Comp Physiol A* 183: 759-768.
- Franchina C, Salazar V, Volmar CH, Stoddard P. 2001. Plasticity of the electric organ discharge waveform of male *Brachyhyopomus pinnicaudatus*. II. Social effects. *J Comp Physiol A* 187: 45-52.
- Hagedorn M. 1995. The electric fish *Hypopomus occidentalis* can rapidly modulate the amplitude and duration of its electric organ discharges. *Anim Behav* 49: 1409-1413.
- Hagedorn M, Heiligenberg W. 1985. Court and spark: electric signals in the courtship and mating of gymnotid fish. *Anim Behav* 32: 254-265.
- Hagedorn M, Zelick R. 1989. Relative dominance among males is expressed in the electric organ discharge characteristics of a weakly electric fish. *Anim Behav* 38: 520-525.
- Harrelson A, McEwen B. 1987. Steroid hormone influences on cyclic AMP-generating systems. En: Strauss III JF, Pfaff DW (eds) *Current topics in membranes and transport*. Vol 31. Academic Press. New York: 217-247.
- Heiligenberg W. 1975. Theoretical and experimental approaches to spatial aspects of electrolocation. *J Comp Physiol* 103: 247-272.
- Hopkins CD. 1974. Electric communication in the reproductive behavior of *Sternopygus macrurus* (Gymnotoidei). *Z Tierpsychol* 35: 518-535.
- Kennedy MB. 1992. Second messengers and neuronal function. En: Hall ZW (ed), *Molecular Neurobiology*. Sinauer Associates. Sunderland: 207-246.
- McAnelly ML, Zakon HH. 1996. Protein kinase A activation increases sodium current magnitude in the electric organ of *Sternopygus*. *J Neurosci* 16: 4383-4388.
- McAnelly L, Zakon HH. 2000. Co-regulation of voltage-dependent kinetics of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> currents. *J Neurosci* 20: 3408-3414.
- Meyer JH. 1983. Steroid influences upon the discharge frequencies of a weakly electric fish. *J Comp Physiol A* 153: 29-37.
- Mills AC, Zakon HH. 1987. Coordination of EOD frequency and pulse duration in a weakly electric wave fish: the influence of androgens. *J Comp Physiol* 161: 417-430.
- Mills A, Zakon HH. 1991. Chronic androgen treatment increases action potential duration in the electric organ of *Sternopygus*. *J Neurosci* 11: 2349-2361.
- Rasnow B, Bower J. 1996. The electric organ discharges of the gymnotiform fishes: I. *Apteronotus leptorhynchus*. *J Comp Physiol A* 178: 383-396.
- Stoddard P. 1999. Predation enhances complexity in the evolution of electric fish signals. *Nature* 400: 254-256.
- Westby G. 1988. The ecology, discharge diversity and predatory behaviour of gymnotiform electric fish in the coastal streams of French Guiana. *Behav Ecol Sociobiol* 22: 341-354.
- Zakon HH, Thomas P, Yan HY. 1991. Electric organ discharge frequency and plasma sex steroid levels during gónada recrudescence in a natural population of the weakly electric fish *Sternopygus macrurus*. *J Comp Physiol A* 169: 493-499.

---

## CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS

---

Los Gymnotiformes son considerados peces tropicales dado que en esta zona se ha detectado la mayor abundancia y número de especies (aproximadamente 100). El límite sur de la distribución geográfica del Orden se encuentra en la cuenca del Río de la Plata, observándose una disminución gradual en el número de especies desde el trópico hacia el sur. Este trabajo estudia a los peces Gymnotiformes desde un punto de vista novedoso: como habitantes de la zona templada en el borde sur de su distribución. El enfoque neuroetológico del trabajo combina abordajes ecológicos, etológicos y electrofisiológicos que pretenden esclarecer las adaptaciones de estos peces al clima templado. En este marco, el análisis de la influencia de la temperatura adquiere especial relevancia y constituye el hilo conductor de este estudio. Se analizó la temperatura como factor ambiental responsable de la distribución geográfica del Orden, como factor temporizador del período reproductivo y como modulador de la forma de onda de la DOE interactuando con las hormonas esteroides gonadales.

Durante la realización del proyecto, se diseñaron estrategias experimentales novedosas para el Depto. de Neurofisiología del Instituto Clemente Estable y se instalaron los correspondientes procedimientos y metodologías. Se desarrolló el trabajo de campo sistemático de muestreo de Gymnotiformes y registro electrofisiológico en el hábitat natural, se montó la estación de registro simultáneo de imágenes y señales eléctricas para caracterizar la conducta reproductiva en el laboratorio y se realizaron por primera vez tratamientos hormonales y experimentos de aclimatación.

Por otra parte, como resultado de una pasantía de entrenamiento experimental realizada en el laboratorio de Harold Zakon en la Universidad de Texas en Austin, se estudió el efecto de la activación de la PKA sobre la forma de onda de *Stemopygus macrurus* (**Capítulo IV.**). En un marco más

general, el abordaje experimental utilizado en este capítulo aporta al estudio de los mecanismos subyacentes a la modulación de la forma de onda de la DOE que podrían aplicarse a la exploración de las bases de otros cambios de forma de onda, como por ejemplo la termosensibilidad de la DOE. Se demostró que la administración de AMPc provoca un aumento muy importante (200-400%) de la amplitud de la DOE y un aumento moderado de su duración (25%). Estos datos son consistentes con los hallazgos a nivel celular que constataron un aumento de la amplitud y duración del potencial de acción del electrocito debido al aumento de la magnitud de la corriente de Na<sup>+</sup>. Se postula que el rol funcional de esta modulación de la amplitud de la DOE esté vinculado a variaciones circadianas de la DOE demostradas particularmente en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* y que se planea explorar en *Stemopygus* en el futuro. Complementariamente, se propone investigar el efecto de la activación de la PKA sobre la forma de onda de la DOE en *Brachyhypopomus pinnicaudatus*.

### *Distribución biogeográfica de Gymnotiformes en Uruguay*

La determinación de la distribución geográfica de los Gymnotiformes a partir de la exploración sistemática extensiva de los cursos de agua dulce del territorio uruguayo se presentó en el **Capítulo I-A.** y constituye un estudio pionero del análisis de la biogeografía de estos peces en la zona templada. Para este análisis, Uruguay ofrece la ventaja de encontrarse en el límite sur de la distribución del Orden. Fue posible demostrar en este territorio frontera patrones de distribución diferencial entre especies y avanzar en la elaboración de hipótesis sobre el rol de los factores ambientales en la distribución que posiblemente sean también válidas a lo largo de la extensa zona habitada por los Gymnotiformes en América. Se detectó la presencia de sólo 4 especies de Gymnotiformes en Uruguay: *Gymnotus*

*carapo*, *Brachyhypopomus pinnicaudatus*, *Hypopomus* sp. y *Eigenmannia virescens*. Se destaca el hallazgo de *Hypopomus* sp. que corresponde a una especie no descrita hasta el momento y que se planea describir en el futuro. La temperatura probablemente es el principal factor ambiental involucrado en la disminución del número de especies en dirección norte-sur (zona tropical-zona templada). Por otra parte, *Gymnotus carapo* y *Brachyhypopomus pinnicaudatus*, que fueron encontrados en un alto porcentaje de los sitios explorados y con alta abundancia relativa, se distribuyen de manera no uniforme en Uruguay. *Gymnotus carapo* habita en todo el territorio y es la única especie presente en el área S; *Brachyhypopomus pinnicaudatus* habita en la región noreste y predomina en el área E. Se demostró que esta distribución diferencial puede explicarse parcialmente por patrones espaciales diferenciales de conductividad eléctrica y pH.

*La temperatura como factor ambiental temporizador del período reproductivo en Brachyhypopomus pinnicaudatus*

La reproducción cíclica de peces tropicales relacionada con la alternancia de las estaciones seca y lluviosa fue descubierta por Kirschbaum en Gymnotiformes. El ciclo reproductivo de los Gymnotiformes de la zona templada se produce en condiciones ambientales muy diferentes a las del trópico y necesariamente implica la participación de otros factores ambientales en su regulación. En el **Capítulo I-B**, se presentó el seguimiento de una población de *Brachyhypopomus pinnicaudatus* a lo largo del año que permitió identificar la ocurrencia del período reproductivo entre los meses de noviembre y enero en coincidencia con temperaturas del agua elevadas y fotoperíodo extremo. La progresión a lo largo del año del dimorfismo sexual de la DOE de los machos confirma estos datos (**Capítulo III-A**). La hipótesis de que el aumento de los valores promedio de la temperatura del agua observados en la Naturaleza es el estímulo que desencadena el período reproductivo en Gymnotiformes de la zona templada fue confirmada en el laboratorio por experimentos de aclimatación. El aumento sostenido de la temperatura del agua es un estímulo ambiental suficiente para desencadenar la madurez sexual en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* (**Capítulo III-A**).

**Conducta reproductiva en Brachyhypopomus pinnicaudatus**

La conducta reproductiva de los Gymnotiformes incluye despliegues locomotores y eléctricos que han sido explorados en un número reducido de especies. El estudio de la conducta de cortejo en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* se diseñó en forma complementaria entre el hábitat natural y el laboratorio, lo que constituye un aporte de este trabajo (**Capítulo II**). Se estableció como estrategia general, la identificación preliminar de los despliegues eléctricos del cortejo en el hábitat y, posteriormente, la observación de la conducta reproductiva en condiciones semi-artificiales en el laboratorio por medio del registro simultáneo de señales eléctricas e imágenes. Para el análisis de los despliegues locomotores se identificaron categorías conductuales (espaciales y dinámicas) que permiten la descomposición de comportamientos complejos en unidades sencillas y que probablemente sean aplicables a la caracterización de otras conductas en esta y otras especies de Gymnotiformes. Las señales eléctricas propias de la conducta de cortejo incluyeron: la emisión de ráfagas de distintos tipos de chirps emitidos por los machos, interrupciones de la descarga por parte de las hembras y un aumento nocturno de la frecuencia basal de machos y hembras que resultó significativamente mayor que el observado fuera del período reproductivo. Se seleccionaron segmentos de grabación (secuencias) que presentaron un chirp de macho seguido (en menos de 10 s) por una interrupción de hembra. En estas secuencias se destaca la asociación de la emisión de modulaciones de frecuencia con el estado espacial perpendicular y la unidad dinámica aproximación. El cese de la descarga de la hembra producido inmediatamente después de la emisión del chirp del macho resultó estadísticamente significativo, ratificando el valor electrocomunicativo de estas señales durante el cortejo.

Los datos presentados en el **Capítulo II** constituyen datos preliminares de un proyecto que se encuentra actualmente en curso en el Depto. de Neurofisiología del Instituto Clemente Estable. En el futuro inmediato, se planea completar la caracterización de la conducta de cortejo en *Brachyhypopomus pinnicaudatus* ajustando el diseño experimental utilizado e integrando nuevos

abordajes; y avanzar en la exploración de las bases circuitales y celulares de las diferencias sexuales y estacionales en la producción de chirps e interrupciones.

*Termosensibilidad de la DOE en Brachyhyopomus pinnicaudatus y Gymnotus carapo*

En el **Capítulo III-B.**, se describió la termosensibilidad de la DOE, sus variaciones estacionales y su rol como indicador de madurez sexual. La termosensibilidad de la DOE constituye el efecto más inesperado y relevante de la temperatura sobre la forma de onda demostrado en Gymnotiformes de la zona templada. El aumento de la temperatura dentro del rango observado en la Naturaleza provoca una disminución de la amplitud de la última fase cabeza-negativa de la DOE de hasta el 90% sin afectar mayormente la amplitud de las otras fases. La termosensibilidad pone en evidencia un efecto diferencial de la temperatura sobre los mecanismos de generación de los distintos componentes de la DOE: el resultado de la activación sináptica de las caras caudales de los electrocitos es menos sensible a la temperatura que la propagación de las corrientes de acción a las caras rostrales de los mismos. Las variaciones estacionales de la termosensibilidad de la DOE demostradas en *Brachyhyopomus pinnicaudatus* sugieren una interacción de los efectos de la temperatura y de las hormonas esteroides sobre la forma de onda de la DOE. La termosensibilidad de la DOE constituye un indicador novedoso de madurez sexual en tanto depende de los niveles de andrógenos y es modulado por la temperatura (factor ambiental involucrado en el desencadenamiento del período reproductivo en la zona templada). Mientras que la termosensibilidad de la DOE implica cambios drásticos de la forma de onda que ponen en riesgo la función electrocomunicativa, las hormonas esteroides preservan a la DOE de

los efectos deletéreos de la temperatura durante la reproducción asegurando la plenitud comunicativa en este período.

La temperatura es una variable particularmente importante en animales poiquiloterms, en los que afecta sus procesos fisiológicos actuando sobre la magnitud y dinámica de muchos procesos fisiológicos. En este trabajo, se analizó a la temperatura como factor ambiental y como parámetro físico. Como factor ambiental, se demostró que la temperatura actúa como factor temporizador del período reproductivo en Gymnotiformes de la zona templada. La temperatura elevada y sostenida promueve la activación del eje hipotálamo-hipofisario, la maduración gonadal y el incremento subsecuente del nivel de hormonas esteroides. La vía por la cual la temperatura ambiente modula al sistema neuro-endócrino no está aclarada aún, lo que abre un atractivo campo de investigación en el que los Gymnotiformes adaptados al clima templado podrían convertirse en preparados ventajosos ya que presentan caracteres sexuales secundarios que pueden cuantificarse por métodos no invasivos. La termosensibilidad de la DOE pone en evidencia la acción de la temperatura como parámetro físico que afecta algunas propiedades de membrana, mecanismos de transmisión sináptica y de generación de potenciales de acción. Queda pendiente para el futuro la exploración de los mecanismos celulares y subcelulares subyacentes a la termosensibilidad de la DOE y a su plasticidad. Se deberán investigar los cambios de las propiedades de membrana inducidos por escalones de temperatura que afectan de manera diferencial a las caras rostrales y caudales de los electrocitos. Asimismo, se deberán explicar los mecanismos por los que los cambios estacionales graduales de la temperatura cambian las propiedades de membrana y modifican la termosensibilidad de la DOE.

