





Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable Departamento de Neurociencias Integrativas y Computacionales PEDECIBA Biología Tesis de Maestría

Efectos de la luz sobre la tasa de repetición de la descarga del órgano eléctrico de *Gymnotus omarorum*

Autora: Ana S. Camargo Orientador: Dr. Pedro Aguilera Coorientador: Dr. Ángel Caputi

> Montevideo, Uruguay 24/08/2023

Tribunal asignado: Dra. Anita Aisenberg

Dra. Adriana Migliaro

Dr. Flavio Pazos

Agradecimientos:

Primeramente agradecer a mi familia por todo el trabajo en equipo que realizaron para que lograra estudiar, para hoy pudiera estar acá y entender que los meses sin ir a visitarlos era por trabajo o estudio, y siempre me dieron toda la energía para seguir. Principalmente a mi madre por el apoyo incondicional, por la motivación a que continuara en este trayecto, más allá de llegar muchas veces después de 10 o 12hs de trabajo y poder quedarme solo en sus momentos de novela a acompañarla al final del día. A todos mis seres queridos que me vieron empezar este camino y ahora igual lo están haciendo pero desde otro lugar.

A mis compañeros de laboratorio que fueron los mejores y siempre me ayudaron. A mi amiga "Juanita", Inés Camacho, quien empezó conmigo en UNIC y me daba apoyo moral en mis instancias de concursos con el "dale que vos podés". Joe, Joseph Waddell el mejor compañero de laboratorio que pude tener en estos años, el cual atomicé con dudas sobre Matlab y otras tantas, "Ana, respira" era su frase de cabecera, hasta que creó un filtro para mi voz (es chistoso pero cierto) según Federico Pedraja. Otro gran compañero que más allá del poco tiempo compartido llevo su buena onda para la vida, me ayudó muchísimo con Arduino mientras entonaba algunas canciones. Después vino Francisco Cervantes, que hablaba muy poco pero creo que hablé tanto, que forzosamente más que un compañero de trabajo ahora es un amigo. No tengo palabras para agradecerle toda la contención, la ayuda para organizarme sobretodo en esta etapa final de entrega de tesis.

Agradecer también a todos los compañeros y amigos de otros laboratorios por la buena disposición siempre.

Mi tutor Pedro Aguilera y Co-tutor Ángel Caputi. Por ofrecerme ser parte de este proyecto y realizar una maestría. A Ángel que siempre me ayudó para que lograra terminar este trabajo, me enseñó innumerables cosas entre ellas tangos antiguos, historia, estadística, física, etc, siempre buscando un lugar para dibujar la explicación. Me llevo de recuerdo las idas a la Laguna del Sauce con ustedes, que quienes fueron saben que es toda una aventura.

Agradecer a mi tribunal, Anita Aisenberg, Adriana Migliario y Flavio Pazos, por la paciencia, la contención y las dudas aclaradas con relación a este trabajo.

A los laboratorios por donde pasé durante mi aprendizaje, muchas gracias a Silvia Olivera por dejarme tan amablemente realizar una pasantía en su laboratorio, a Marita Castelló por ayudarme con revelados y acompañarme al microscopio confocal, a María Inés Rehermann y Anabel Fernández por ayudarme con las técnicas histológicas y prestarme reactivos.

A todos mis amigos por escucharme una y otra vez hablando de lo mismo y así mismo lo siguen haciendo.

Y a todos que fueron mi soporte en esta última etapa. ¡Muchas gracias!

Resumen

Los Gymnotiformes son peces nocturnos que habitan en las raíces de las plantas flotantes en las orillas de lagunas de aguas fangosas. Utilizan la descarga de un órgano eléctrico (DOE) para explorar el entorno y para comunicarse. Aquí mostramos y describimos respuestas electromotoras tónicas y fásicas a distintos niveles de iluminancia. Las primeras, son distintas a las de los "efectos indirectos" de la luz a través de la sincronización en fase de los ritmos circadianos. En la oscuridad, principalmente durante la noche, el histograma de intervalo inter-DOE es típicamente bimodal, de modo que el pico principal corresponde a una actividad sostenida del marcapasos, que denominamos intervalo o frecuencia basal y el pico secundario corresponde a episodios transitorios de alta frecuencia. La luz a niveles equivalentes a 420 lux causó dos efectos tónicos pero opuestos en la tasa de repetición de la DOE. El primero causó un aumento de la regularidad evidenciado por un mayor pico principal del histograma inter-DOE, con disminución de su dispersión a expensas de una importante reducción o desaparición del pico secundario lo cual sugiere que los estímulos luminosos luz bloquean los mecanismos que inducen los de los episodios de alta frecuencia. En segundo lugar, la moda del pico principal disminuyó sugiriendo un efecto excitatorio de la iluminancia sobre la tasa de repetición de la DOE. Las respuestas fásicas presentan un curso temporal típico, cuya amplitud aumenta con la intensidad del estímulo. No obstante, su curso temporal más lento y la falta de adaptación las diferencian de las denominadas respuestas de novedad provocadas por cambios bruscos en estímulos sensoriales de otras modalidades. Ha sido reportado, y en este estudio confirmamos, que los Gymnotus tienden a huir de la luz (tenebrotaxia), lo que sugiere que estas respuestas fásicas son probablemente parte de una respuesta global de evitación de la luz donde participan no solo acciones electro- sino también esqueletomotoras. Dentro de un contexto etoecológico, interpretamos que durante la noche, cuando estos peces están activos, la reducción de la iluminancia posee un efecto global sinérgico al ritmo diario habitual y facilita la aparición de los episodios de alta frecuencia cuyo significado comportamental no es aún bien conocido. Durante el día, los peces descansan en regiones sombrías bajo las plantas acuáticas evitando las zonas luminosas generadas por el fenómeno de Tyndall ocasionado por el pasaje de rayos de luz a través de pequeños "ojos" entre plantas. El movimiento de las plantas por las corrientes así como el movimiento del sol modifican dichas zonas de luz exponiendo a estos peces a sus depredadores habituales (por ejemplo Hoplias sp.) los cuales son macrópticos. Las respuestas tenebrotáxicas fásicas durante el día permitirían a los peces la evitación de sus predadores y facilitar el seguimiento del movimiento de las islas de plantas flotantes causado por el viento y/o las corrientes de agua.

Abstract

Gymnotiformes are nocturnal fishes that inhabit the root mats of floating plants. They use the discharge of an electric organ (EOD) both to explore the environment and to communicate. Here we show and describe tonic and phasic sensory-electromotor responses to light distinct from indirect effects depending on the light-induced circadian rhythm. At dark, principally during the night, inter-EOD interval histogram is typically bimodal such that the main peak corresponds to the basal rate and a secondary peak corresponds to high frequency bouts. Bright light caused two tonic but opposed effects on the EOD rate, whereby the main peak of the histogram was increased and its mode decreased at the expense of an erasure of the secondary peak due to light blocking high frequency bouts. Additionally, light evokes phasic responses whose amplitude increases with intensity but whose slow time course and lack of adaptation differentiate from the so-called novelty responses evoked by abrupt changes in sensory stimuli of other modalities. It is known, and we confirmed that Gymnotus tend to escape from light suggesting that these phasic responses are probably part of a global "light avoidance response". Within an ecological context, we interpret that during the night, when these fish are active, the lack of light has an overall effect synergetic to the usual daily rhythm. Fish rest under the shade of aquatic plants during the day. Bright light spots due to the sun movement alerts the fish to hide in shady zones to avoid macroptic predators and facilitate tracking the movement of floating plant islands by wind and/or water currents.

Resumo

Gymnotiformes são peixes noturnos que habitam as raízes de plantas flutuantes nas margens de lagoas lamacentas. Eles usam a descarga do órgão elétrico (DOE) para escanear o ambiente e se comunicar. Aqui mostramos e descrevemos as respostas sensório-eletromotoras tônicas e fásicas à luz, além dos efeitos indiretos que dependem do ritmo circadiano induzido pela luz. No escuro, principalmente à noite, o histograma do intervalo inter-DOE (intervalo inter-pulso) é tipicamente bimodal, de modo que o pico principal corresponde à taxa basal e o pico secundário corresponde aos episódios de alta frequência. A luz brilhante causou dois efeitos tônicos, porém opostos, na (frequência) taxa da DOE, pelo qual o pico principal do histograma aumentou e a sua moda diminuiu à custa de apagar (desaparecer) o pico secundário devido à que a luz produz o bloqueio dos episódios de alta frequência. Além disso, a luz evoca respostas fásicas cuja amplitude aumenta com a intensidade, mas cuja lentidão temporal e falta de adaptação as diferenciam das chamadas respostas de novidade provocadas por mudanças bruscas nos estímulos sensoriais de outras modalidades. Sabe-se e confirma-se que os Gymnotus tendem a fugir da luz, sugerindo que estas respostas fásicas são provavelmente parte de uma "resposta global de evasão à luz". Dentro de um contexto ecológico, interpretamos que durante a noite, quando esses peixes estão ativos, a falta de luz tem um efeito sinérgico global no ritmo diario habitual. Os peixes descansam à sombra de plantas aquáticas durante o dia. Pontos de luz brilhantes devido ao movimento do sol alertam os peixes para se esconderem em áreas sombreadas, para evitar predadores macrópticos e para facilitar o rastreamento do movimento das ilhas de plantas flutuantes causadas pelo vento e/ou correntes.

ÍNDICE

Capítulo 1. Introducción1
1.1 La adaptación funcional a medios de baja luminosidad se asocia con la aparición de
sentidos homeoactivos2
1.2 El problema a estudiar y la elección del modelo5
Capítulo 2. Antecedentes
2.1 La DOE como conducta
2.2 Participación de la luz en el mecanismo de sincronización entre diversos ritmos del
organismo
2.3 Efectos conocidos de la luz sobre el ritmo de descarga del órgano eléctrico10
Capítulo 3. Hipótesis y objetivos14
3.1 Hipótesis14
3.2 Objetivos14
3.3 Objetivos específicos14
Capítulo 4. Métodos16
4.1 Animales y ética
4.2 Diseño experimental16
4.3 Configuración experimental16
4.4 Caracterización de las respuestas tónicas a la luz18
4.5 Caracterización de las respuestas fásicas20
4.5.1 Curso temporal
4.5.2 Efecto de la intensidad del estímulo21
4.5.3 Evaluación de la adaptación22
4.6 Análisis conductual de la preferencia entre luz u oscuridad23
4.7 Procesamiento de datos
Capítulo 5. Caracterización de la eco-fisiológica de la iluminancia del hábitat de G.
omarorum25
Capítulo 6. Las respuestas tónicas provocadas por estímulos de iluminancia
constante

Capítulo 7. Las respuestas fásicas provocadas por estímulos luminosos breves3	32
7.1 Amplitud de las respuestas en función de la intensidad del estímulo	34
7.2 Adaptación de las respuestas fásicas y comparación con respuestas de novedad	36

Capítulo 8. Comportamiento de evitación de la luz, ¿fotofobia o tenebrotaxia?	38
8.1 Comportamiento de evitación de la luz	38
8.2 Inversión del lado de preferencia de natación por la oscuridad en función de	la
iluminancia	39

Capítulo 9. Discusión4	10
9.1 La fotoestimulación provoca la aceleración del marcapasos per se4	1
9.2 ¿Cuál podría ser el papel funcional de las aceleraciones del marcapasos evocadas po	or
la luz?4	14

Capítulo 10. Conclusiones y perspectivas	47
10.1 Conclusiones	47
10.2 Perspectivas	48

Referencias	.50
Anexo I. Desarrollos Metodológicos Originales	.59
A.1 Medición de la iluminancia	.59
A.2 Construcción de los medidores de luz	.60
A.3 Calibración de medidores de luz	.61
A.4 Evaluación de la cadencia de disparo de la DOE y control de estímulos sensoriales	.62

Capítulo 1. Introducción

La luz es una parte del espectro electromagnético emitido por el sol. No obstante, el término luz es vago si por éste nos referimos a la fracción que juega un rol crucial en el mantenimiento de la vida en el planeta. Esta fracción del espectro de longitudes de onda tiene límites difusos entre décimas de milímetros y decenas de nanómetros.

En sentido lato, la luz es una señal en sí misma y una portadora fundamental de información para casi todos los seres vivos. Por lo tanto éstos han desarrollado mecanismos especiales para evaluar el espectro electromagnético que arriba a la Tierra, y utilizar estas señales para la organización y control del comportamiento.

Debido a los movimientos de rotación y traslación de la Tierra, los efectos de la luz son predictivos de las fases de los ciclos diurnos y anuales, por lo que los animales utilizan sistemas de detección de los niveles medios de luz a corto y mediano plazo, y una fisiología que puede ser cíclica que acompaña y se sincroniza con los ciclos lumínicos. La luz tiene efectos sensoriales sobre distintas funciones del sistema nervioso y neuroendócrino. Entre estos efectos se destacan dos: la sincronización con los ciclos anuales, estacionales y diarios, y la visión. En el primer caso la luz es la señal, en el segundo es la portadora de señales.

El factor luz cumple un importante rol en las estrategias adaptativas estacionales de los animales, incluida la reproducción y las respuestas al estrés durante la temporada de reproducción. El comportamiento de supervivencia individual puede agotar los recursos para la reproducción, y recíprocamente la ausencia de recursos disminuir las posibilidades reproductivas. La duración del día (fotoperíodo), es la señal utilizada que permite anticipar las próximas estaciones y adaptar la fisiología al ciclo anual. Sobre los mamíferos el ciclo anual de luz interviene en el control hormonal del metabolismo fosfo-cálcico animal a través de la conversión de un precursor térmicamente lábil previtamina D3 en vitamina D. Esta última posee múltiples blancos, a nivel intestinal, óseo, renal, hepático y los sistemas circulatorio, inmune y nervioso (Rowan, 1925; Webb y Holick, 1988; Zanuy y Carranza, 2007).

La variación lumínica diaria causa la sincronización de los ritmos circadianos a distintos niveles de organización, desde la expresión génica al comportamiento (Cowan et al., 2017).

Los ritmos circadianos son ritmos biológicos de naturaleza endógena que tienen un período cercano a las 24hs, expresan un comando rítmico generado por relojes endógenos que son capaces de sincronizarse con señales externas o "zeitgebers".

La generación y el mantenimiento de estos ritmos depende de la expresión de un grupo de genes reloj, cuya transcripción rítmica controla la actividad circadiana (Albrecht y Eichele, 2003; Holzberg y Albrecht, 2003; Ko y Takahashi, 2006). Se requiere la recepción y la percepción de señales sensoriales provenientes del ambiente con el fin de acompasar los relojes internos y de esta forma poder sincronizar por ejemplo, con el ritmo diario. El ritmo generado por estos osciladores es transmitido al resto del organismo para lograr la expresión coordinada de diferentes ritmos en distintos sistemas (Golombek y Rosenstein, 2010).

El cambio diario estable y sistemático en la calidad y cantidad de la luz al amanecer o al anochecer proporciona el indicador de la fase del día. La transición del fotoperíodo es considerado como una señal externa temporal "zeitgeber" principal para ajustar la fase circadiana (foto-sincronización, Roenneberg y Foster, 1997). No solo la intensidad de luz es importante sino que la distribución de potencia espectral de la luz solar cambia a lo largo del día (Théry et al., 2008).

Finalmente, la luz da origen a la visión. Sin embargo, es la visión de cada especie la que determina qué parte del espectro electromagnético es "luz visual" para dicha especie. Dado que los fotorreceptores expresados por distintas especies han evolucionado para distintos ambientes, existen especies con sensibilidad a distintos espectros de longitud de onda característico de modo que podría decirse que existen adaptaciones diversas.

La capacidad fotosensorial se encuentra en la evolución en la piel de organismos simples y también en órganos visuales especializados.

1.1 La adaptación funcional a medios de baja luminosidad se asocia con la aparición de sentidos homeoactivos

Algunos animales prefieren permanecer en la oscuridad y otros en la luz. Según la evolución funcional basada en tareas, considera que los sistemas sensorial y nervioso evolucionan en un contexto conductual. La necesidad evolutiva del desarrollo de la visión y también de su pérdida, está asociada a las tareas realizadas por la visión. Desde este enfoque los sentidos son un medio para un fin funcional, la visión puede haber surgido como el sentido más útil para determinadas tareas y en contra partida otros sentidos pueden compensar la visión cuando esta no está presente (o escasamente presente). La pérdida de agudeza visual ha evolucionado en linajes que habitan en ambientes donde la disponibilidad de la portadora lumínica es relativamente baja, la disminución de la acuidad visual está relacionada con la adaptación de otras capacidades sensoriales y motoras funcionales para su entorno vital (de Sousa et al., 2022).

En general, las especies cuya visión es pobre con respecto a las de sus potenciales depredadores conquistan ambientes de baja luminosidad o hábitos nocturnos, escondiéndose durante el día y compitiendo de forma más eficiente con distintas especies por el nicho temporal nocturno (Clark, 1914). Llamamos a esta afinidad por la oscuridad "tenebrotaxia" por oposición a fototaxia. Entre las especies que muestran tenebrotaxia, es frecuente encontrar la emergencia de otros sentidos, adaptaciones diversas para la detección de información en un entorno poco iluminado u oscuro.

No obstante debemos destacar que existen ejemplos que combinan una buena visión diurna con una precisa audición nocturna aloactiva (*allo* del griego antiguo "otro, distinto"; en la detección aloactiva el animal altera activamente solamente la configuración del sensor, sin alterar el entorno). Citaremos el ejemplo de los Strigiformes, orden de aves compuesto por la familia Tytonidae, *Tyto alba;* comúnmente conocido como lechuza común o lechuza de los campanarios. Éstas aves mueven las plumas de su disco facial para manipular la configuración de sus sensores, alterando la distancia focal para el sonido recibido en el oído.

Muchos de estos sentidos se basan en la autogeneración de la portadora de señales sensoriales es decir, detección homeoactiva (*homeo* del griego "semejante"). La detección homeoactiva, agrega energía al medio ambiente, se la distingue de la detección aloactiva en la cual la acción exploratoria consiste en la modificación de la posición del mosaico sensorial o de la configuración de los filtros pre receptoriales (movimiento de los ojos y control de la curvatura del cristalino respectivamente; Caputi 2004).

Habitualmente, la detección homeoactiva se asocia a la aloactiva por lo cual no son estrategias sensoriales alternativas sino complementarias, en la detección homeoactiva no hay cambio en la configuración del receptor, por esta razón casi siempre se combina con la detección aloactiva, que sí cambia las propiedades del receptor. La mayoría de los animales utilizan la detección aloactiva, mientras que solo algunas especies han desarrollado mecanismos para la detección homeoactiva (Zweifel y Hartmann, 2020). Se puede considerar que los sistemas de detección sensoriales homeoactivos son un subconjunto de los sistemas de detección que utilizan la detección aloactiva, que utilizan la detección sensoriales homeoactivos son un subconjunto de los sistemas de detección que utilizan la detección son complementarias, las mismas se encuentran presente en las especies en las cuales la tendencia a habitar ambientes nocturnos.

Destacamos seguidamente algunos ejemplos:

Roedores, orden Rodentia, familia Muridae, subfamilia Murinae, género Rattus; conocidos como animales nocturnos, que utiliza conjuntamente su olfato y su sistema táctil (vibrisas), para sensar y recopilar información sobre su entorno.

El sistema de vibrisas se utiliza para escanear activamente el entorno y recopilar información relevante para el comportamiento, mediante el control motor de los aparatos sensoriales. (Adibi et al., 2012; Diamond y Arabzadeh, 2013; Adibi, 2019; Harrell et, al., 2020).

Murciélagos, orden Chiroptera, suborden microquirópteros, el comportamiento de ecolocalización de estos animales consiste en reconstrucción del ambiente a partir de las imágenes que el sonido emitido por el el animal y reflejado en los objetos (eco), causa en el oído. Durante este comportamiento los murciélagos ajustan la orientación de sus cabezas y orejas. Este es un sentido activo dado que se basa en la emisión de pulsos ultrasónicos con intervalos que se adaptan a las necesidades de detección. Con el fin de afinar la ubicación, cuando los obstáculos se interponen en su ruta, o aparecen ecos correspondientes a potenciales presas, el murciélago realiza una aceleración en la emisión de pulsos de sonido, logrando una "imagen" acústica más detallada de su entorno (Spallanzani, 1798; Griffin, 1958; Suga et al., 1990; Zweifel y Hartmann, 2020).

Peces eléctricos, el sentido eléctrico de peces Gymnotiformes, familia gymnotidae y Osteoglossiformes, família Mormyridae se basa en el desarrollo de receptores capaces de detectar la diferencia de potencial a través de su piel (electroreceptores, Lissmann, 1951; Bullock, 1982; Moller, 1995; Caputi, 1999; Bullock et al., 2005). Este sentido permite detectar la presencia de objetos y animales utilizando imágenes eléctricas de los mismos.

Los objetos de impedancia distinta del agua se comportan como fuentes eléctricas virtuales cuya emisión estimula el mosaico receptorial cutáneo generando una imagen que depende de la impedancia, forma y tamaño de los objetos y de la posición y rotación relativa con respecto al pez. También fuentes eléctricas auténticas pueden generar imágenes. Un caso particular es la presencia de otro pez eléctrico, las imágenes eléctricas pasivas y activas pueden impulsar el acercamiento hacia un posible oponente, teniendo en cuenta que son peces territoriales (Pedraja et al., 2016).

Los peces eléctricos son capaces de detectar, discriminar y localizar fuentes eléctricas, en particular aquellas cuya forma de onda caracteriza a su especie o, en los casos de dimorfismo sexual al mismo o al otro sexo (Lissmann y Machin 1958; Bennett, 1971; Silva et al., 2007; Caputi et al., 2011; Markham, 2013; Kramer, 2020; Waddell y Caputi, 2020).

1.2 El problema a estudiar y la elección del modelo

En esta tesis se enfoca en la modulación del ritmo de descarga del marcapasos en Gymnotus *omarorum* en distintas condiciones de iluminancia en estado estacionario y la modulación mediante cambios transitorios en las condiciones de iluminancia. La elección de esta especie se justifica por ser un modelo simple para el estudio de un comportamiento sofisticado de respuesta a cambios realizados en su entorno.

Los peces eléctricos son un excelente modelo neurobiológico desde el punto de vista anatómico funcional y evolutivo. Los peces eléctricos Africanos Mormyridos, son macrópticos, viven en aguas claras y son capaces de distinguir formas geométricas utilizando su visión (Schuster v Amtsfeld, 2002; Schumacher et al., 2017). A diferencia de los mormyridos, los gymnótidos en particular los emisores de pulsos, habitan en aguas turbias, entre las raíces de plantas acuáticas y son predominantemente nocturnos (Waddell et al., 2019; Waddell y Crampton, 2020). Gymnotus omarorum, es una especie endémica en Uruguay y de fácil accesibilidad. Ha sido muy bien estudiada en nuestro medio donde se han descrito en detalle los mecanismos de generación de la descarga del órgano eléctrico (DOE) (Caputi, 1999; Caputi et al., 2011), los mecanismos de la generación de la imagen eléctrica (Caputi y Budelli, 2006; Caputi, 2023), los mecanismos de transducción (Rodríguez-Cattaneo et al., 2017; Caputi y Agulera, 2019), la dinámica del ciclo electrosensorial-electromotor (Caputi et al., 2023), los mecanismos de control sobre el marcapasos (Comas y Borde, 2010; Borde et al., 2020) y las variaciones endógenas de la frecuencia de descarga durante el comportamiento de defensa territorial (Perrone et al., 2019). En este contexto general, más recientemente se ha comenzado a estudiar los mecanismos neurobiológicos subvacentes a la sincronización de fase entre el ritmo circadiano biológico y la variación diaria del patrón lumínico, en particular la tasa de repetición de la DOE. Por este motivo, emerge como una incógnita de importancia la sensibilidad de estos peces a la luz y la potencialidad de evocar cambios transitorios (respuestas fásicas) y sostenidos (respuestas tónicas) en la tasa de repetición de la DOE.

En general se considera que estos peces expresan tenebrotaxia, preferencia de vivir en la oscuridad, en Gymnotus *omarorum* y en la especie congenérica Gymnotus *carapo*, esta conducta fue reportada por (Maximino et al., 2007). Ha sido reportado además que pulsos de luz tienden a aumentar la frecuencia de la DOE (Capurro et al., 1994). Sin embargo, los efectos sensoriales de la luz en el comportamiento de *G. omarorum* son difíciles de interpretar dado que se intrincan con efectos de la luz sobre la sincronización del ciclo circadiano endógeno (Migliaro, 2018).

Capítulo 2. Antecedentes

Este estudio se enfoca en una especie de peces eléctricos de descarga débil: Gymnotus omarorum, del género Gymnotus, pertenecientes a la familia Gymnotidae; del orden Gymnotiformes. En nuestro país habitan varias especies del orden Gymnotiformes. Estos emiten sempiternamente descargas eléctricas de baja intensidad (se denominan descargas del órgano eléctrico, DOEs) y expresan una modalidad de detección sensorial denominada electrorrecepción activa. La DOE es la portadora de señales reaferentes para su propio sistema electrosensorial o señales exaferentes para el sistema electrosensorial de otro individuo. Al ocurrir la descarga del órgano eléctrico todo el cuerpo del pez se transforma en una fuente electrogénica distribuida, formando un campo eléctrico que permite al animal polarizar en forma heterogénea el medio que lo rodea. La presencia de un objeto genera una fuente eléctrica virtual cuya magnitud es función de la diferencia de impedancia del medio, o sea entre el objeto y el agua (Lissman y Machin, 1958; Caputi, 1999). El conjunto de fuentes virtuales proyecta sobre la piel una imagen eléctrica del ambiente que es evaluada por un mosaico de receptores cutáneos (Caputi et al., 2003; Pereira and Caputi, 2010; Rodríguez-Cattaneo et al., 2017). Esto permite a estos peces, al evaluar las imágenes generadas por la polarización de dichos objetos, localizarlos e identificarlos (Caputi et al., 2011). También les permite discriminar entre individuos con y alo-específicos (Aguilera et al., 2001) y entre individuos del mismo u otro sexo (Waddell and Caputi, 2020 a, b; 2021) por lo cual se considera que estas descargas podrían llevar señales de comunicación, aun cuando los códigos aún no han sido identificados .

2.1 La DOE como conducta

La DOE de los peces Gymnotiformes es una señal característica de la especie que codifica información en su frecuencia y forma de onda, sobre la identidad, sexo y estado fisiológico del individuo (Bullock et al., 2005).

Esta descarga en *Gymnotus omarorum* constituye una serie de breves pulsos estereotipados emitidos aproximadamente cada 30 ms con un pequeño coeficiente de variación (alrededor de 0,01-0,02, Capurro,1994); y una forma de onda con cuatro componentes característica de la especie. Estos componentes se corresponden con la activación diferencial de distintos segmentos del órgano eléctrico a lo largo del cuerpo del pez. La forma de onda emitida por cada región del pez, resulta del patrón de inervación, la secuencia de activación, y la excitabilidad de las células que componen el órgano eléctrico denominadas electrocitos.

Éstas, se disponen en tubos como las pilas de una linterna de mano de modo que la activación de la membrana celular correspondiente a caras igualmente orientadas (homólogas) tiende a ser sincrónica. Por lo tanto cada componente refleja las actividades sincrónicas de la caras homólogas, correspondiendo a las caras de orientación caudal las deflexiones cabeza positiva y a las de orientación rostral las deflexiones negativas (Trujillo-Cenóz et al., 1984; Caputi et al., 1989; Macadar et al., 1989; Trujillo-Cenóz y Echagüe, 1989).

El control de la descarga del órgano eléctrico de los peces Gymnotiformes de pulso se realiza por medio de dos procesos relativamente independientes: (a) el control de la secuencia de intervalos entre pulsos (Barrio et al., 1991; Capurro et al., 1994) y (b) la organización de la forma de onda de cada pulso (Caputi, 1999). Cada descarga está comandada por un núcleo cerebral o marcapasos que recibe e integra múltiples entradas (Bullock, 1969), y generalmente modula su frecuencia de descarga dependiendo de su nivel de excitación (Keller et al., 1991; Falconi et al., 1997). Éste proyecta sobre un núcleo relé el cual a su vez proyecta sobre electro motoneuronas localizadas en la médula espinal a lo largo de una columna inmediatamente dorsal al canal central (Caputi et al., 1989; Caputi, 1999; Kawasaki and Heiligenberg, 1989; Keller et al., 1991). Los axones de estas neuronas proyectan sobre los electrocitos (Caputi, 1999; Markham, 2013).

El factor de seguridad, al menos global, de esta red neural es tal en condiciones habituales que a cada impulso generado por el comando marcapasos le corresponde una DOE siempre igual a sí misma (Black-Cleworth; 1970, Caputi et al., 1989; Macadar et al., 1989; Trujillo-Cenóz y Echagüe, 1989). Con excepción de las situaciones de alta demanda de frecuencia como por ejemplo, luego de perder una pelea intraespecífica ocurre la modulación del ritmo continuo de la DOE (chirps), durante las interacciones sociales con el congénere del cual es subordinado, mediante bajas frecuencias de la DOE (Zakon et al., 2002). Los peces eléctricos emisores de pulsos evalúan imágenes electrosensoriales sucesivas generadas por descargas eléctricas autoemitidas, creando una representación neuronal del mundo físico. Los intervalos entre descargas (resolución del sistema) están controlados por un núcleo marcapasos bajo la influencia de señales reaferentes. Los estímulos sensoriales novedosos evocan aceleraciones transitorias de la frecuencia del marcapasos, denominadas respuestas de novedad (Caputi et al., 2003). Éstas consisten en aceleraciones transitorias de la tasa de DOE luego de la ocurrencia de un cambio en la entrada sensorial. Las propiedades características de la respuesta de novedad, son que la misma depende de la modalidad, intensidad, duración y del historial previo del estímulo. Una característica importante de la respuesta de novedad es la habituación, dada ante una serie de estímulos repetitivos de una determinada modalidad sensorial sin variación de los parámetros. Además, cada modalidad sensorial se habitúa por separado.

Cabe destacar que el nivel de habituación depende de la intensidad del estímulo y del intervalo interestímulo. Sin embargo fuerte estímulo disruptivo de otra modalidad conduce a la deshabituación (Post y von der Emde, 1999).

Por lo tanto, el elemento más variable del control de la descarga y que puede generar más información para el experimentador en el momento de diseñar experimentos neurofísicos, es el intervalo entre descargas determinado por la actividad marcapasos (Caputi et al., 2003).

2.2.1. Participación de la luz en el mecanismo de sincronización entre diversos ritmos del organismo

En los mamíferos la señal luz/oscuridad sincroniza el ritmo de los relojes endógenos, en este caso el oscilador principal es el núcleo supraquiasmático, que a su vez induce la producción de melatonina en la glándula pineal, la melatonina generada actuará en diversos blancos con función regulatoria. En otros mamíferos no vertebrados, el sistema carece de esta jerarquía lineal y se encuentra distribuido en varias estructuras, por ejemplo en los peces teleósteos el sistema circadiano consta de una serie de osciladores interconectados, y parcialmente independientes (Falcón et al., 2007, 2010; Idda et al., 2012). Otra diferencia a destacar es que la retina no es la única estructura fotorreceptora, ya que existe la expresión de una gran variedad de opsinas en distintas áreas centrales, como el complejo pineal y el hipotalámico (Perez et al., 2019). Con lo dicho anteriormente se puede definir al sistema circadiano de los peces teleósteos como una red de estructuras interconectadas.

El ritmo circadiano en peces ha sido ampliamente estudiado en Zebrafish (*Danio rerio*, Haffter et al., 1996; Cahill et al., 1998; Hurd et al., 1998; Whitmore et al., 2000). La actividad locomotora del pez cebra también está regulada por el sistema circadiano y se han identificado mutantes que presentan ritmos alterados a nivel celular, tisular y conductual (Cahill et al., 1998). Exhiben un "eje circadiano" compuesto por tres estructuras centrales interconectadas que ejecutan la función de reloj circadiano. El núcleo supraquiasmático, la glándula pineal y la retina, actúan como relojes acoplados para marcar el ritmo circadiano del organismo (Menaker et al., 1997). Existe, además, una flexibilidad en la organización y plasticidad de los ritmos que coordina del sistema circadiano en peces, ya que las conductas diurnas pueden cambiar su fase de activación dependiendo de la estación o incluso de la ontogenia (Idda et al., 2012).

La glándula pineal y la retina son osciladores circadianos endógenos que se sincronizan con el fotoperíodo, mediante la asociación con fotorreceptores que contienen melanopsina y evalúan la luminosidad ambiente. Por lo tanto, la melatonina secretada durante la fase de oscuridad, posee un ritmo circadiano dependiente de este reloj para su producción, el cual es inhibido por la presencia de luz ambiental.

La síntesis y liberación de la hormona melatonina, es un eslabón crítico en el control del ritmo circadiano, posee un papel mediador en la sincronización con el ambiente en animales sincronizados con el ciclo diario. Ya que el patrón de secreción de esta hormona coincide con la noche y señala la ocurrencia y la duración de la misma, la melatonina es capaz de transmitir las señales del ritmo endógeno a todo el organismo. Los sitios de síntesis y liberación de melatonina en peces son la glándula pineal y la retina. La melatonina retiniana tiene función paracrina, realizando adaptaciones circadianas de la propia retina, mientras que la secretada por la glándula pineal es liberada al torrente sanguíneo actuando ampliamente sobre múltiples órganos y sistemas (Ribelayga et al., 2004; Huang et al., 2005; Falcón et al., 2010; Idda et al., 2012).

En los peces teleósteos la glándula pineal y la retina son relojes circadianos endógenos, los cuales debido a su fotosensibilidad pueden modularse en fase con el ciclo diario (Falcón et al., 2010). Ésta fotosensibilidad ocurre mediante fotorreceptores presentes tanto en la glándula pineal y como en la retina, y que comparten propiedades estructurales y funcionales. El fotopigmento en cuestión es la melanopsina que estructuralmente es considerada una opsina (Migaud et al., 2006). Las estructuras sobre las cuales actúa la glándula pineal a su vez pueden ser relojes circadianos endógenos y fotosensibles subordinados (por ejemplo el núcleo supraquiasmático en los teleósteos, Falcón et al., 2010). Las vías de ejecución de la glándula pineal pueden ser endócrinas, mediadas por melatonina; y neurales, sostenidas por proyecciones de las neuronas pineales a diversas áreas centrales diencefálicas como el área preóptica del hipotálamo y el núcleo supraquiasmático (Yáñez et al., 2009).

Estos antecedentes sugieren que la luz podría ejercer efectos fisiológicos a través de dos grandes vías, por un lado la retina y por otro el complejo pineal. La primera da origen a la vía visual y ambas a un complejo sistema neuro, parácrino y endócrino que regula el control de los ciclos endógenos (Falcón et al., 2010). La hipótesis general que vertebra este estudio es que la luz ejerce dos tipos de efectos sobre la conducta electromotora de los gymnótidos. Por un lado en forma directa a través de la visión o sea ejerciendo un control sensorial de la conducta a corto plazo (Forlim, 2008), por otro en forma indirecta y a largo plazo, determinando la fase circadiana y estacional de ritmos endógenos (Silva et al., 2007; Migliaro, 2018).

2.2.2 Efectos conocidos de la luz sobre el ritmo de descarga del órgano eléctrico

Poco se conoce de la visión en *Gymnotus omarorum*. Sin embargo, su anatomía parece ser muy similar a la de otros Gymnotiformes. La retina, responsable de lo que podríamos llamar visión, proyecta sobre el téctum óptico. Éste es un núcleo sensorial mesencefálico conservado entre los peces actinopterigios, homólogo del colículo superior de los mamíferos (Northcutt, 1980). El téctum óptico recibe información de multiples modalidades sensoriales. Directamente del nervio óptico en las láminas superficiales y entrada sensorial no visual (auditiva, somatosensitiva, y en peces eléctricos electroreceptiva) en las láminas profundas (Drager y Hubel, 1976; Carr et al., 1981; Skarf y Jones, 1981; Ito y Vanegas, 1984; Bastian, 1982).

Existe una correlación entre las proyecciones retinales sobre el téctum y el hábitat, en comparación entre las especies *Eigenmannia y Apteronotus*. La primera especie posee ojos relativamente grandes y una proyección retiniana más densa y ancha en comparación con el apteronótido. Este último, habita en el fondo, posee ojos pequeños y menos protuberantes, su proyección retiniana se reduce drásticamente en el quinto caudal del téctum (Sas y Maler, 1986; Comertler and Uyanik, 2021).

En los Gymnotiformes el téctum recibe además una proyección somatotópica desde la zona electroreceptiva del torus semicircularis. El pisciculus electrosensorial está ordenado somatotópicamente en el torus y proyecta sobre el téctum de igual modo, mapa electrosomatotópico queda en registro espacial con el mapa retinotópico en el téctum. De esta forma, una columna dada en el téctum recibe información electrosensorial y visual de una porción específica del entorno del animal. A una columna neuronal del téctum ingresa entrada visual y electro-receptorial proveniente de una misma posición del espacio (Bastian, 1986; Carr et al., 1986).

La mayoría de las neuronas del téctum proyectan a más de una estructura (el nucleus electrosensorius, la formación reticular, partes del pretéctum y al torus (Rose y Heiligenberg, 1984; 1985; Heiligenberg y Rose, 1987), dentro de éstos, solamente el nucleus electrosensorius se relaciona con el control electrosensorial del ritmo de la descarga, a través de los núcleos pre-marcapasos diencefálicos y rombencefálicos. Éstos últimos proyetan directamente al núcleo marcapaso, el cual recibe además aferencias difusas provenientes de la sustancia reticulada del tronco encefálico (Kawasaki and Heiligenberg, 1989; Keller et al., 1991; Comas y Borde, 2021). Aunque no se han observado proyecciones directas del téctum sobre estos núcleos (Wong, 1997), es de destacar que el téctum es el relé más importante en la organización del comportamiento esqueletomotor través de su proyección a la formación reticular. Por lo expuesto no sería de extrañar que sinérgicamente con el control esqueletomotor se ejerzan funciones electromotoras (Comas y Borde, 2010).

Si bien la DOE está comandada por un marcapasos, éste está bajo control descendente. La modulación de la tasa de repetición de la DOE puede considerarse en varias escalas temporales.

Existe en primer lugar una variación rápida del intervalo pulso a pulso, la cual es ampliamente afectada por los movimientos del pez y los estímulos sensoriales. La modulación de la frecuencia de la DOE a corto plazo está asociada a la función electroreceptiva o electrocomunicativa (Bullock, 1969; Wesby, 1975; Barrio, et., al 1991, Falconi et al., 1995; Caputi et al 2003, Pedraja, 2016). Se utiliza para adaptar la resolución temporal del sistema al estado de actividad incluyendo movimientos exploratorios, respuestas a estímulos novedosos, respuestas de escape y la voluntad. Los cambios de velocidad y dirección durante la locomoción están asociados a las variaciones en la frecuencia de la DOE (Black-Cleworth, 1970; Jun et al., 2014; Kawasaki and Heiligenberg, 1989). La detección de un estímulo novedoso se asocia con un incremento rápido y transitorio de la frecuencia de la DOE, la duración de esta respuesta de novedad es menor 1 s (Bullock, 1969; Capurro, 1994; Aguilera y Caputi, 2003; Caputi et al., 2003). La respuesta de escape mediante la activación de la célula de Mauthner también desencadena un aumento brusco en la frecuencia de la DOE y de mayor duración que la respuesta de novedad (Falconi et al., 1995; Falconi, et al., 1997). Los incrementos transitorios en la frecuencia de la DOE se han evidenciado inmediatamente antes del inicio del movimiento, un aspecto de la conducta que ha sido correspondido como evidencia de voluntad (Jun et al., 2014). Finalmente, durante el cortejo (Kawasaki y Heiligenberg, 1989; Keller et al., 1991; Silva et al., 2007; Stoddard et al., 2007b) y la interacción competitiva (Perrone et al., 2019; Silva, 2019), la modulación extrema de la frecuencia puede asociarse a cambios de la amplitud y forma de onda de la DOE. Estos despliegues conductuales son denominados chirps y podrían considerarse símbolos utilizados por un "lenguaje" de electrocomunicación cuyo códigos aún son desconocidos (Zakon et al., 2002).

En segundo lugar variaciones más lentas ocurren durante el ciclo diario y a lo largo del año. Éstas son dependientes de factores externos como el termoperíodo (Caputi et al., 1998; Ardanaz et al., 2001), el fotoperíodo y de factores endógenos dependiente del individuo. Debe destacarse aqui que existe un bucle de realimentación entre dos tipos de procesos. Por un lado, están los derivados del ciclo anual de la tierra, en el cual existe un ciclo diario de rotación, un ciclo de orientación de su eje, todo lo cual es relevante para la latitud del hábitat de *Gymnotus omarorum* la, cual expresa un climograma determinante de los recursos disponibles en cuatro distintas estaciones climáticas.

Por el otro, están los procesos fisiológicos individuales (que también se expresan colectivamente a nivel de especie) y que están controladas por el eje neuroendócrino. La relación entre ambos procesos no es algebraica sino que, las variaciones funcionales controladas por el eje neuroendócrino son cíclicas e incluyen desde ritmos diarios en la expresión génica hasta cambios en la predisposición a desplegar distintas aspectos comportamentales.

A los efectos de esta tesis incluimos estas variaciones dentro de un concepto global que denominamos como "ritmo endógeno". Éste no se modifica inmediatamente frente a un cambio de los parámetros ambientales, a diferencia de las variaciones a corto plazo. De la combinación de ambos ciclos surgen "estaciones" biológicas entre las cuales se destacan la reproductiva y no reproductiva (Silva et al., 2007; Stoddard et al., 2007; Migliaro et al., 2018; Zubizarreta et al., 2020).

En consecuencia, en *Gymnotus omarorum* la tasa de descarga de la DOE presenta variaciones rápidas, lentas a lo largo del día, y estacionales vinculadas al ciclo reproductivo de la especie.

Ésta tesis se enfoca en los procesos rápidos de adaptación de la tasa de repetición de la DOE desencadenada por estímulos sensoriales lumínicos breves o sostenidos durante cortos plazos, los cuales no han sido estudiados en detalle, si bien existe evidencia de su existencia (Capurro et al., 1994). A éstas respuestas evocadas por la luz las referiremos como "efectos sensoriales directos". La presencia del anteriormente mencionado "ritmo endógeno" indudablemente influye sobre los "efectos sensoriales directos" por lo cual nos enfocamos en la estación reproductiva (diciembre-enero) y comparamos alteraciones puntuales relativamente breves de la iluminación con respecto al ciclo diario.

Nos orientamos al abordaje de los efectos tónicos y fásicos de la luz sobre el control de la DOE en Gymnotus *omarorum*. Estos peces expresan un sistema sensorial no presente en la especie humana. Su estudio ha permitido la construcción de una teoría sobre los procesos sensoriales y perceptuales no contaminada por la experiencia sensorial subjetiva. Disponen de sistemas neurales relativamente simples, pasibles del estudio de diversas soluciones estructurales, funcionales e informáticas que la evolución ha encontrado para los problemas generales de control neural. Poseen un sistema electromotor que es capaz de generar una descarga fácilmente accesible y cuantificable y presentan comportamientos estereotipados que permiten la evaluación de los sistemas sensoriales mediante experimentos comportamentales neurofísicos (término acuñado por Werner, 1980).

En suma: la importancia de este trabajo surge de la potencialidad de develar una incógnita aún no explorada en un modelo biológico autóctono, bien estudiado desde distintos aspectos sensoriales y motores.

Además, los avances obtenidos que incluyen: a) la caracterización lumínica de su hábitat; b) caracterización de la relación entre la tasa de DOE y dos estados comportamentales ante estímulos lumínicos estacionarios y c) la caracterización de la respuesta del sistema electromotor ante estímulos lumínicos fásicos, permiten avanzar en la comprensión de la estructura del mundo particular de estos animales (Uexküll, 1909; Tinbergen, 1972) desde el punto de vista eco-fisiológico. Otros estudios deberán complementar estos datos con observaciones realizadas en otras estaciones.

Capítulo 3. Hipótesis y objetivos

3.1 Hipótesis

Es conocido que el ciclo diario de luz al sincronizar el ritmo circadiano del pez tiene entre sus múltiples efectos sincronizar un ritmo diario de la actividad marcapasos (mencionados en el capítulo 1). Llamaremos a este ritmo, ritmo diario habitual.

La hipótesis que se busca poner a prueba en esta tesis es: "El estímulo sensorial lumínico influye en la actividad marcapasos de *Gymnotus omarorum* en forma múltiple, incluyendo "efectos directos" sensorioelectromotores dentro de los cuales existen tónicos y fásicos, además de aquellos derivados del ritmo diario. Los "efectos directos" sensorioelectromotores de la luz son parte de un comportamiento tenebrotáxico de importante valor para la construcción y/o conquista de un nicho ecológico y eventualmente temporal". De esta se desprenden los siguientes objetivos:

3.2 Objetivos

El objetivo de esta tesis es poner a prueba la hipótesis planteada. Para ello se debe demostrar que los "efectos directos" tónicos y fásicos son independientes de ritmo diario habitual en *Gymnotus omarorum*. Se diseñó como estrategia la comparación de experimentos realizados en fases opuestas del ritmo diario habitual, con el objetivo de mostrar estadísticamente que las respuestas foto-electromotoras tónicas ocurren en ambas fases del ritmo diario. Con respecto a las respuestas fásicas compararemos las mismas con las llamadas respuestas de novedad, las cuales se caracterizan además de ser graduadas con la intensidad del estímulo por su adaptación frente a estímulos repetidos a intervalos breves. Para evaluar las potenciales vinculaciones de las respuestas a la luz en un contexto comportamental, se estudiaron los cambios de iluminación en el hábitat natural y otros depliegues conductuales asociados a los cambios de la tasa de descarga del órgano eléctrico.

3.3 Los objetivos específicos abordados fueron:

a) Analizar la distribución y regularidad del intervalo inter-DOE en condiciones de iluminancia tónica. Dicho análisis se realizó comparando los histogramas de primer orden y los momentos estadísticos de la distribución de intervalos inter-DOEs en diferentes niveles de iluminación en distintas fases del ritmo diario habitual. Como se esperaba al inicio encontramos un efecto significativo de la luz sobre la media, la mediana y el coeficiente de variación una vez compensados estadísticamente los efectos del ritmo diario habitual.

b) Comparar los efectos dinámicos sobre la sucesión de intervalos inter-DOE generados por los cambios de iluminancia. Dicha comparación se realizó mediante las curvas de las características operativas del receptor (ROC) las cuales se basan en estudiar la probabilidad de verdaderos positivos (aumento de la tasa pos estímulo) en función de la probabilidad de falsos positivos (mismo aumento de la tasa en ausencia del estímulo). Se esperaba mostrar una respuesta sistemática al estímulo luminoso.

c) Comparar el curso temporal y la adaptación de las respuestas fásicas con las respuestas de novedad evocadas por otras modalidades sensoriales. Se esperaba encontrar adaptación y un cuso temporal rápido como es característico de las respuestas de novedad, sin embargo los resultados obtenidos muestras diferencias significativas en ambas características, lo cual nos sugirió pistas sobre su valor eco-etológico.

d) Evaluar el comportamiento espontáneo en ambientes en los cuales el pez puede elegir entre zonas iluminadas y en oscuridad. Este objetivo surgió a partir de los resultados obtenidos en el objetivo previo. Para ello estudiamos la afinidad de Gymnotus omarorum por zonas de distinta iluminancia, en laberintos simples. El análisis comportamental mostró que las respuestas a la luz son parte de un comportamiento más complejo que denominamos tenebrotaxia.

Capítulo 4. Métodos

4.1 Animales y ética

Los peces fueron capturados en la temporada de verano utilizando detectores de la DOE (Waddell et al., 2019) y redes de inmersión en la Laguna del Cisne (34.9848 S, -55.1146 W) Uruguay, con permiso del Ministerio de Agricultura y Pesca. Todos los experimentos se realizaron bajo el reglamento de los comités de cuidado y uso de animales del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (protocolo n.° 001/03/2011).

Ninguno de los procedimientos causó daño a los especímenes. Cada individuo fue utilizado en un único experimento y regresado al bioterio después de completar los ensayos del mismo. Durante el período de cautiverio, los peces se mantuvieron en tanques individuales en condiciones similares a las que encontramos en la naturaleza (conductividad y temperatura del agua, $70\pm10 \ \mu\text{S cm}^{-1} \ \text{y} \ 25 \ ^\circ\text{C}$, respectivamente) y se alimentaron ad libitum con anélidos (Tubifex tubifex). Los experimentos se realizaron en 30 peces (rango de longitud de 12 a 15 cm, con menos de 2 semanas en cautiverio) entre diciembre y marzo 2021-2022 (temporada de verano austral). El ciclo de luz en el acuario fue el natural, proporcionado por un ventanal.

4.2 Diseño experimental

La hipótesis evaluada en este estudio es que la luz posee un "efecto sensorial directo" sobre el comportamiento de los peces, además de los efectos ya conocidos sobre el ciclo diario habitual.

Suponiendo que la luz tiene múltiples efectos transmitidos a través de diferentes vías neuronales, exploramos por separado los efectos de la iluminancia continua y los incrementos escalonados de la intensidad de la luz que evocan respuestas tónicas y fásicotónicas, respectivamente; en dos períodos de tiempo en fases opuestas del ciclo diario habitual en individuos *Gymnotus omarorum* (Richer de Forges et al., 2009). En el caso de los incrementos escalonados de intensidad, comparamos las respuestas con las provocadas por estímulos eléctricos y mecanosensoriales para evaluar si muestran las 3 características típicas de una respuesta de novedad orientadora (inicio brusco, aumenta con el estímulo y es adaptativa).

4.3 Configuración experimental

Los experimentos se llevaron a cabo en una cámara con luz tenue (1 lux, medido en el ojo del pez) y sonido aislado. Los peces se colocaron en una jaula fusiforme que consistía en un marco de palillo de bambú y una malla de nylon.

Esta jaula fue colocada dentro de un tanque (base de 24 x 36 cm) con agua a una profundidad de 5 cm, con una conductividad de 70 microS/cm, (Waddell y Caputi, 2020). La DOE se registró con un amplificador diferencial (AM systems 3000, ganancia x1000, filtros pasa banda entre 10 Hz-10 KHz) se visualizó con un osciloscopio digital (GW-Instek, Taiwán) y su temporización se registró pasando la señal sin procesar a través de un circuito de disparo Schmitt. La salida de este circuito fue monitoreada por un microcontrolador (Microcontrolador Arduino Uno R3 ATmega328 con un rendimiento de hasta 16 millones de instrucciones por segundo a 16 MHz, Arduino LLC), que también se usó de forma asociada para registrar el tiempo de la DOE y controlar los estímulos generados por un diodo emisor de luz (LED, banda pasante de emisión de longitud de onda entre 460 y 645 nm (Figura 1).

Posteriormente se utilizó un procedimiento novedoso basado en una resistencia dependiente de luz (LDR) para medir la iluminancia (*véase en Anexo I*). Cabe destacar que este dispositivo ofrece la ventaja de ser resistente al agua; su diseño se detalla en el capítulo "Desarrollo instrumental de algunos aspectos de la configuración experimental". El dispositivo LDR de medición se calibró utilizando: a) Minolta Autometer IV F (Minolta Camera Co. Ltd. 1991, Japón) en modo de medición de iluminancia y b) Sper Scientific 840020 (Sper Scientific, Scottsdale, AZ, EE. UU.). Esto nos permitió medir la iluminancia subacuática a diferentes profundidades en varias condiciones, como en aguas abiertas, debajo de las plantas acuáticas (*Eichornia crassipes* de aproximadamente 100 m2) y bajo un punto de luz causado por la eliminación de plantas acuáticas en un área de 30 cm de diámetro. Los valores utilizados en el laboratorio se compararon con mediciones obtenidas en el campo para confirmar que dichos estímulos se encontraban dentro del rango fisiológico.



Figura 1. Configuración experimental. Esquema del montaje. El pez está representado en negro y el agua en gris (LED: diodo emisor de luz; Arduino: microprocesador, PC: computadora).

4.4 Caracterización de las respuestas tónicas a la luz

Se registraron continuamente veintidós mil marcas de tiempo de intervalos inter-DOEs en 7 peces bajo cuatro condiciones de iluminancia constante. Se evaluó un número constante de de intervalos inter-DOEs utilizando un microprocesador pre-programado (*véase en Anexo I*). Este procedimiento presenta las siguientes ventajas experimentales: a) permite un registro automático directo disminuyendo los tiempos del procesamiento, b) normaliza el número de eventos considerados en todos los experimentos, sin afectar la duración de los mismos en forma significativa, debido a que al considerarse períodos largos la pequeña variación estadística de una descarga muy regular, compensa las variaciones en la duración total (Bullock, 1969; Forlim 2013). Éstos experimentos consistieron en el registro de 22000 intervalos inter-DOEs consecutivos y duraron entre 10 y 11 minutos, esta variación en tiempo se debió a la frecuencia basal propia de cada pez. Cada registro fue precedido por un período de adaptación de una hora a la intensidad del estímulo para la condición dada (Migliaro y Silva 2016; Vázquez, 2023).

Las cuatro condiciones experimentales fueron: a) entre las 8 y las 10 a.m. se inicia el registro con el estímulo 1 lux (condición, oscuridad de día), al finalizar el registro se inicia el período de adaptación con luz prendida. Luego de finalizado éste período se registran nuevamente los peces b) estímulo 420 lx (condición, luz de día).

Al final del día entre la 8 y la 10 p.m. se vuelven a registrar los peces, c) estímulo 420 lux (condición, luz de noche), al finalizar el registro se inicia el período de adaptación con luz apagada. Luego de finalizado éste período se registran nuevamente los peces d) estímulo 1 lx (condición, oscuridad de noche).

El procedimiento práctico se realizó de la siguiente manera (Figura 2): a) los peces se mantuvieron en la oscuridad ambiente durante la noche y se registraron en condiciones de luz de 1 lux por la mañana. A continuación, se iluminó la cabina mediante una lámpara de filamento de tungsteno colocada a 77 cm por encima de la cabeza del pez durante una hora, la cual proveía una iluminancia local de 420 lux, b) se procedió al registro bajo ésa iluminancia. Este estímulo se mantuvo hasta el final del día, y c) se procedió a registrar en esa condición. Finalizado el registro, se apagó la lámpara durante una hora, d) se realizó el registro final en dicha condición de oscuridad. Se registró cada pez una vez en cada condición, los peces registrados fueron siempre los mismos durante todo el experimento.

Los registros dentro de un período de tiempo determinado (p. ej., noche) se realizaron en el mismo orden numérico de peces (individuos 7).

Protocolo para evaluar el curso temporal de las respuestas tónicas



Figura 2. *Protocolo de evaluación de las respuestas tónicas.* Las secciones en blanco y negro de la cinta superior corresponden a períodos de estimulación con luz (420 lux) y oscuridad (1lux). Las secciones grises etiquetadas como a, b, c y d en la cinta inferior corresponden a cuatro períodos de registro de 22000 DOE (aproximadamente 10 minutos) intercalados al comienzo y al fin de los períodos de distinta iluminancia. Se dejó un período de una hora antes de los registros b y d para evitar los efectos transitorios del cambio de iluminancia.

4.5 Caracterización de las respuestas fásicas

Para evaluar las respuestas fásicas, los estímulos consistieron en pulsos de luz emitidos por un LED controlado con un software casero para Arduino. La intensidad y la duración del pulso variaron según las condiciones experimentales. Todos los experimentos consistieron en 22 ensayos repetidos secuencialmente sin pausa, por lo tanto con la obtención de 22000 intervalos inter-DOES. La duración de estos 22 ensayos concatenados fueron de aproximadamente 10 minutos de duración, dependiendo de la tasa de repetición de la DOE de cada pez. El estímulo inició en un número ordinal de DOE dado (denominado DOE₀) y duró un número fijo de DOEs (este valor dependió del experimento). Realizamos 3 tipos de experimentos en los que se varió el régimen de estímulo para abordar: a) el curso temporal, b) el efecto de la intensidad del estímulo, y c) la adaptación de la respuesta. Éstos experimentos se registraron entre las 10 a. m. y las 4 p.m. Para evaluar si existen efectos importantes del ritmo diario sobre el curso temporal de la respuesta fásica, se realizó un control en 6 peces evaluados durante el día con una de las intensidades exploradas entre las 10 y las 12 p.m.

4.5.1 Curso temporal. En 26 peces, evaluamos el curso temporal del efecto transitorio de un estímulo lumínico breve sobre la secuencia de intervalos inter-DOEs. En 16 peces se estimuló con un escalón de iluminancia en el cual la intensidad de luz basal de 1 lux (intensidad de luz observada debajo de las plantas flotantes) se incrementó a 150 lux (correspondiente a la mitad de la intensidad de luz al mediodía sin plantas al final del verano) y luego de 100 intervalos se retorno al nivel basal durante 900 intervalos. Este experimento se repitió 22 veces por pez (con un ciclo de aproximadamente 30 segundos). Los intervalos fueron promediados .

En los otros 10 peces se estudió sistemáticamente el efecto de la intensidad de la luz (ver protocolo siguiente) (Figura 3).



Figura 3. *Protocolo para evaluar el curso temporal de las respuestas fásicas.* Se utilizó una serie temporal de 22 ensayos consecutivos (por simplicidad, sólo se representan dos). La flecha representa la secuencia de estímulos luminosos (blanco, 150 lux, 100 DOE) y oscuros (negro, 1 lux, 900 DOE) utilizados para explorar el curso temporal de la respuesta a los cambios en la iluminancia.

4.5.2 Efecto de la intensidad del estímulo. Utilizamos un protocolo similar pero, aplicamos varios incrementos en la intensidad de la luz. En 4 peces, realizamos un experimento piloto. Los mismos fueron estimulados con los siguientes incrementos en iluminancia: a) entre 1 y 30 lux, b) entre 1 y 150 lux (por debajo de la intensidad máxima en el agua al mediodía), y c) entre 1 y 75000 lux (muy por encima de las condiciones naturales) y viceversa. En estos peces, en cada ensayo los períodos de luz y oscuridad tuvieron aproximadamente la misma duración (1000 intervalos inter-DOEs), se realizaron 11 ensayos repetidos secuencialmente sin pausa para cada escalón lumínico (11 entre oscuridad y luz y 11 entre luz y oscuridad) para cada pez (Figura 4). Los escalones hacia abajo causaron respuestas fásicas de "apagado" solamente para el mayor escalón, muy por encima de las condiciones naturales (entre 75000 y 1 lux).





Figura 4. *Protocolo para evaluar el efecto de la intensidad sobre las respuestas fásicas.* Se utilizó una serie de 22 ensayos contiguos (por simplicidad, sólo se representan dos). La flecha representa la secuencia de estímulos luminosos de distinta intensidad (blanco, 30, 150 y 75000 lux, 500 DOEs), separados por períodos de oscuridad (negro, 1 lux, 500 DOEs) utilizado para explorar la dependencia de la intensidad del estímulo de la respuesta.

En la segunda serie de experimentos se diseñó un estudio de regresión lineal para evaluar el efecto de la intensidad del estímulo sobre la amplitud de la respuesta. En 6 peces exploramos de forma sistemática la respuesta fásica en función de la iluminancia. Se escalonó la iluminancia de la siguiente manera, de 1 lux a seis intensidades lumínicas distintas compatibles con las medidas en el campo [19, 27, 52, 84, 262 y 411 lux] (Figura 5). Total de 10 peces, sumando ambos protocolos anteriores.



Figura 5. Protocolo para evaluar la amplitud de las respuestas fásicas en función de la intensidad (recuadros blancos lux según el experimento).

4.5.3 Evaluación de la adaptación. Para evaluar la existencia o no de adaptación de las respuestas fásicas evocadas por la luz, en una primera serie de experimentos en 5 peces utilizamos pulsos pareados de luz de magnitud intermedia (150 lux) con una duración de 100 DOEs (alrededor de 3-5 s dependiendo del pez), los cuales estaban separados por períodos de oscuridad (1 lux) de distinta duración. Cada pez fue explorado con cuatro series de 44 estímulos, en cada una de ellas los pulsos pareados estaban separados por 100 y 700; 200 y 600; 300 y 500; o 400 DOEs (Figura 6).



Protocolo para evaluar la adaptación en las respuestas fásicas

Figura 6. *Protocolo para evaluar la posible adaptación de las respuestas fásicas*. Las flechas representan las cuatro series experimentales utilizadas. En cada una de ellas se evaluaron dos intervalos inter-estímulo de oscuridad de modo que, en conjunto los estímulos luminosos (blanco, 150 lux, 100 DOE), fueron separados por intervalos de oscuridad de 700 y 100, 600 y 200, 500 y 300, o 400 DOEs (1 lux) respectivamente, considerando las secuencias de arriba abajo.

En una segunda tanda de experimentos en otros 6 peces, se comparó la adaptación de la respuesta a la luz y a los cambios en la conductancia de un objeto cercano utilizando la estimulación de pulsos pareados. Fueron usados dos protocolos.

En el primer protocolo, la duración de los pulsos de luz fueron de 100 DOEs separados por un intervalo de 100 DOEs. Dado que no se obtuvo diferencias significativas utilizando pulsos de 100 DOEs de duración, realizó un segundo protocolo. En el cual el período inter-estímulo elegido fue el mínimo posible para evitar solapar el efecto provocado por el estímulo presentado, con la duración de la respuesta previa (provocada por el estímulo anterior). La duración de cada estímulo fue de 50 DOEs, separados por 50 DOEs (Figura 7).



Figura 7. *Protocolo para evaluar la adaptación de las respuestas fásicas.* Se utilizaron pulsos pareados de 50 DOEs de duración y separados por 50 DOEs, repetidos en ciclos de 1000 DOEs.

4.6 Análisis conductual de la preferencia entre luz u oscuridad

Para esta exploración utilizamos el laberinto en Y con paredes opacas; la rama que no se suele ser elegida se cubrió con un cartón grueso y el otro brazo se iluminó en cada serie de experimentos con 70, 1300 y 4745 lux utilizando una bombilla de filamento de tungsteno colocada a diferentes distancias. En 10 peces contamos el número de reversiones de la tendencia natural para cada pez en tres ensayos en cada intensidad de iluminancia, y evaluamos si la tenebrotaxia/fotofobia tiene suficiente influencia para revertir la destreza natural.

4.7 Procesamiento de datos

En todos los casos, los intervalos inter-DOE obtenidos mediante el microprocesador se mostraban en pantalla como archivo de texto (monitor serie del IDE de Arduino), luego se copiaban en un editor de texto y eran transformados en binarios para su ulterior procesamiento fuera de línea con Octave.

Para evaluar los efectos tónicos, se realizaron histogramas de intervalos de primer orden, y se calcularon y compararon sus momentos estadísticos¹.

¹ Los momentos en los cálculos estadísticos se relacionan con la determinación de parámetros como la media, la varianza o la asimetría de una distribución de probabilidad; son indicadores genéricos de una distribución.

Para evaluar los efectos transitorios, normalizamos la secuencia de intervalos inter-DOEs a la mediana de los 20 intervalos previos a la DOE₀ (intervalo basal), y se expresó el curso temporal de la secuencia de intervalos inter-DOEs como porcentaje del control.

Para evaluar la amplitud de la respuesta fásica se utilizó el índice introducido (Pereira et al., 2012; también implementado en Jun et al., 2016) para determinar la amplitud de la respuesta de novedad. La respuesta, que llamaremos I_20 consiste en calcular la secuencia de intervalos de orden vigésimo. Este tipo de filtro (ver más adelante) detecta el valor de pico que ocurre alrededor de 20 DOEs post estímulo en la serie normalizada de intervalos. Tomamos el intervalo de vigésimo orden dado que los estudios de curso temporal mostraron que la reducción del intervalo inter-DOE alcanza un mínimo de aproximadamente 20 DOEs después del inicio del estímulo.

Como era previsible, estas series tienen un mínimo agudo (sharp) cuando el intervalo se extiende desde DOE₀ a DOE₂₀, y un valor alrededor de 0 en la condición de control. Se construyeron curvas ROC para verificar la significancia estadística de la respuesta. La curva ROC resulta de graficar la fracción de ensayos que muestran verdaderos positivos frente a la fracción de ensayos que arrojan respuestas falsas positivas para los umbrales explorados. Cuando la distribución de verdaderos y falsos positivos no difieren, los gráficos ROC se ajustan a la línea bisectriz del ángulo en 0, 0 (área bajo la curva = 0,5). El grado de significancia de la diferencia entre dos respuestas se puede medir por la desviación de la curva ROC de la línea bisectriz. Para ello se definieron 250 valores equiespaciados de umbral entre -25 y 0 %, y medimos el número de intentos que cruzaron cada umbral dentro de 2 ventanas: una que incluyó los intervalos que inician en las primeras 100 DOEs después del estímulo (verdaderos positivos) y la otra que incluyó los intervalos que comienzan entre las DOE₄₀₀ a DOE₅₀₀ (es decir en el centro del periodo control, falsos positivos). Para cada curva ROC se calculó el área entre la misma y la bisectriz. Cuando ésta fue mayor a 0,25 (área total bajo la curva = 0,75), la diferencia se consideró estadísticamente significativa (Green y Swets, 1966).

Para realizar la evaluación del efecto de la intensidad se realizó un análisis de regresión lineal entre, el logaritmo de la intensidad del estímulo medido en lux y la amplitud de la respuesta calculada tal como se expresó anteriormente.

Para la evaluación de adaptación utilizamos tests no paramétricos (Matlab) entre las respuestas obtenidas entre el primer y segundo estímulo pareado.

Capítulo 5. Caracterización de la eco-fisiológica de la iluminancia del hábitat de *G. omarorum*

Utilizando nuestro sistema de registro fuimos capaces de medir la iluminancia en función de la profundidad en tres condiciones experimentales: a) en aguas abiertas, b) lugares con menor concentración de plantas (en estos lugares se aprecian puntos luminosos) y c) debajo de las plantas .

Como se observa en la Figura 8, el logaritmo de la iluminancia cae en forma lineal cuando es graficado en función de la profundidad, independientemente de la condición en la cual fue registrada, las pendientes en las 3 condiciones son similares. El valor corte en el eje de las coordenadas fue similar para las condiciones a y b pero distinto para c (Figura 8).

A partir de esta caracterización seleccionamos un conjunto valores medidos, los cuales fueron tomados como referencia para la realización de los experimentos en el laboratorio.



Figura 8. *Relación entre iluminancia (lux) y profundidad (cm)*. Este gráfico muestra la relación existente entre iluminancia que decae exponencialmente en función de la profundidad medida en la Laguna del Sauce. En 3 condiciones: a) los cuadrados azules indican las mediciones de iluminancia en aguas abiertas, b) los círculos amarillos indican las mediciones de iluminancia en puntos con luz solar, y c) triángulos verdes, indican las mediciones de iluminancia bajo las plantas. Nótese que las pendientes del gráfico en las 3 situaciones fueron: para aguas abiertas, 0.0311; para puntos solares 0.0356; y por último bajo las plantas, 0.0367.

Los símbolos restantes indican los valores de iluminancia utilizados en los experimentos en el laboratorio: cuadrados rojos (respuestas tónicas), círculos rosados (respuestas fásicas), triángulos violetas (decisiones comportamentales).

Capítulo 6. Las respuestas tónicas provocadas por estímulos de iluminancia constante

La hipótesis en evaluación para la realización de este estudio es referente al "efecto sensorial directo" que ejerce la luz sobre el comportamiento de los peces, además de los conocidos efectos que derivan de la sincronización del ritmo diario habitual. Para la evaluación de la respuesta tónica utilizamos estímulos de luz dentro del rango natural, exploramos los niveles de intensidad de iluminancia en la naturaleza.

Se evaluó la respuesta tónica a la luz en fases opuestas del ciclo diario habitual. Comparando las series de intervalos obtenidos bajo intensidades de luz similares a las observadas en aguas abiertas y debajo de plantas acuáticas, durante la mañana entre las 8 y las 10 a.m y al final del día entre las 8 y las 10 p.m en condiciones de estado estable (el valor de intensidad de cada estímulo se mantuvo constante durante una hora antes del inicio de los registros).

De la Figura 9 A a D se desprenden los resultados obtenidos para un pez sometido en las cuatro condiciones experimentales, se encontró una tendencia al cambio entre dos estados de activación (previamente descritos por Forlim y Pinto, 2014). Esto se ve reflejado en los histogramas inter-DOE con una moda principal (intervalos más largos y estado de baja frecuencia) y una moda secundaria (intervalos cortos y estado de alta frecuencia, lo cual se puede visualizar al realizar la comparación entre los histogramas de la Figura 9A a 9D en la columna a la derecha).

Las cuatro condiciones experimentales fueron: a) entre las 8 y las 10 a.m. se inicia el registro con el estímulo 1 lux (condición, oscuridad de día), al finalizar el registro se inicia el período de adaptación con luz prendida. Luego de finalizado éste período se registran nuevamente los peces b) estímulo 420 lx (condición, luz de día).

Al final del día entre la 8 y la 10 p.m. se vuelven a registrar los peces, c) estímulo 420 lux (condición, luz de noche), al finalizar el registro se inicia el período de adaptación con luz apagada. Luego de finalizado éste período se registran nuevamente los peces d) estímulo 1 lx (condición, oscuridad de noche).



Figura 9. *La iluminancia provoca dos respuestas tónicas en el intervalo inter-DOE*. En los paneles de A a D se compara el efecto tónico de 420 (fondo blanco) y 1 lux (fondo gris) durante la mañana y la noche. La comparación entre paneles muestra que la presencia de episodios de alta frecuencia (guión grueso en D) es más probable durante la noche, provocando un pico secundario en el histograma de intervalo de primer orden (flecha en D). B) La iluminancia durante la noche suprime los episodios de alta frecuencia, disminuye el intervalo inter-DOE y aumenta su moda correspondiente. C) La oscuridad durante el día facilita los episodios de alta frecuencia (guiones en el panel C) y aumenta el intervalo inter-DOE.

La prueba Anova unidireccional de Kruskal-Wallis indica que la media (p=0,0059), mediana (p=0,0088) y el coeficiente de variación (p=0,016) de la tasa repetición de la DOE no fueron los mismos durante las cuatro condiciones. Todas las distribuciones exhibieron un sesgo negativo debido a la tendencia de los peces a acelerar el marcapasos de la DOE, pero no se observaron diferencias significativas entre los valores de los sesgos (prueba de Kruskall Wallis, p = 0,22).
Sin embargo, durante la noche en condición de oscuridad fueron mayores las probabilidades de ocurrencia de los estados de alta frecuencia (EAF), y la duración promedio de los mismos (Figura 9C y D). Este cambio en el patrón del intervalo inter-DOE, se expresa como un cambio en el perfil de distribución de los intervalos inter-DOE.

Los episodios de alta frecuencia generaron un pico secundario con una moda menor que la moda correspondiente a la frecuencia basal (flecha Figura. 9D).

El análisis de varianza de dos vías (Friedman test con repetición) confirmó las observaciones realizadas anteriormente de que la tasa de repetición de la DOE en *Gymnotus omarorum* muestran dos efectos interdependientes, uno es el efecto persistente del ciclo diario habitual (Silva et al., 2007, Migliaro and Silva, 2016; Migliaro et al., 2018) y el otro el "efecto directo" de la luz. (Figura 10).

La prueba de Friedman con repetición para compensar estadísticamente los efectos de la luz y la oscuridad, mostró que los intervalos durante la noche son significativamente más pequeños que durante el día, confirmando la persistencia del efecto del ritmo diario habitual (p=3x10⁻⁴, Figura 10A). Por otra parte, si bien no se encontraron diferencias significativas en la mediana del intervalo entre luz y oscuridad, al compensar el efecto del ritmo diario diario habitual (p=0,7664), la mediana del intervalo en los registros matutinos fue significativamente menor en condiciones de luz que de oscuridad (prueba signrank p=0,0391, Figura 10A), lo que sugiere un aumento tónico de la tasa de repetición de la DOE debido a la fotoestimulación. Como veremos en los experimentos siguientes realizados para evaluar este problema en detalle, esto se debe a la elección de la media y la mediana como parámetro de estudio (ver más adelante).

De manera similar, la prueba de Friedman con repetición indicó que la luz también reduce la variabilidad del intervalo después de la compensación de los efectos del ciclo diario (p=0.038, Figura. 10B). Esto se debe principalmente a un aumento en el coeficiente de variación durante la noche y la condición de oscuridad (p=0,0156) en comparación con cada una de las otras tres condiciones, p< 0.05 luego de compensar por comparaciones múltiples por el método de Holm-Bonferroni. Durante la noche, los valores de la mediana del coeficiente de variabilidad (0,038, 0,078 para luz y oscuridad respectivamente, Figura 10B) fueron mayores que durante el día en las mismas condiciones (valores de las medianas, 0,034 y 0,05 para luz y oscuridad respectivamente, Figura 12B). Sin embargo, después de compensar los efectos de la luz y la oscuridad no hubo diferencias significativas en la variabilidad debido al persistencia del ritmo diario habitual (Test de Friedman de dos vías con repetición, p=0,278, Figura 10B).



Figura 10. *Diferencias en los histogramas de intervalos inter-DOEs.* A modo de una mejor visualización y comparación, se muestran del lado izquierdo los histogramas correspondientes (visualizados en la Figura 9).

A) Los valores de las medianas son diferentes según las cuatro condiciones (Kruskal Wallis, p=0,0088). El análisis de varianza de dos vías indica un efecto significativo del ciclo diario habitual (pruebas de Friedman con repeticiones $\chi 2=13.24$, DF=1 p=3x10⁻⁴, prueba de rango de signos post-hoc p=0.0156 y 0.0078 en condiciones de luz y oscuridad respectivamente), pero no detecta un efecto global de la luz (pruebas de Friedman con repeticiones: $\chi 2=0.09$, DF=1 p=0,7664). Sin embargo, la comparación por pares sugiere un ligero efecto de aceleración durante el día (prueba de rango de signo p=0,0391, corrección de Holm-Bonferroni). B) El coeficiente de variación es diferente según las condiciones (prueba de Kruskal Wallis, p=0,016). El análisis de varianza de dos vías indica un efecto significativo al comparar la luz y la oscuridad (Pruebas de Friedman con repetición, $\chi 2=4.32$, DF=1, p=0.038), pero ninguna diferencia significativa debido al ciclo diario habitual (Prueba de Friedman con repetición, $\chi 2=4.32$, DF=1, p=0.038), pero ninguna diferencia significativa

Sin embargo, las comparaciones por pares sugieren un aumento en la variabilidad durante la noche (p=0,0156, corrección de Holm-Bonferroni). C) Las modas principales de los histogramas son menores durante la noche (prueba de Friedman bidireccional con repetición χ 2=4,74, DF=1, p=0,0294) y en condiciones de luz (prueba de Friedman: χ 2 =7,65, DF=1, p=0,0057, n=7).

La comparación post-hoc sugiere un efecto de aceleración de la luz en el intervalo basal (prueba de rango de signos p=0,031 en ambos casos). D) Los valores máximos de las modas principales del histograma aumentan significativamente con la iluminancia debido a la supresión de los episodios de alta frecuencia (prueba de rango de signos p=0,0156). Cajas blancas: luz, cajas grises: oscuridad. Símbolo del sol: día; símbolo de la luna: noche.

Este aumento de la variabilidad en condiciones de oscuridad y noche nos indujo a examinar en detalle los histogramas de primer orden, los cuales indican que la distribución del intervalo inter-DOE es bimodal en condiciones de oscuridad para todos los peces durante la noche, y solo para dos peces durante el día. Tanto los valores de la media como la mediana son adecuados para comparar distribuciones con una única moda. Empero, nuestros resultados muestran una distribución sesgada y bimodal, por lo tanto tales parámetros de ubicación resultan de una compensación entre la probabilidad de intervalos alrededor de cada una de las dos modas y la separación de las modas. Por ello, para obtener información adicional, complementamos el análisis anterior con la comparación de cada moda de las distribuciones y los valores máximos para cada moda.

El el analisis de varianza de Frideman se basa en la comparación de ordenes de magnitud obviando los valores absolutos. Por lo tanto compensa estadísticamente una variable para poder evaluar los efectos de la otra. A compensar las iluminancias (luz y oscuridad), las modas correspondientes a los picos mayores del histograma (la moda principal, refleja el estado de frecuencia basal), son menores durante la noche (p=0.0294, Figura 10C) idependientemente si el pez recibe o no luz, reflejando una aceleración nocturna de la DOE, causada por el ritmo diario habitual. Las modas principales son más pequeñas en condiciones de luz en comparación con las condiciones en oscuridad (p=0.0057 Figura 10 C). Esto concuerda con que la luz causa un incremento en la frecuencia basal del marcapasos, por un mecanismo distinto al involucrado en el efecto del ritmo diario habitual.

El pico secundario aparece principalmente en condiciones de oscuridad (Figura 9). Esto corresponde a la aparición de episodios de alta frecuencia que aumentan en duración y probabilidad durante la noche en condición de oscuridad (en 7 peces frente a solo 2 durante el día). Este incremento nocturno del pico de la moda secundaria, se refleja en la reducción del pico correspondiente a la moda principal (Figura 12D, signrank test, p=0,0156).

Ambos efectos, el aumento en la tasa basal de repetición y el aumento en la probabilidad de episodios de alta frecuencia, se combinan para causar el aumento de la tasa de repetición de la DOE observada en *G. omarorum* durante la noche.

Podemos concluir por lo tanto que la luz causa un incremento en la frecuencia basal del marcapasos, independiente del efecto del ritmo diario habitual y que bloquea la aparición de episodios de alta frecuencia.

Capítulo 7. Las respuestas fásicas provocadas por estímulos luminosos breves

En 22 peces se estudiaron las respuestas provocadas por breves pulsos de luz. El resultado principal consistió en una reducción sucesiva de los primeros 20 intervalos inter-DOEs después del inicio del pulso de luz, seguidas de una relajación lenta con una duración de aproximadamente 60-100 DOEs. Para intensidades dentro del rango natural diurno, las respuestas de aceleración del marcapasos ocurrieron solamente al inicio del estímulo. A altas intensidades del estímulo (75000 lux, muy por encima de los estímulos naturales), la respuesta provocada por la luz se produjo tanto al inicio como al cese del estímulo. En este caso, la respuesta en el "apagado" fue más lenta y de menor amplitud (datos no mostrados). Para la caracterización del curso temporal de las respuestas registramos en 16 peces la secuencia de intervalos en ensayos consecutivos de 1000 DOEs iniciados por un breve pulso de luz (150 lux) de 100 DOEs de duración.

Los resultados obtenidos en un experimento completo en un mismo pez se representan en función del número ordinal DOEs en coordenadas polares (Figura 11A). Dado que la estimulación es repetitiva, para mostrar la consistencia de la respuesta, cada giro circular corresponde a cada uno de los 22 ensayos y la distancia desde el centro corresponde al intervalo inter-DOE. El sector claro corresponde a los periodos de "luz encendida" y el gris a los de "luz apagada". En esta gráfica se observa una consistencia del perfil de aceleración en presencia de la luz. En la Figura 11B se observa que las respuestas promediadas alcanzan su amplitud máxima aproximadamente en el intervalo 20.º después del inicio del estímulo. Si bien esto se observó en todos los peces para mejorar la claridad de la figura en los gráficos siguientes representan solamente los resultados de 7 peces superpuestos. La Figura 13C muestra los intervalos de orden 20 promediados calculados a partir de los mismos datos datos obtenidos en la Figura 13B.

Teniendo en cuenta esta observación, calculamos una serie de intervalos de orden 20 para cada ensayo (es decir, intervalos entre cada veinte DOEs entre DOE₀ y DOE₂₀; DOE₁ y DOE₂₁; DOE₂ y DOE₂₂, y así sucesivamente, con el subíndice indicando el número ordinal de la DOE, con respecto al inicio del estímulo. De esta forma se construye un filtro que maximiza la visualización de las respuestas ocurridas a 20 intervalos después del comienzo del estímulo. Por lo tanto, el estudio del curso temporal de intervalo 20.º a lo largo del experimento permite medir fácilmente en forma sistemática la amplitud de la respuesta y compararla con cambios no dependiente del estímulo.

Para verificar la significancia estadística de la respuesta se contrastó para cada pez la distribución de amplitudes de la respuesta obtenida luego del inicio del estímulo, contra la distribución de la amplitud de aceleraciones incidentales que ocurrieron en ausencia de estímulo por ejemplo, durante el período entre la DOE₄₀₁ y la DOE₅₀₀ (Figura 11C). Para realizar esta comparación se definieron valores umbrales, que fueron comparados con los valores del intervalo 20.º observados luego de el estímulo (verdaderos positivos) y en el intervalo interestímulo (falsos positivos). La fracción de trazos que superaron cada umbral después del inicio del estímulo (verdaderos positivos) se graficó contra la fracción de trazos que cruzaron el mismo umbral en ausencia del estímulo (falsos positivos), generando las curvas "características operativas del receptor" (ROC). Éstas permiten discriminar y medir el grado en que el receptor de un estímulo lo diferencia de eventos no relacionados con el estímulo. En todos los casos las curvas ROC mostraron diferencias significativas con áreas bajo la curva que oscilaron entre 0.79 y 1. (Figura 11D). En el analisis experimental se utilizó el intervalo 20 como un fiel indicador de la amplitud de la respuesta.



Figura 11. *Respuesta foto-electromotora fásica: curso temporal.* A) El experimento consistió en 22 ensayos con una duración de 1000 DOEs en los cuales se aplicó un pulso fótico (150 lux, 100 DOEs). Los datos crudos se representan en un diagrama polar. El círculo corresponde a la duración de cada ensayo, el sector claro corresponde al pulso de luz y el sector gris al período de oscuridad (1 lux). B) Respuestas fotoelectromotoras promediadas en relación al comienzo del estímulo luminoso (zona blanca en la barra) para 7 peces registrados en las mismas condiciones. C) Intervalos de orden 20 promediados calculados a partir de los mismos datos utilizados para el panel B. D) Las curvas calculadas en C permitieron calcular en forma más fiel las curvas características operativas del receptor (ROC) para los mismos 7 peces. Cada curva ROC representa la probabilidad de verdaderos positivos en función de los falsos positivos. Es decir, cada punto en la curva corresponde a un umbral, y se graficó la fracción de ensayos en los que el pico de las curvas de intervalo de orden 20.º cruza cada uno de los umbrales utilizados después del estímulo contra la fracción de ensayos en los que dicha curva cruza el mismo umbrales en ausencia de estímulo). Las áreas por debajo de las curvas mostradas son: 1; 0,975; 0,945; 0,93; 0,895; 0,83 y 0,79, superando el límite de confianza habitualmente aceptado de 0.70 (Green and Swets, 1966).

7.1 Amplitud de las respuestas en función de la intensidad del estímulo

Al evaluar la amplitud de las respuestas en función de la intensidad del estímulo en una primera serie de experimentos encontramos que la amplitud de la respuesta aumenta con la intensidad del estímulo (Figura. 12A). No obstante, una de estas intensidades supera el rango natural del hábitat de estos peces. Por esta razón se diseñó una segunda serie de experimentos en 6 peces cuyas intensidades elegidas se encuentran dentro del rango natural. Se realizó un análisis de regresión que reveló que la amplitud de la respuesta fásica aumenta con el logaritmo de la intensidad de la iluminancia (Figura 12B).



Figura 12. *Amplitud de la respuesta evocada por la luz en función de la intensidad de la iluminancia*. A) Amplitud de la respuesta comparada a través de 3 intensidades en 4 peces: 30, 150 y 75000 lux. Prueba de Friedman, χ 2=8, DF=2, p=0,0183, Kendall's W=1. B) Amplitud de la respuesta comparada a través de 6 intensidades en 6 peces distintos: 19, 27, 52, 84, 262, 411 lux. Análisis de regresión realizado en los 6 peces confirma que la amplitud es una función logarítmica de la iluminancia. Amplitud = 2,78*log10 (iluminancia) -1,7 (coeficiente de correlación de Spearman rho=0,8241).

7.2 Adaptación de las respuestas fásicas y comparación con respuestas de novedad

En una primera serie de experimentos en 5 peces se mostró que la amplitud de la respuesta fásica evocada por la luz no se alteró consistentemente cuando fueron evocadas por pares de estímulos similares (150 lux, 100 DOEs) separados por intervalos interestímulo desiguales de 100, 200, 300, 400, 500, 600 y 700 DOEs (Kruskall-Wallis, p=0,53, Figura 13A. Esto sugirió que la respuesta fásica a la luz no muestra adaptación.

A modo de verificación utilizando 6 peces, realizamos dos series experimentales adicionales en las cuales se utilizaron pulsos pareados. En la primera serie adicional se utilizó un pulso condicionante y un pulso de prueba de 150 lux durante 100 DOEs separados por 100 y 700 DOEs. El experimento se repitió 22 veces cada 1000 DOEs en cada uno de los peces. En el segundo ensavo adicional se redujo la duración de los pulsos de luz y el intervalo, emparejamos un pulso de prueba de 50 DOEs con un pulso condicionante de 50 DOEs separados por 50 DOEs (alrededor de 1.5-2 s, dependiendo del pez). Se trató de que la separación entre estímulos fuese la mínima posible. Dado que la duración de la respuesta fásica es de alrededor de 100 DOEs, el estímulo de prueba (T) se aplicó al final de la respuesta evocada por el condicionante (C). Los resultados de ambos experimentos de respuestas a estímulos pareados fueron visiblemente similares, aunque al comparar la amplitud de la mediana de las respuestas al estímulo condicionante entre los ensayos (Figura 13B) con las amplitudes de las medianas de la respuesta al estímulo de prueba (Figura 13C); la separación por 100 DOES no mostró reducción significativa de la amplitud pero la separación por 50 DOEs si mostró reducción significativa (prueba de rango de signo, p=0,0068, Figura 13 D).

Las respuestas fotoelectromotoras fásicas observadas fueron más lentas que las respuestas novedosas evocadas por estímulos electrosensoriales o mecanosensoriales activos reportados en la literatura (Barrio et al., 1991; Caputi et al., 2003).



Figura 13. *Características de la respuesta electromotora fotosensorial.* A) La respuesta electromotora fotosensorial no se vió alterada por el intervalo entre estímulos (Kruskal Wallis, p=0.53). Datos de experimentos realizados en los mismos 5 peces, ciclos de trabajo de 1000 DOEs con intervalos entre estímulos separados por 100 y 700 (círculos abiertos; prueba de rango de signos, p=0,17), 200 y 600 (círculos rellenos; prueba de rango de signos, p=0,35), 300 y 500 (cuadrados abiertos; prueba de rango de signo, p=0,46) no mostraron diferencias significativas. B y C) Se aplicó un estímulo de prueba (T) justo al final de una respuesta previa (C). D) La respuesta evocada por el estímulo de prueba (T) presentó una amplitud significativamente menor que la evocada por el estímulo condicionante (C) (prueba de rango de signo, p=0,0068. N=11).

Capítulo 8. Comportamiento de evitación de la luz, ¿fotofobia o tenebrotaxia?

8.1 Comportamiento de evitación de la luz

Una interesante observación durante estos experimentos fue que un pez pequeño de 9 cm exhibió una tendencia a girar de regreso luego del inicio del estímulo, lo que se vio claramente por la inversión de la polaridad de la forma de onda DOE durante el monitoreo a través del osciloscopio. Si bien no pudimos utilizar las grabaciones de este pez en nuestros análisis estadísticos, este comportamiento sugirió que la respuesta fásica a la luz era parte de una "respuesta esqueleto-electromotora de evitación de la luz". Esto nos llevó a investigar si los peces prefieren permanecer en el lado oscuro o en el lado iluminado de un pequeño tanque.

Para verificar la foto -vs. tenebro-taxia se realizaron dos series de experimentos comportamentales. En el primer experimento observamos 7 peces que fueron colocados en un tanque (30 cm de largo y 3 cm de ancho) con agua de acuario. Este tanque contaba con un compartimento oscuro y otro iluminado. Los peces fueron colocados en el lado iluminado o en el lado oscuro, luego se observó el comportamiento de los mismos durante 10 minutos. Cuando los peces fueron colocados inicialmente en la región iluminada, inmediatamente nadaron hacia la región oscura, y cuando se colocaron en la región oscura, permanecieron allí durante los 10 minutos de observación (prueba de signos p=0,0156, N = 7; *véase en material complementario 1, video Tenebrotaxia*).

En el segundo experimento el método utilizado fue el laberinto en Y, diseñado por por Waddell y Caputi (2021). Para evocar la electro-taxis aplicamos el mismo estímulo eléctrico en los extremos de ambas ramas del laberinto en Y (la densidad de corriente y el campo eléctrico fueron similares en cada rama) y evaluamos la elección de cada pez entre luz y oscuridad para distintas intensidades de luz.

El experimento, realizado con 10 peces consistió de un experimento control con iluminancia igual para ambas ramas y tres experimentos en los cuales la iluminancia de una de las ramas elegida al azar era de 70, 1300 y 4745 lux mientras que la otra era de 0.46 lux. El resultado se muestra en la Figura 14.

8.2 Inversión del lado de preferencia de natación por la oscuridad en función de la iluminancia

Si bien esperábamos que en la condición control el pez eligiera por casualidad entre ambas ramas el resultado mostró que 5 de los 10 peces eligen el lado derecho y los otros 5 el lado izquierdo en 3 de 3 ensayos cada uno. Esto sugiere que los peces pueden tener preferencia de natación hacia la derecha o hacia la izquierda (es decir, una forma rudimentaria de dominancia hemicerebral). Teniendo en cuenta que la "destreza" de los peces puede producir un sesgo en los resultados, se modificó el diseño experimental. Se iluminó el lado de elección favorable para cada pez y se contó el número de ensayos en los que la diferencia de iluminancia entre ambas ramas cambiaba su elección natural. Es decir se estudio la reversión de su elección natural en función de la diferencia de iluminancia entre ambas ramas. La distribución de reversiones en los tres ensayos para las tres condiciones experimentales se muestran en la Figura 14. Estos datos indican que el número promedio de reversiones en el lado de elección habitual del pez aumenta con la diferencia de iluminancia entre ambas ramas.



Figura 14. *Tenebrotaxia explorada en un experimento de elección forzada.* Se encontró que en *Gymnotus* omarorum cada individuo elige consistentemente la rama derecha o la izquierda del laberinto Y cuando la iluminancia es la misma en ambas ramas. Se aplicó iluminancia diferente en cada rama. La iluminancia en la rama oscura siempre fue de 0,43 lux, mientras que la iluminación en la otra fue de 70, 1300 y 4575 lux en cada ensayo. La prueba de rango de signos indica diferencias significativas entre el número de inversiones a 70 y 1300 lux (prueba de rango de signos p=0,0430, N=10, Holm-Bonferroni corregido) y entre el número de inversiones a 70 y 4745 lux (prueba de signos p=0.001, N=10, Holm-Bonferroni corregido).

Capítulo 9. Discusión

Este trabajo muestra que la fotoestimulación influye en el comportamiento electromotor de forma compleja. Además de su influencia previamente descrita en el ritmo diario (Migliaro and Silva, 2016; Migliaro et al., 2018), hallamos que los estímulos de luz dentro del rango fisiológico tienden a aumentar la frecuencia del marcapasos y bloquean la aparición de brotes de alta frecuencia. Los estímulos constantes y transitorios evocan respuestas tónicas y fásicas, respectivamente, los cuales pueden ser relevantes para la vida de los peces. Una probable hipótesis es la existencia de efectos complejos sobre la tasa de repetición de la DOE y su variabilidad previamente observados a lo largo del ciclo circadiano (Silva et al., 2007) se debe a que el marcapasos bulbar recibe múltiples estímulos descendentes. En una primera parte disecamos estadísticamente los efectos sensoriales exógenos de los asociados al ritmo diario habitual. Ambos están asociados en la naturaleza de forma estacional, a pesar de que tienen efectos distintos y en algunos casos opuestos.

En la segunda parte mostramos el curso temporal, la dependencia de la intensidad del estímulo, y la pobre adaptación de la respuesta. El largo curso temporal y la pobre adaptación lo distinguen de las respuestas de novedad. En la tercera parte mostramos evidencias comportamentales de fotofóbia/tenebrotáxia. Este comportamiento plausiblemente facilita la sobrevida del animal en su hábitat y por lo tanto, juega un papel importante en su nicho ecológico.

9.1 La fotoestimulación provoca la aceleración del marcapasos per se

La evaluación de esta hipótesis requirió un estudio la actividad marcapasos como un serie temporal de eventos puntuales y por otra parte dado que existe un ciclo diario donde efectos exógenos y endógenos esta intrincados se realizó un diseño experimental que permitió disecar ambos tipos de efectos a través del análisis de varianza.

Para realizar un análisis adecuado de la actividad del marcapasos en condiciones de estado estacionario, estudiamos el histograma de intervalos inter-DOE. Debido a que durante períodos de larga duración, el intervalo inter-DOE muestra una distribución sesgada (Pereira et al., 2005). Por lo tanto, el parámetro comúnmente utilizado, la tasa media, está influenciada por el grado de asimetría de la distribución. Esta distribución mostró incluso dos modas, una mayor, correspondiente al máximo absoluto del histograma (moda principal) y otra más pequeña correspondiente a un máximo local más pequeño (moda secundaria).

Interpretamos que la moda principal corresponde a la actividad tónica del marcapasos, y la asimetría del histograma corresponde a efectos transitorios impulsados por estímulos sensoriales, colaterales internos de comandos esqueleto-motores y otras señales endógenas. Entre estos últimos efectos (causales de la moda secundaria) se encuentran los períodos de episodios de alta frecuencia que se destacan intercalados entre períodos de menor frecuencia basal (Forlim, 2013; Forlim y Pinto, 2014).

Por otra parte, para evaluar los efectos sensoriales de la luz sobre la actividad del marcapasos, se consideró la existencia previamente conocida de cambios en la tasa de repetición de la DOE dependiente de ciclos diarios. Para excluir dicha influencia, se diseño un estudio en el cual la actividad marcapasos se evaluó utilizando los histogramas de intervalos y se compararon diversos parámetros estadísticos utilizando un análisis de varianza no paramétrico de dos vías donde se comparan estímulos luminosos congruentes e incongruentes en distintas fases del ciclo diario habitual.

El análisis de varianza permitió confirmar la existencia de un ritmo diario que se expresa por un aumento de la tasa media de la DOE y de su variabilidad durante la noche (Silva et al., 2007; Migliaro and Silva, 2016; Migliaro et al., 2018, compare las Figuras 9A y D) tanto para estímulos congruentes como para aquellos incongruentes, lo cual certifica la persistencia de un componente endógeno. Además, se observó que las modas secundarias y el sesgo también aumentaron durante la noche. Esto sugiere que los efectos aceleradores sobre el marcapasos debidos al ciclo diario (Perrone, 2009; Migliaro y Silva, 2016; Migliaro et al., 2018) tienen dos mecanismos: a) aumento de la actividad tónica del marcapasos, evidenciada en la reducción de las modas principales de los histogramas nocturnos con respecto a los diurnos en las mismas condiciones experimentales de luz y b) aumento en la probabilidad de episodios de alta frecuencia durante la noche (Figura 9D), contribuyendo adicionalmente al aumento de la frecuencia media y también explicando la mayor variabilidad de la tasa de repetición de la DOE.

Este análisis también mostró que la luz tiene efectos opuestos sobre los dos mecanismos que afectan la actividad marcapasos. En concordancia con la hipótesis de que la luz tiene un "efecto sensorial directo" sobre el ritmo del marcapasos, la iluminancia sostenida evoca una reducción de la tasa media del intervalo inter-DOE diurna (Figura 10A) aunque al comparar los datos nocturnos no se observa diferencia en este parámetro. Esta aparente falta de efecto de la luz sobre el marcapasos durante la noche se explica porque la luz tiene efectos opuestos sobre los dos mecanismos que afectan el intervalo medio. En efecto la luz reduce la probabilidad de episodios de alta frecuencia, lo cual se expresó en una reducción del coeficiente de variación de la tasa de repetición de la DOE independiente de la hora del día y un aumento de la amplitud del pico de la moda principal (Figura 10D). Este efecto tiende a incrementar el intervalo medio durante la noche (Figura 10B).

Por otro lado, la luz aumentó la actividad basal del marcapasos, lo cual se expresó con la reducción de la moda principal del histograma de intervalos inter-DOE comparada con la condición de oscuridad. La moda principal por lo tanto, es un mejor parámetro para expresar los efectos aceleradores de la luz sobre la actividad tónica del marcapasos (Figura 10C).

Debido a que la moda principal del histograma de intervalos inter-DOE es un buen indicador de la frecuencia basal del marcapasos en una condición dada, su disminución por iluminancia significa que esa fotoestimulación tónica provoca un aumento en las entradas excitatorias en el marcapasos. Asimismo, los estímulos luminosos con amplitud similar a las que se encuentran en aguas abiertas suprimen los episodios de alta frecuencia, tanto durante el día como durante la noche, lo que sugiere un fuerte efecto de supresión de este comportamiento. Los episodios de alta frecuencia se caracterizan por provocar la alteración de la distribución de intervalos de mono- a bimodal, resultando en el incremento en la tasa de repetición de la DOE. Sin embargo, hay una reducción de la mediana, aumento de la asimetría y por lo tanto un aumento del pico de la moda secundaria a expensas de la moda del pico principal; esto ocurre de forma destacada durante la noche (Figura 10D).

Por lo tanto, cabe decir que el "efecto tónico directo" de la fotoestimulación sobre la tasa de repetición de la DOE es doble: reduce el intervalo basal y también reduce la probabilidad de episodios de alta frecuencia.

Una segunda evidencia a favor del "efecto sensorial directo" (contraria a la acción sobre el ritmo diario habitual) es que, los pulsos de luz evocan aceleraciones transitorias del marcapasos. Éstas respuestas fásicas muestran tres características: a) son lentas en relación a las respuestas de novedad provocadas por otras modalidades sensoriales, b) su amplitud aumenta con la intensidad del estímulo y c) el efecto de una respuesta fásica sobre una posterior se presenta sólo cuando el intervalo inter-estímulo es muy corto.

Comparten con las respuestas de novedad la amplitud graduada con la intensidad del estímulo. Pero sus fases de elevación (alrededor de 20 DOEs o alrededor de 500-600 ms) fueron significativamente más lentas que las evocadas por estímulos electro-activos (2 DOEs, o alrededor de 60 ms, Aguilera y Caputi, 2003; Caputi et al., 2003) o mecanosensoriales (7-8 DOEs, o alrededor de 200 ms, Barrio et al., 1991) reportados en la literatura en condiciones experimentales similares. Este curso temporal más lento sugiere que estas aceleraciones de la DOE son diferentes de las respuestas rápidas de novedad observadas con otras modalidades sensoriales. La falta de dependencia del intervalo interestímulo y el efecto de que una respuesta fásica sobre otra posterior puede ocurrir solamente en intervalos muy cortos, sugiere un mecanismo distinto al que implementa la respuesta de novedad. G. *omarorum* exhibe otras aceleraciones transitorias del marcapasos asociadas a actividades esqueleto-motoras. Como por ejemplo, pueden señalarse en primer lugar, la activación antidrómica de las neuronas de Mauthner que desencadenan una brusca y fuerte respuesta de aceleración (aumento abrupto de la frecuencia) del marcapasos a través de la activación de múltiples vías (Falconi et al., 1995, 1997; Comas y Borde, 2010). Esta respuesta está asociada con el reflejo de escape, que son inducidos por estímulos mecanosensoriales intensos y con la función de aumentar la frecuencia de muestreo del sistema electroreceptivo activo, durante un período de movimiento rápido que involucra movimiento lineal y cambio drástico en la dirección de natación (Borde et al., 2004). En segundo lugar, la aceleración del marcapasos está asociada con movimientos en dirección anteroposterior durante la exploración electrosensorial de objetos (B-scans, Jun et al., 2016) y en tercer lugar, durante los movimientos de seguimiento de objetos (Uyanik et al., 2019; Comertler y Uyanik, 2021). Es de destacar, que en este último caso, la retroalimentación principal utilizada para el comportamiento de seguimiento de objetos son estímulos visuales (Comertler y Uyanik, 2021).

Si bien, el primer y segundo efecto son respectivamente reflejo disparado por un estímulo no necesariamente lumínico y consecuencia de la exploración electrosensorial, el último, el cual implica un posicionamiento con respecto al estímulo luminoso tiene indudablemente un origen en el estímulo visual, integrado en el téctum óptico. La similitud de este comportamiento con los observados experimentalmente sugiere que la aceleración del marcapasos está mediada por una vía similar.

Adicionalmente las diferencias observadas en el curso temporal con relación a las respuestas de novedad, la ausencia de adaptación y la frecuente asociación de aceleraciones y actividad esqueleto-motora en esta especie, sugieren que en nuestros experimentos la respuesta electromotora fásica a la luz es la primera etapa de una respuesta global de evitación de la luz, en la cual el pez acelera la tasa de repetición de la DOE con la finalidad de aumentar la frecuencia sensorial de muestreo justo antes de alejarse de la región luminosa. Consistentemente con esta afirmación, hemos mostrado que esta especie presenta un comportamiento tenebrotáxico o de evitación a la luz, observado en dos series experimentales (*véase en material complementario 1, video Tenebrotaxia*).

En resumen, postulamos que el intervalo del marcapasos está bajo dos comandos principales, uno tónico y el otro transitorio causante de los episodios de alta frecuencia u otras aceleraciones sensoriales.

La asociación de la aceleración del marcapasos con la respuesta de evitación de la luz, la ausencia de proyecciones del téctum óptico sobre los núcleos premarcapasos diencefálico y rombencefálicos y la similitud con el comportamiento de seguimiento visual; sugiere que la modulación visual del ritmo de descarga podría integrarse vía téctum óptico a través de la sustancia reticulada del tronco cerebral (Comas y Borde, 2010).

9.2 ¿Cuál podría ser el papel funcional de las aceleraciones del marcapasos evocadas por la luz?

Con relación a la interacción entre la iluminancia y el ciclo diario habitual, la comparación entre los datos obtenidos en condiciones de luz y oscuridad durante períodos en fases opuestas del ciclo diario indican que la tendencia a reducir la tasa de repetición la DOE durante el día se atenúa con la luz, con intensidad graduada dependiendo si el pez nada en aguas abiertas (Figura 15B) o descanse debajo de las plantas (Figura 15C).

Postulamos que el intervalo del marcapasos está bajo dos comandos principales, uno tónico y el otro transitorio causante de los episodios de alta frecuencia u otras aceleraciones sensoriales. El ritmo diario tiende a aumentar la frecuencia por ambos mecanismos (reduciendo la moda principal y facilitando los episodios de alta frecuencia durante la noche), sin embargo la luz tiene efectos opuestos sobre la frecuencia media de la DOE (aumentando la frecuencia basal pero bloqueando la aparición de los episodios de alta frecuencia). Al estar asociado el ritmo endógeno y el ciclo diario de la luz, durante la noche la frecuencia media del marcapasos aumenta por el único efecto del ciclo diario (reduciendo los intervalos basales y aumentando la probabilidad de episodios de alta frecuencia, Figura 15A). La presencia de episodios de alta frecuencia también explica la mayor variabilidad nocturna.

Por otro lado, durante el día, los efectos del ciclo diario son opuestos a los de la luz y por lo tanto sería esperable que fuesen atenuados por la iluminancia (Figuras 15 B y C). En condiciones experimentales de iluminancia similares a las encontradas en aguas abiertas y debajo de plantas acuáticas, sugieren que en la primera condición los peces tendrán una una tasa de descarga de la DOE regular y más rápida (Figura 15B), mientras que en la segunda condición hay un aumento en la tasa de repetición de la DOE causado por la aparición de episodios de alta frecuencia, que de alguna manera compensan el cambio de la moda principal a valores más grandes (Figura 15 C).



Figura 15. *Interacción entre iluminancia y ciclo circadiano.* Una hipótesis integradora sobre los efectos de la luz y el ciclo diario en el ritmo del marcapasos. A) Durante la noche, en ausencia de luz, el núcleo marcapasos (MP) es impulsado por dos influencias de ritmo diario: una tónica, reduciendo el intervalo basal, y otra generando los episodios de alta frecuencia (EAF). Ninguno de estos efectos se ve alterado por la fotoestimulación. B) Durante el día en aguas abiertas, los efectos de la fotoestimulación y el ritmo diario habitual en el generador de los episodios de alta frecuencia (EAF) se anulan y el núcleo del marcapasos (MP) es impulsado por la suma de los efectos tónicos de la luz y del ritmo diario. C) Durante el día, bajo las plantas, los efectos del ritmo diario sobre el generador de episodios sobre el marcapasos (flecha intermedia). Además, la luz provoca un leve efecto de aceleración tónica en el marcapasos (flecha fina), que se suma a los efectos del ritmo diario a través de los sistemas de control tónico y de los episodios de alta frecuencia. Los histogramas a la derecha muestran el peso relativo de los episodios basales y de alta frecuencia en cada circunstancia. Tenga en cuenta las diferencias de altura de los picos principal y secundario y sus modas correspondientes.

Estos peces son animales territoriales (Perrone et al., 2019) cuyo hábitat natural son islas de plantas acuáticas flotantes, compuestas principalmente por la especie *Eichornia crassipes*. Estas plantas se encuentran agrupadas mediante un complejo de raíces finas y relativamente largas, que ofician de refugio para los peces durante el día. Asimismo, las hojas anchas y la red de raíces de *E. crassipes* forman una barrera ante la luz que proporciona protección a estos peces de sus depredadores macrópticos naturales (géneros *Autralogerus y Hoplias*). La respuesta de evitación de la luz que muestra *Gymnotus omarorum* puede considerarse un subconjunto del comportamiento de seguimiento de un objeto que permite al pez seguir la sombra de plantas acuáticas flotantes, y por lo tanto les permite permanecer dentro de las congregaciones de isla de estas plantas mientras se mueven debido a las corrientes de agua y los vientos (*véase en material complementario 2, video Desplazamiento de Eichornia crassipes*). Además, la penetración de la luz entre las hojas puede generar "puntos solares" brillantes, que se mueven lentamente según la posición del sol, y pueden revelar la ubicación del pez en su refugio a los depredadores macrópticos.

Por lo tanto, consideramos que los efectos tónicos sobre la frecuencia del marcapasos descritos pueden tener un papel de suma importancia en la vida animal. Cuando los peces nadan en aguas abiertas durante el día, los estímulos de luz aceleran y regularizan el ritmo, aumentando la tasa de muestreo sensorial, lo cual facilita la evaluación de mayores riesgos de depredación después de perder la protección de las plantas flotantes. En la oscuridad, los peces muestran episodios de alta frecuencia que son más frecuentes y duran más durante la fase activa del ciclo circadiano, los mismos ocurren cuando el pez está tranquilo y también pueden estar asociados con comportamientos esqueleto-motor exploratorios.

En esta instancia se pudo haber incurrido en un error de tipo II (no rechazo de la hipótesis nula), equivalente a la probabilidad de un resultado falso negativo. Al asegurarse la suficiente potencia de la prueba, mediante un tamaño muestral suficientemente grande para detectar una diferencia cuando ésta realmente exista, se reduce el riesgo de cometer este error.

Capítulo 10. Conclusiones y perspectivas

10.1 Conclusiones

Los datos obtenidos en condiciones experimentales de luz similares a las encontradas en la naturaleza sugieren que en aguas abiertas los peces tienen un ritmo regular y más rápido de lo esperado para el efecto solamente del ciclo endógeno, mientras que bajo el resguardo de las plantas acuáticas la falta del efecto de aceleración de la luz es compensado por los aumentos transitorios en la frecuencia causados por la aparición de episodios de alta frecuencia.

Durante la noche el ritmo endógeno aumenta la tasa de repetición de la DOE mediante la reducción la moda principal de los intervalos inter-DOEs y la facilitación de los episodios de alta frecuencia, que son sinérgicos con los efectos del ciclo endógeno sobre la tasa de repetición de la DOE. Por lo tanto el efecto neto durante la noche es una aumento de la tasa media de repetición de la DOE y un aumento en la variabilidad del intervalo. La condición no natural representada por el experimento de iluminar durante la noche confirma esta presunción ya que provoca una reducción adicional del intervalo basal, reduce la variabilidad y bloquea la aparición de los episodios de alta frecuencia.

La luz parece tener efectos tónicos y fásicos en la tasa de repetición de la DOE además de los que inducen el ritmo diario (Migliaro et al., 2018). Los efectos sobre la tasa de repetición de la DOE son complejos, como ser un efecto opuesto al ritmo diario diurno, provocando un aumento de la tasa de repetición de la DOE cuando el pez está en aguas abiertas, y su ausencia durante la noche facilita un aumento de la tasa repetición de la DOE por la ausencia del efecto inhibidor en episodios de alta frecuencia. Ambos efectos, el aumento en la tasa basal de repetición y el aumento en la probabilidad de episodios de alta frecuencia, se combinan para causar la tasa más alta de la DOE observada en *G. omarorum* durante la noche.

Durante la evaluación de la respuesta tónica a la luz en fases opuestas del ciclo diario, provocadas por iluminancia constante, encontramos que al compensar estadísticamente las condiciones de luz y oscuridad, las modas principales de los histogramas inter-DOE son menores en condiciones de luz en comparación con las condiciones en oscuridad. Esto reflejaría una aceleración nocturna de la DOE, causada por el ciclo endógeno, lo que indica que la luz causa un incremento en la frecuencia basal del marcapasos, independiente del efecto del ritmo diario habitual.

Además, la luz provoca respuestas fásicas, relativamente lentas de amplitud graduada a la intensidad del estímulo, probablemente antecesoras a una conducta de evitación de la luz.

Durante el estudio de las respuestas fásicas vimos que la amplitud de la respuesta no presentó alteración constante cuando fueron evocadas por una serie de estímulos similares separados por intervalos inter-estímulos desiguales, indicando que la respuesta fásica a la luz no presenta adaptación.

Se propone este comportamiento como una respuesta global de evitación de la luz, debido a la ausencia de una proyección anatómica directa desde el téctum óptico hasta el núcleo premarcapasos. Las modulaciones de la tasa de repetición de la DOE inducidas por la luz en el núcleo del marcapasos requieren la activación de una vía de conexión que se origina en el téctum óptico. Aún no se han descrito proyecciones directas entre el téctum óptico y el premarcapasos. Por ejemplo, en *E. virescens*, el transporte anterógrado de biocitina inyectada en el núcleo premarcapasos no ha mostrado proyecciones sobre el téctum óptico (Wong, 1997). En *G. omarorum*, la inyección de biocitina cerca de las células del marcapasos resultó en dos grupos de neuronas marcadas retrógradamente a nivel del diencéfalo y el tronco encefálico (Comas y Borde, 2010). La activación de estos grupos de células por la inyección de glutamato resultó en aumentos de la frecuencia de la DOE.

El presente estudio nos sugiere el valor de la especialización sensorial. El comportamiento tenebrotáxico descrito en el contexto de la adaptación de los sentidos de electrorrecepción y somatosensorial, y la integración de éstos conjuntamente con estrategias electro-esqueleto-motoras. Permiten una eficaz adaptación de *G. omarorum* para un nicho ecológico específico. Este estudio constituye un primer abordaje en esta especie del sentido visual desde un punto de vista comportamental e integrativo. Sin embargo, esta capacidad de adaptación presenta su complejidad en la organización del sistema nervioso, de gran importancia para la comprensión del mismo. Debido a la evolución y a la diversidad que presentan los peces, éstos poseen estrategias neurales, estructurales y funcionales pasibles de estudio de diferentes áreas como, ecológicas, ambientales, biológicas e informáticas, para aproximación a soluciones estructurales, funcionales entre otras.

10.2 Perspectivas

Dentro de las perspectivas a futuro para complementar este trabajo, la continuidad de la investigación sobre el comportamiento tenebrotáxico en *Gymnotus omarorum,* posee un valor primordial para el desarrollo de su nicho ecológico.

Entendemos de primordial importancia caracterizar las bases neurales de dicho comportamiento. A estos efectos realizar un estudio anatómico funcional de la vía, mediante histología clásica (Nissl, Golgi, Cajal), así como la inyección de trazadores neuronales.

Así como la realización de la estimulación electrofisiológica y el registro de los núcleos involucrados en la respuesta de evitación a la luz y respuesta de novedad, tales como el téctum óptico y el núcleo marcapasos y lóbulo eléctrico. A modo de la realización de un abordaje integral, estas técnicas complementarias anatómicas y electrofisiológicas son importantes para una mayor aproximación al funcionamiento del sistema, desde el conexionado de redes y núcleos posiblemente involucrados en el proceso, así como su fisiología. Éstos estudios permitirán caracterizar las vías involucradas en las bases comportamentales de las respuestas fotofóbicas.

Abarcar una mayor gama de iluminancia como, estimar la longitud de onda a la que el pez es más sensible. A estos efectos utilizaríamos LEDs emisores de distintas longitudes de onda. Realizando experimentos para obtener respuestas fásicas y tónicas. Es de importancia para caracterizar el comportamiento y sensibilidad del pez a las distintas longitudes del espectro de la luz visible.

Otra estrategia experimental interesante sería valorar el efecto de la luz sobre el marcapasos en distintas épocas del año, durante un fotoperíodo con diferente intensidad lumínica. Cabe tener en cuenta para un experimento futuro que en la evaluación de efectos del ciclo diario habitual en las respuestas fásicas, los experimentos se realizaron en siete peces, entre las 10 y 12 am y se repitieron entre las 10 y 12 pm con un ciclo de trabajo de intervalo de tiempo constante (10 y 11 minutos), con estímulo de 420 y 1 lux, respectivamente. La realización de esta estrategia sería de interés dilucidar si el pez responde eléctricamente de igual manera que en el experimento realizado con LED de luz blanca. Caracterizar el comportamiento de los peces del punto vista eco-fisiológico la lo largo de las distintas estaciones.

Agradecimientos. Agradecemos al Dr. Joseph Waddell por sus comentarios críticos y la revisión de la primera versión de este manuscrito, a los Dres. Leonardo Barboni y Federico Pedraja para la programación de Arduino.

Financiamiento: Esta investigación fue financiada por ANII (FCE_1_2019_1_ 155541) y PEDECIBA. A.S.C. recibió una beca de maestría de ANII (FCE_1_2019_1_ 155541).

Referencias

- Adibi, M., Diamond, M. E. and Arabzadeh, E. (2012). Behavioral study of whiskermediated vibration sensation in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 971–976.
- Adibi, M. (2019). Whisker-mediated touch system in rodents: from neuron to behavior. *Frontiers in Systems Neuroscienc* **13**, 40.
- Aguilera, P. A., Castello, M. E. and Caputi, A. A. (2001). Electroreception in *Gymnotus carapo*: differences between self-generated and conspecific-generated signal carriers. *Journal of Experimental Biology* **204**, 185–198.
- Aguilera, P. A. and Caputi, A. A. (2003). Electroreception in *G. carapo*: detection of changes in waveform of the electrosensory signals. *Journal of Experimental Biology* 206, 989–998.
- Albrecht, U., and Eichele, G. (2003). The mammalian circadian clock. *Current opinion in genetics and development* **13**, 271-277.
- Ardanaz, J. L., Silva, A., and Macadar, O. (2001). Temperature sensitivity of the electric organ discharge waveform in *Gymnotus carapo*. *Journal of Comparative Physiology A* 187, 853-864.
- Barrio, L. C., Caputi, A., Crispino, L. and Buño, W. (1991). Electric organ discharge frequency modulation evoked by water vibration in *Gymnotus carapo*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 100, 555–562.
- Bastian, J. (1982). Vision and electroreception: Integration of sensory information in the optic téctum of the weakly electric fish *Apteronotus albifrons*. *Journal of Comparative Physiology* **147**, 287-297.
- **Bastian**, J. (1986). Gain control in the electrosensory system mediated by descending inputs to the electrosensory lateral line lobe. *Journal of Neuroscience* **6**, 553-562.
- Bennett, M. V. L. (1971). Electroreception. In *Fish physiology* **5**, 493-574. Academic Press.
- Black-Cleworth, P. (1970). The role of electrical discharges in the non-reproductive social behaviour of *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Pisces). *Animal Behaviour Monographs* 3, 1-IN1.
- Borde, M., Curti, S., Comas, V. and Rivero, C. (2004). Modulación central de un sistema sensorial por un comando motor. Una intención con dos resultados. *Rev Neurol* 38, 253–260.

- Borde, M., Quintana, L., Comas, V., and Silva, A. (2020). Hormone-mediated modulation of the electromotor CPG in pulse-type weakly electric fish. Commonalities and differences across species. *Developmental Neurobiology* **80**, 70-80.
- **Bullock, T.H.** (1969) Species differences in effect on electroreceptor input on electric organ pacemakers and other aspects of behavior in electric fish. *Brain Behavior and Evolution* **2**, 85-118.
- Bullock, T. H. (1982). Electroreception. Annual review of neuroscience 5, 121-170.

Bullock, T. H., & Hopkins, C. D. (2005). Explaining electroreception. In *Electroreception* 1-4. New York, NY: Springer New York.

Cahill, G. M., Hurd, M. W., and Batchelor, M. M. (1998). Circadian rhythmicity in the locomotor activity of larval *zebrafish*. *Neuroreport* **9**, 3445-3449.

- **Capurro, A.** (1994) Respuestas de novedad en *Gymnotus carapo*. MSc thesis, PEDECIBA, Montevideo, Uruguay.
- Capurro, A., Reyes-Parada, M., Ardanaz, J. L., Silveira, R., Macadar, O. (1994). Serotonergic control of electric organ discharge in *Gymnotus carapo*. Role of 5-HT2A/2c receptor subtypes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **109**, 583-591.
- Caputi, A., Macadar, O., and Trujillo-Cenóz, O. (1989). Waveform generation of the electric organ discharge in *Gymnotus carapo*. *Journal of Comparative Physiology A* 165, 361-370.
- Caputi, A. A., Silva, A. C., and Macadar, O. (1998). The electric organ discharge of Brachyhypopomus pinnicaudatus: The effects of environmental variables on waveform generation. *Brain, Behavior and Evolution* 52, 148-158.
- **Caputi, A. A.** (1999). Aprendiendo neurobiología con los peces eléctricos. *Actas de Fisiología* **5**, 109-157.
- Caputi, A. A., Aguilera, P. A. and Castelló, M. E. (2003). Probability and amplitude of novelty responses as a function of the change in contrast of the reafferent image in *G. carapo. Journal of Experimental Biology* **206**, 999–1010.
- **Caputi, A. A.** (2004). Contributions of electric fish to the understanding sensory processing by reafferent systems. *Journal of Physiology-Paris* **98**, 81-97.
- **Caputi, A. A.**, and Budelli, R. (2006). Peripheral electrosensory imaging by weakly electric fish. *Journal of Comparative Physiology A* **192**, 587-600.
- Caputi, Á. A., Aguilera, P. A., and Pereira, A. C. (2011). Active electric imaging: bodyobject interplay and object's "electric texture". *PloS one* **6**, e22793.

- Caputi, A. A. and Aguilera, P. A. (2019). Encoding phase spectrum for evaluating 'electric qualia.' *Journal of Experimental Biology* **222**, jeb191544.
- Caputi, A. A., Waddell, J. C., and Aguilera, P. A. (2023). A simple model of the electrosensory electromotor loop in *Gymnotus omarorum*. *Biosystems* 223, 104800.
- Carr, C. E., Maler, L., Heiligenberg, W., and Sas, E. (1981). Laminar organization of the afferent and efferent systems of the torus semicircularis of gymnotiform fish: morphological substrates for parallel processing in the electrosensory system. *Journal of comparative neurology* 203, 649-670.
- **Carr, C. E., Maler, L., and Taylor, B.** (1986). A time-comparison circuit in the electric fish midbrain. II. Functional morphology. *Journal of Neuroscience* **6**, 1372-1383.
- Clark, A. H. (1914). Nocturnal animals. *Journal of the Washington academy of sciences* **4**, 139-142.
- **Comas, V. and Borde, M.** (2010). Neural substrate of an increase in sensory sampling triggered by a motor command in a gymnotid fish. *Journal of Neurophysiology* **104**, 2147–2157.
- **Comas, V., and Borde, M.** (2021). Glutamatergic control of a pattern-generating central nucleus in a gymnotiform fish. *Journal of Neurophysiology* **125**, 2339-2355.
- Comertler, M. S. and Uyanik, I. (2021). Salience of multisensory feedback regulates behavioral variability. *Bioinspiration and Biomimetics* **17**, 016006
- Cowan, M., Azpeleta, C. and López-Olmeda, J. F. (2017). Rhythms in the endocrine system of fish: a review. *Journal of Comparative Physiology B* **187**, 1057–1089.
- de Sousa, A. A., Todorov, O. S. and Proulx, M. J. (2022). A natural history of vertebrate vision loss: Insight from mammalian vision for human visual function. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 104550.
- **Diamond, M. E. and Arabzadeh, E.** (2013). Whisker sensory system–from receptor to decision. *Progress in Neurobiology* **103**, 28–40.
- **Drager, U. C., and Hubel, D. H.** (1976). Topography of visual and somatosensory projections to mouse superior colliculus. *Journal of Neurophysiology* **39**, 91-101.
- Falcón, J., Besseau, L., Sauzet, S., and Boeuf, G. (2007). Melatonin effects on the hypothalamo–pituitary axis in fish. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 18, 81-88.
- Falcon, J., Migaud, H., Munoz-Cueto, J. A., and Carrillo, M. (2010). Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. *General and comparative endocrinology* **165**, 469-482.
- Falconi, A., Borde, M., Hernández-Cruz, A. and Morales, F. R. (1995). Mauthner cellinitiated abrupt increase of the electric organ discharge in the weakly electric fish *Gymnotus carapo. Journal of Comparative Physiology A* **176**, 679–689.

- Falconi, A., Lorenzo, D., Curti, S., Morales, F. R. and Borde, M. (1997). Mauthner cell-evoked synaptic actions on pacemaker medullary neurons of a weakly electric fish. *Journal of Comparative Physiology A* 181, 143–151.
- Forlim, C. G. (2008). Estudo experimental da eletrocomunicação em peixes de campo elétrico fraco da espécie *Gymnotus carapo*-uma aplicação da Teoria da Informação . MSc thesis Instituto de Física, Universidade de São Paulo.
- **Forlim, C. G.** (2013). Estudo da eletrocomunicação em *Gymnotus carapo* e *Gnathothonemus petersii* livres por tempos longos mediante protocolos realistas de estimulação. Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo.
- Forlim CG, Pinto RD (2014) Automatic Realistic Real Time Stimulation/Recording in Weakly Electric Fish: Long Time Behavior Characterization in Freely Swimming Fish and Stimuli Discrimination. *PLoS ONE* 9 (1): e84885. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084885
- **Golombek, D. A., and Rosenstein, R. E.** (2010). Physiology of circadian entrainment. *Physiological reviews* **90**, 1063-1102.
- **Green, D. M. and Swets, J. A.** (1966). *Signal detection theory and psychophysics*. Wiley New York.
- Griffin, D. R. (1958). More about Bat "Radar". Scientific American 199, 40-45.
- Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., and Nusslein-Volhard, C. (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the *zebrafish*, *Danio rerio*. *Development* 123, 1-36.
- Harrell, E. R., Goldin, M. A., Bathellier, B. and Shulz, D. E. (2020). An elaborate sweep-stick code in rat barrel cortex. *Science Advances* 6, eabb7189.
- Heiligenberg, W., and Rose, G. J. (1987). The optic téctum of the gymnotiform electric fish, *Eigenmannia*: labeling of physiologically identified cells. *Neuroscience* 22, 331-340.
- Holzberg, D., and Albrecht, U. (2003). The circadian clock: a manager of biochemical processes within the organism. *Journal of neuroendocrinology* **15**, 339-343.
- Huang, H., Lee, S. C., and Yang, X. L. (2005). Modulation by melatonin of glutamatergic synaptic transmission in the carp retina. *The Journal of physiology* 569, 857-871.
- Hurd, M. W., Debruyne, J., Straume, M., and Cahill, G. M. (1998). Circadian rhythms of locomotor activity in *zebrafish*. *Physiology and behavior* **65**, 465-472.
- Idda, M. L., Bertolucci, C., Vallone, D., Gothilf, Y., Sánchez-Vázquez, F. J., and Foulkes, N. S. (2012). Circadian clocks: lessons from fish. *Progress in brain research* 199, 41-57.

- Ito, H., and Vanegas, H. (1984). Visual receptive thalamopetal neurons in the optic téctum of teleosts (*Holocentridae*). *Brain Research* **290**, 201-210.
- Jun, J. J., Longtin, A. and Maler, L. (2014). Enhanced attention precedes self-initiated locomotion in an electric fish. *BMC Neuroscience* **15**, 1–2.
- Jun, J. J., Longtin, A. and Maler, L. (2016). Active sensing associated with spatial learning reveals memory-based attention in an electric fish. *Journal of Neurophysiology* **115**, 2577–2592.
- **Kawasaki, M., and Heiligenberg, W.** (1989). Distinct mechanisms of modulation in a neuronal oscillator generate different social signals in the electric fish *Hypopomus*. *Journal of Comparative Physiology A* **165**, 731-741.
- Keller, C. H., Kawasaki, M., and Heiligenberg, W. (1991). The control of pacemaker modulations for social communication in the weakly electric fish Sternopygus. *Journal of Comparative Physiology A* 169, 441-450.
- Ko, C. H., and Takahashi, J. S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human molecular genetics* 15, R271-R277.
- **Kramer, B.** (2020). Communication and Waveform Analysis in Weakly Electric Fishes With Special Emphasis on Mormyrids. <u>https://epub.uni-regensburg.de</u>
- **Lissmann, H. W.** (1951). Continuous Electrical Signals from the Tail of a Fish, Gymnarchus niloticus Cuv. *Nature* **167**, 201-202.
- Lissmann, H. W., and Machin, K. E. (1958). The mechanism of object location in *Gymnarchus niloticus* and similar fish. *Journal of Experimental Biology* **35**, 451-486.
- Macadar, O., Lorenzo, D., and Velluti, J. C. (1989). Waveform generation of the electric organ discharge in *Gymnotus carapo*. *Journal of Comparative Physiology A* 165, 353-360.
- Markham, M. R. (2013). Electrocyte physiology: 50 years later. *Journal of Experimental biology* **216**, 2451-2458.
- Maximino, C., Marques, T., Dias, F., Cortes, F. V., Taccolini, I. B., Pereira, P. M.,
- Menaker, M., Moreira, L. F., and Tosini, G. (1997). Evolution of circadian organization in vertebrates. *Brazilian journal of medical and biological research* **30**, 305-313.
- Migaud, H., Taylor, J. F., Taranger, G. L., Davie, A., Cerdá-Reverter, J. M., Carrillo,
 M., ...and Bromage, N. R. (2006). A comparative ex vivo and in vivo study of day and night perception in teleosts species using the melatonin rhythm. *Journal of pineal research* 41, 42-52.
- Migliaro, A., Moreno, V., Marchal, P. and Silva, A. (2018). Daily changes in the electric behavior of weakly electric fish naturally persist in constant darkness and are socially synchronized. *Biology Open* **7**, bio036319.

- **Migliaro A, Silva AC** (2016) Melatonin regulates daily variations in electric behavior arousal in two species of weakly electric fish with different social structures. *Brain, behavior and evolution* **87**, 232-241
- Migliaro González, A. (2018). Modulación ambiental y hormonal del ritmo circadiano de la conducta eléctrica. Tesis de doctorado PEDECIBA. Área Biología https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/21474/1/uy24-19275.pdf
- **Moller, P.** (1995). *Electric fishes: history and behavior*. Fish and fisheries Chapman and Hall. Springer. London.
- Northcutt, R. G., and Braford, M. R. (1980). New observations on the organization and evolution of the telencephalon of actinopterygian fishes. In *Comparative neurology of the telencephalon* 41-98. Springer, Boston, MA.
- Pedraja, F., Perrone, R., Silva, A., and Budelli, R. (2016). Passive and active electroreception during agonistic encounters in the weakly electric fish *Gymnotus omarorum*. *Bioinspiration and Biomimetics* **11**, 065002.
- Pereira, A. C., Centurión, V., and Caputi, A. A. (2005). Contextual effects of small environments on the electric images of objects and their brain evoked responses in weakly electric fish. *Journal of experimental biology* 208, 961-972.
- Pereira, A. C. and Caputi, A. A. (2010). Imaging in electrosensory systems. Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences 2, 291–307.
- Pereira, A. C., Aguilera, P. and Caputi, A. A. (2012). The active electrosensory range of *Gymnotus omarorum*. *Journal of Experimental Biology* **215**, 3266–3280.
- **Perez, J., Tolla, E., Dunn, I., Meddle, S., and Stevenson, T. J.** (2019, April). Extraretinal regulation of avian reproduction: a role for VA-opsin and neuropsin. In *British Neuroscience Association Festival of Neuroscience 2019*.
- Perrone, R., Macadar, O., and Silva, A. (2009). Social electric signals in freely moving dyads of *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. *Journal of Comparative Physiology* A 195, 501-514.
- Perrone, R., Pedraja, F., Valiño, G., Tassino, B., and Silva, A. (2019). Non-breeding territoriality and the effect of territory size on aggression in the weakly electric fish, *Gymnotus omarorum. acta ethologica* 22, 79-89.
- **Post, N., and von der Emde, G.** (1999). The "novelty response" in an electric fish: response properties and habituation. *Physiology and behavior* **68**, 115-128.
- **Ribelayga, C., Wang, Y., and Mangel, S. C.** (2004). A circadian clock in the fish retina regulates dopamine release via activation of melatonin receptors. *The Journal of physiology* **554**, 467-482.

- Richer-de-Forges, M. M., Crampton, W. G. and Albert, J. S. (2009). A new species of *Gymnotus* (Gymnotiformes, Gymnotidae) from Uruguay: description of a model species in neurophysiological research. *Copeia* **2009**, 538–544.
- Rodríguez-Cattaneo, A., Aguilera, P. A. and Caputi, A. A. (2017). Waveform sensitivity of electroreceptors in the pulse-type weakly electric fish *Gymnotus omarorum*. *Journal of Experimental Biology* **220**, 1663–1673.
- Roenneberg, T. and Foster, R. G. (1997). Twilight times: light and the circadian system. *Photochemistry and Photobiology* **66**, 549–561.
- Rose, G., and Heiligenberg, W. (1984). Neural correlates of the Jamming Avoidance Response: Df-sign-specific neurons in the optic téctum of the electric fish *Eigenmannia*. In Soc. Neurosci. Abstr. 10, 403.
- **Rose, G., and Heiligenberg, W.** (1985). Structure and function of electrosensory neurons in the torus semicircularis of *Eigenmannia*: morphological correlates of phase and amplitude sensitivity. *Journal of Neuroscience* **5**, 2269-2280.
- **Rowan, W.** (1925). Relation of light to bird migration and developmental changes. *Nature* **115**, 494–495.
- Sas, E., and Maler, L. (1986). The optic téctum of gymnotiform teleosts *Eigenmannia virescens* and *Apteronotus leptorhynchus*: a Golgi study. *Neuroscience* **18**, 215-246.
- Schumacher, S., Burt de Perera, T. and von der Emde, G. (2017a). Electrosensory capture during multisensory discrimination of nearby objects in the weakly electric fish *Gnathonemus petersii*. *Scientific Reports* **7**, 1–11.
- Schumacher, S., von der Emde, G. and de Perera, T. B. (2017b). Sensory influence on navigation in the weakly electric fish *Gnathonemus petersii*. *Animal Behaviour* 132, 1–12.
- Schuster, S. and Amtsfeld, S. (2002). Template-matching describes visual patternrecognition tasks in the weakly electric fish *Gnathonemus petersii*. *Journal of Experimental Biology* **205**, 549–557.
- Silva, A., Perrone, R. and Macadar, O. (2007). Environmental, seasonal, and social modulations of basal activity in a weakly electric fish. *Physiology and Behavior* 90, 525–536.
- **Skarf, B., and Jones, G. M.** (1981). Vestibular–visual interactions in frog mesencephalon during natural stimulation. *Brain Research*.
- **Spallanzani, M.** (1798). V. Observations on the organs of vision in bats. *The Philosophical Magazine* **1**, 134–136.
- Stoddard, P. K., Markham, M. R., Salazar, V. L. and Allee, S. (2007a). Circadian rhythms in electric waveform structure and rate in the electric fish *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. *Physiology and Behavior* **90**, 11–20.

- Stoddard, P. K., Markham, M. R., Salazar, V. L. and Allee, S. (2007b). Circadian rhythms in electric waveform structure and rate in the electric fish *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. *Physiology and Behavior* **90**, 11–20.
- Suga, N. O. B. U. O., Kawasaki, M., and Burkard, R. F. (1990). Delay-tuned neurons in auditory cortex of mustached bat are not suited for processing directional information. *Journal of Neurophysiology* **64**, 225-235.
- **Tinbergen, N**. (1972). *The animal in its world: Explorations of an ethologist 1932-*1972 (Vol. 84). Harvard University Press.
- Théry, M., Pincebourde, S. and Feer, F. (2008). Dusk light environment optimizes visual perception of conspecifics in a crepuscular horned beetle. *Behavioral Ecology* 19, 627–634.
- Trujillo-Cenóz, O., Echagüe, J. A., and Macadar, O. (1984). Innervation pattern and electric organ discharge waveform in *Gymnotus carapo* (Teleostei; Gymnotiformes). *Journal of neurobiology* **15**, 273-281.
- Trujillo-Cenóz, O., and Echagüe, J. A. (1989). Waveform generation of the electric organ discharge in *Gymnotus carapo. Journal of Comparative Physiology A* **165**, 343-351.
- Uexküll, J. V. (1926). Theoretical biology.
- **Unstead, J. F.** (1912). The climatic limits of wheat cultivation, with special reference to North America. *The Geographical Journal* **39**, 347-366.
- Uyanik, I., Stamper, S. A., Cowan, N. J. and Fortune, E. S. (2019). Sensory cues modulate smooth pursuit and active sensing movements. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **13**, 59.
- **Vazquez, J. I., Gascue, V., Quintana, L., and Migliaro, A.** (2023). Understanding daily rhythms in weakly electric fish: the role of melatonin on the electric behavior of *Brachyhypopomus gauderio. Journal of Comparative Physiology A*, 1-12.
- Waddell, J. C., Njeru, S. M., Akhiyat, Y. M., Schachner, B. I., Correa-Roldán, E. V. and Crampton, W. G. R. (2019). Reproductive life-history strategies in a speciesrich assemblage of Amazonian electric fishes. *PLoS One* 14, e0226095.
- Waddell, J. C. and Caputi, A. A. (2020a). Waveform discrimination in a pair of pulsegenerating electric fishes. *Journal of Fish Biology* **96**, 1065–1071.
- Waddell, J. C. and Caputi, A. A. (2020b). Electrocommunication in pulse Gymnotiformes: the role of electric organ discharge (EOD) time course in species identification. *J. Experimental Biology* 223 (Pt 16):jeb226340. doi: 10.1242/jeb.226340.

- Waddell, J. C. and Crampton, W. G. (2020). Environmental correlates of circannual breeding periodicity in a multi-species assemblage of Amazonian electric fishes. *Environmental Biology of Fishes* **103**, 233–250.
- Waddell, J. C. and Caputi, A. A. (2021). The captivating effect of electric organ discharges: species, sex and orientation are embedded in every single received image. *Journal of Experimental Biology* 224, jeb243008.
- Webb, A. R. and Holick, M. F. (1988). The role of sunlight in the cutaneous production of vitamin D3. *Annual Review of Nutrition* **8**, 375–399.
- Werner, J. K. (1980). Neuroscience, a clinical perspective. (No Title).
- Westby, G. W. (1975). Has the latency dependent response of *Gymnotus carapo* to discharge-triggered stimuli a bearing on electric fish communication? *Journal of comparative physiology* **96**, 307-341.
- Whitmore, D., Foulkes, N. S., and Sassone-Corsi, P. (2000). Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature* **404**, 87-91.
- Wong, C. J. (1997). Connections of the basal forebrain of the weakly electric fish, *Eigenmannia virescens. Journal of Comparative Neurology* **389**, 49-64.
- Yáñez, J., Busch, J., Anadón, R., and Meissl, H. (2009). Pineal projections in the zebrafish (*Danio rerio*): overlap with retinal and cerebellar projections. *Neuroscience* **164**, 1712-1720.
- Zakon, H., Oestreich, J., Tallarovic, S., and Triefenbach, F. (2002). EOD modulations of brown ghost electric fish: JARs, chirps, rises, and dips. *Journal of Physiology-Paris* **96**, 451-458.
- Zanuy, M. V., and Carranza, F. H. (2007). Metabolismo, fuentes endógenas y exógenas de vitamina D. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas* 16, 63-70.
- Zubizarreta, L., Quintana, L., Hernández, D., Teixeira de Mello, F., Meerhoff, M., Massaaki Honji, R., ... and Silva, A. (2020). Seasonal and social factors associated with spacing in a wild territorial electric fish. *PloS one* **15**, e0228976.
- Zweifel, N. O. and Hartmann, M. J. (2020). Defining "active sensing" through an analysis of sensing energetics: homeoactive and alloactive sensing. *Journal of Neurophysiology* **124**, 40–48.

ANEXO I

Desarrollos Metodológicos Originales

Los efectos sensoriales de la luz en estos peces son de relevante importancia, ya que proporcionan información sobre el entorno cercano. Además, en la sincronización a través de la luz del ciclo circadiano por el cual los peces expresan los efectos del ritmo diario en la variación de la DOE; genera la posibilidad de cuantificar los efectos lumínicos sensorioelectromotores y los derivados del ritmo diario. Sin embargo, estos efectos han sido poco estudiados, debido a la necesidad de dispositivos portátiles y pequeños utilizables tanto en el hábitat o en el laboratorio.

Entre estas dificultades se destacan en primer lugar el costo y el tamaño de las sondas comerciales para medir la iluminancia subacuática, en general no adaptadas a medir la iluminancia en ambientes pequeños bajo el agua como dispositivo experimental. Por esta razón se desarrolló un sistema de medidas pequeño, robusto, de bajo costo y puede implementarse fácilmente utilizando pequeños microprocesadores.

Por otra parte, aunque la medición del intervalo inter-DOE es relativamente fácil, se desarrolló un sistema de medición automática de esta variable que permite registrar directamente los intervalos y controlar la estimulación lumínica en forma automática.

A.1 Medición de la iluminancia

El medidor de iluminancia que se desarrolló se basa en una resistencia cuyo valor es función de la luz que incide en su superficie, (LDR, CdS GL5516). Esta unidad consta de un disco de 4,3 mm de diámetro por 2,1 mm de espesor en el que se encuentran dos electrodos separados por un espacio sinuoso en el que se deposita una capa semiconductora activa de CdS. Este núcleo está incluido en un sustrato transparente aislante.

La sensibilidad a la longitud de onda del LDR tiene una curva en forma de campana, con un pico en la banda verde del espectro (550 nm) y cayendo entre el 10 % del valor pico por debajo de 350 y por encima de 750 nm (Fig. 1A, https://www.alldatasheet.com). La respuesta de esta célula al paso de la intensidad de la luz consiste en una curva asintótica en estado estacionario. La misma presenta histéresis debido a un tiempo de respuesta relativamente lento y asimétrico. Dicho tiempo de respuesta típico de un LDR está algo por debajo de un segundo, lo cual limita el uso de LDR en aplicaciones donde la señal de luz varía rápidamente.

Contrariamente, las mediciones de estado estable luego de varios segundos permiten estimar razonablemente la intensidad general de los estímulos de luz en el rango espectral naranja turquesa. Desafortunadamente, LDR también muestran plasticidad reversible. Existe una "dependencia de la historia lumínica" que implica que el LDR debe almacenarse siempre en el mismo rango de intensidad lumínica. Si se almacenan durante varios días bajo luz brillante, los LDR tienen una resistencia a la luz considerablemente mayor que si se almacenan en la oscuridad. Sin embargo, este efecto se puede minimizar significativamente manteniendo el LDR expuesto a un nivel de iluminancia similar al rango de uso estándar. Al cumplirse este requisito, la resistencia del LDR medida 10 segundos después de estimularla con una luz constante es inversamente dependiente de la iluminancia de la superficie expuesta del semiconductor. La pendiente (llamado factor γ) de la curva del logaritmo de la resistencia en función del logaritmo de la intensidad es una característica del sistema y debe calcularse in situ después de ensamblar completamente el dispositivo y luego de un almacenamiento diario del dispositivo a la iluminancia en la cual fue calibrado.

A.2 Construcción de los medidores de luz

Para la construcción del medidor de luz se procedió a soldar un par de cables de conexión en los extremos del fotoresistor. Esto se realizó a varios cm del disco para evitar el calentamiento. Luego se doblaron los conductores lateralmente cercanos del disco y se fijaron los cables y el disco (con la zona sensible hacia arriba), a la superficie de una plataforma de vidrio de 100 x 150 x 2 mm, cubriendo completamente los cables expuestos y la superficie soldada con resina epoxi no conductora ("Poxipol"). Para medir la resistencia los cables provenientes del LDR se conectaron a un multímetro (Fluke 77 Multimeter.) con un rango de medición de alta resistencia (desde 0,1 Ω hasta 30 M Ω) (Figura A1). Durante los experimentos, esta plataforma se colocó debajo de una jaula de malla que restringía la posición de los peces, la superficie del LDR colocado en el fondo del tanque se encontraba aproximadamente a la misma altura que el ojo de un pez de 10-15 cm de longitud total.

Para medir la iluminancia a distintas profundidades en los experimentos de campo se construyó un aparejo de hilo que permitió simultáneamente mantener la superficie horizontal y medir la profundidad desde el nivel del agua (Figuras A1 y A2).



Figura A1. *Esquema del montaje experimental de la elaboración del medidor de luz LDR.* En la parte superior de la figura el rectángulo representa la plataforma de vidrio sobre la que fue adherido el dispositivo LDR (representado por el disco gris con el símbolo de LDR en su interior). El dispositivo LDR fue conectado mediante cables, desde sus extremos a las entradas de un multímetro (Fluke 77 Multimeter), representado en la parte inferior de la figura. A modo de ejemplo: el valor de la medición (1200 M Ω), se ingresa a un programa diseñado en Octave que transforma el valor en Ohmios a valor de iluminancia (0.43 lux).

A.3 Calibración de medidores de luz

La resistencia medida por LDR se comparó con la lectura realizada de un fotómetro Minolta Autometer IV F (Minolta Camera Co. Ltd. 1991, Japan) a una temperatura entre 23+-2 °C. Se realizaron cien pares de medidas aleatorias contemplando las siguientes condiciones, desde una habitación oscura durante la noche (10 M Ω - 0.43 lux) hasta la luz solar al mediodía (50 Ω - 28845 lux). Se utilizaron diferentes fuentes luminosas, tales como: luz solar , lámpara de filamento de tungsteno, LEDs utilizados como estímulo luminoso para los peces, y otras fuentes luminosas que incluían luces fluorescentes y solares no directas (Figura A3).



Figura A3. *Calibración de la resistencia dependiente de la luz utilizando dos luxómetros comerciales.* La abscisa corresponde a los valores de iluminancia medidos (en lux) utilizando los luxómetros comerciales indicados por los diferentes símbolos (Minolta y Sper scientific). Las ordenadas corresponden a la resistencia medida por el dispositivo LDR (en Ohmios a 24°C). El ajuste de la curva indica que la iluminacia medida se puede calcular como Lux=10(a*(log10R)2+b*log10R + c), donde a=0,1173, b=-2,0127 y c=7,541 y R es la resistencia en ohmios.

A.4 Evaluación de la cadencia de disparo de la DOE y control de estímulos sensoriales

Se registró la DOE utilizando un par de cables de cobre colocados en los extremos de la jaula que restringe el movimiento del animal, estos a su vez fueron conectados a un amplificador diferencial de ganancia ajustable conectado en serie con un circuito disparador Schmitt. El pulso de salida (+5 V, 1 ms) se introdujo en el puerto de un microcontrolador (Arduino Uno R3 ATmega328 con hasta 16 millones de instrucciones por segundo de rendimiento a 16 MHz, Arduino LLC). La ganancia ajustable permite al experimentador manipular la amplitud de la DOE en relación con el umbral de activación de Schmitt para optimizar la discriminación de pulso. El intervalo entre pulsos se evaluó configurando un temporizador interno que realizaba un seguimiento del tiempo transcurrido desde el pulso previo. Este temporizador está configurado para generar una interrupción funcionando como un reloj interno con una resolución de 0,1 ms.

La evaluación del tiempo se realizó contando las interrupciones de dicho temporizador entre los flancos (bordes) ascendentes de los pulsos de entrada sucesivos y luego se escaló en el tiempo y se imprimió en la pantalla de una computadora. Si bien se pudiera implementar una transformación automática, en nuestro caso para mejor control del experimento y su registro sistemático, al final de cada experimento la imagen de la pantalla fue copiada y pegada en un archivo de datos que podía ser levantado y procesado inmediatamente después del registro utilizando Octave o programas similares. El mismo microcontrolador se programó para determinar el tiempo y la duración de los pulsos de luz emitidos. Consequentemente se activó un diodo emisor de "luz blanca" (LED, banda de emisión de longitud de onda limitada entre 460 y 645 nm) en serie con una resistencia de 285 Ω .

A partir de los datos obtenidos en esta tesis se ha publicado el siguiente artículo.
RESEARCH ARTICLE



The sensory effects of light on the electric organ discharge rate of *Gymnotus omarorum*

Ana S. Camargo, Angel A. Caputi and Pedro A. Aguilera*

ABSTRACT

Gymnotiformes are nocturnal fishes inhabiting the root mats of floating plants. They use their electric organ discharge (EOD) to explore the environment and to communicate. Here, we show and describe tonic and phasic sensory-electromotor responses to light distinct from indirect effects depending on the light-induced endogenous circadian rhythm. In the dark, principally during the night, inter-EOD interval histograms are bimodal: the main peak corresponds to the basal rate and a secondary peak corresponds to high-frequency bouts. Light causes a twofold tonic but opposing effect on the EOD histogram: (i) decreasing the main mode and (ii) blocking the high-frequency bouts and consequently increasing the main peak at the expense of removal of the secondary one. Additionally, light evokes phasic responses whose amplitude increases with intensity but whose slow time course and poor adaptation differentiate from the so-called novelty responses evoked by abrupt changes in sensory stimuli of other modalities. We confirmed that Gymnotus omarorum tends to escape from light, suggesting that these phasic responses are probably part of a global 'light-avoidance response'. We interpret the data within an ecological context. Fish rest under the shade of aquatic plants during the day and light spots due to the sun's relative movement alert the fish to hide in shady zones to avoid macroptic predators and facilitate tracking the movement of floating plant islands by wind and/or water currents.

KEY WORDS: Circadian cycle, High-frequency bouts, Tenebrotaxis

INTRODUCTION

Light is a major determinant of life. It affects various aspects of animal behavior, including the control of body composition (Tucker et al., 1984; Teschke et al., 2008) and structure (Webb and Holick, 1988), circadian (Roenneberg and Foster, 1997) and seasonal (Chen et al., 2020) rhythms of growth (Cowan et al., 2017) and activity (Godsil and Fanselow, 2004), and also serves as a carrier of sensory signals (Lythgoe, 1988) used for migration (Rowan, 1925), communication between con-specifics (Théry et al., 2008) and visual evaluation of the nearby environment.

Some animals prefer to remain in the dark and others in the light (De Sousa et al., 2022). Among those showing a preference for the dark, i.e. 'tenebrotaxis', various species have evolved peculiar senses to cope with dark environments. Most of these senses rely on

*Author for correspondence (peaabar@gmail.com)

A.S.C., 0000-0002-4508-5031; A.A.C., 0000-0002-7238-0538; P.A.A., 0000-0002-6610-4895

Received 13 January 2023; Accepted 21 June 2023

the self-generation of the carrier of sensory signals (i.e. homeoactive sensing; Zweifel and Hartmann, 2020), e.g. the whisker system in nocturnal Rodentia (Adibi et al., 2012; Diamond and Arabzadeh, 2013; Adibi, 2019; Harrell et al., 2020), the echolocation system of Chiroptera (Spallanzani, 1798; Griffin, 1958) and the electric sense of Gymnotiformes and Mormyridae (Bullock and Heiligenberg, 1986; Moller, 1995; Bullock et al., 2005), although there are examples of both good diurnal vision with allo-active hearing, as found in Strigiformes (Knudsen and Konishi, 1979; Carr and Konishi, 1990; Peña and DeBello, 2010), and diurnal vision with homeo-active electroreception (Schuster and Amtsfeld, 2002; Schumacher et al., 2017a,b).

Vision is well developed in Mormyroidea. These fish live in clear waters and, moreover, have photonic crystal light collectors that improve vision in turbid waters (Kreysing et al., 2012). Behavioral studies show that vision and active electroreception have similar importance in determining behavior (Rojas and Moller, 2002; Schuster and Amtsfeld, 2002; Schumacher et al., 2017a,b). Moreover, Mormyroidea are able to cognitively integrate both modalities and construct abstract representations (Schumacher et al., 2017a,b).

However, Gymnotiformes are nocturnal fish living in muddy waters under floating water plants that reduce the available amount of light during the day. Moreover, while the preference for living in darkness (i.e. tenebrotaxis) in *Gymnotus omarorum* (O. Macadar, personal communication) and the congeneric species *Gymnotus carapo* was behaviorally reported (Maximino et al., 2007), the sensory effects of light on *G. omarorum* behavior have scarcely been studied (Capurro et al., 1994), with the exception of those induced by the endogenous circadian cycle (Stoddard et al., 2007; Migliaro González, 2018; Silva et al., 2007; Migliaro and Silva, 2016; Migliaro et al., 2018; Gascue et al., 2019). Here, we focused on the less explored light-induced sensory-electromotor behaviors.

Gymnotiformes is an order of Actinopterygii that utilizes the electrosensory system to live among the root mass of floating macrophytes characteristic of muddy lakes and flood plains of South America (Waddell et al., 2019; Waddell and Crampton, 2020). A self-emitted electric field generated by an electric organ discharge (EOD) serves as a carrier for a haptic omnidirectional sensory system in which the objects polarized by the field behave as virtual electric sources in the same way that objects reflecting light function as light sources (e.g. the moon illuminated by the sun acts as a light source; Pereira and Caputi, 2010; Caputi et al., 2003). Floating plants provide a dark environment, which limits vision, and the mesh of thin roots attenuate lateral line signals but do not affect self-generated electric fields, which allows electric fish to take advantage of this niche in order to avoid macroptic predators and prey on small invertebrates. The EOD additionally serves as a cryptic communication channel (Aguilera et al., 2001) for identifying the sex and species of a nearby electric fish (Waddell and Caputi, 2020a,b, 2021).

Unidad de Neurociencias Integrativas y Computacionales, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, MEC, Av.Italia 3318, CP 11600, Montevideo, Uruguay.

In G. omarorum, the EOD constitutes a series of stereotyped brief pulses emitted approximately every 30 ms with a small coefficient of variation (about 0.01–0.02; Capurro et al., 1994). The constancy of the waveform (which is equivalent to the color of the illuminating light for the visual system) allows the fish to evaluate the impedance of the object relative to water (Aguilera and Caputi, 2003; Rodríguez-Cattáneo et al., 2017; Caputi and Aguilera, 2019). The repetition rate of the EOD is used for adapting the temporal resolution of the system to the activity state. Novel electrosensory (Caputi et al., 2003; Aguilera and Caputi, 2003) and mechanosensory stimuli (Barrio et al., 1991) evoke 'novelty responses' consisting of an abrupt decrease of a few intervals after stimulus onset, followed by a slow relaxation. As the sensory reafference is processed frame to frame (i.e. EOD to EOD), this responses may be used by the fish for increasing the sampling rate and therefore the time resolution. More sustained increases in EOD rate are triggered by skeletomotor activity (Falconi et al., 1995; 1997) and cognitive states (Jun et al., 2014; 2016; Fotowat et al., 2019). Therefore, the EOD rate in *Gymnotus* is a faithful measure of activity level and attention (Jun et al., 2014, 2016). In addition, it exhibits seasonal and daily rhythms with increases in mean EOD rate associated with periods of greater activity (Silva et al., 2007; Migliaro and Silva, 2016; Migliaro et al., 2018; Gascue et al., 2019). Light has been shown to induce changes in the EOD rate in pulse Gymnotiformes (Maximino et al., 2007; Stoddard et al., 2007; Migliaro and Silva, 2016; Migliaro et al., 2018) and in Mormyroidea (Cobert, 1984; Moller, 2002).

Gymnotus omarorum shows a characteristic modulation of the mean EOD rate with the circadian cycle, with an increase in the early night and a decrease at dawn (Silva et al., 2007; Migliaro and Silva, 2016; Migliaro et al., 2018; Gascue et al., 2019). The analysis of inter-EOD interval sequences showed endogenously generated high-frequency bouts intercalated between periods of lower and regular frequency bouts (Forlim, 2008; Forlim and Pinto, 2014). This finding indicates that the mean or median values commonly used to describe the EOD rate circadian cycle are insufficient on their own for evaluation of the structure of the time sequence of intervals, and therefore their sole use discards important information about fish activity on a short-term time scale. For example, bimodal distributions may evidence significant changes of the interval and instantaneous frequency, which are not detected when the mean rate is measured over long intervals.

Here, we report the effects of light on the inter-EOD interval series in distinct experimental conditions either in steady-state illumination or under transient illumination pulses. To rule out the circadian effect, experiments were repeated at opposite phases of the circadian cycle. Our results show tonic responses to light which are added to the indirect effects on the EOD rhythm, caused by the endogenous circadian cycle (Stoddard et al., 2007). Fish also respond phasically to light pulses but their slower time course and the differences in adaptation differentiate them from electrosensory 'novelty responses'. Finally, we confirmed the tenebrotaxic behavior in an experimental series. We postulate that tonic and phasic accelerations caused by the direct sensory effects of light are part of a 'light-avoidance response' that allows the fish to follow a mobile habitat.

MATERIALS AND METHODS

Animals and ethics

Thirty *Gymnotus omarorum* (Richer de Forges et al., 2009) were captured in the summer season using dip nets in the Laguna del Cisne (34.9848 S, -55.1146 W) Uruguay, under permission of the

Ministerio de Agricultura y Pesca. All experiments were performed under the regulations of the animal care and use committees of the Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (protocol no. 001/03/2011). None of the procedures caused harm to the specimens. All specimens were returned to the aquarium after completion of the behavioral trials. During the captivity period, fish were kept in individual tanks with conditions matching those found in the wild (water conductivity of 70 μ S cm⁻¹, 25°C water temperature) and were fed *ad libitum* with insect larvae. Experiments were performed in 30 fish (length range 12–15 cm, with <2 weeks in captivity). The light cycle in the aquarium was natural, provided by large windows, and matched light levels found in wild conditions.

Experimental setup

The experiments were carried out in a chamber with dim light (1 lx measured underwater at the depth of the fish's eye) and sound isolation. The fish were placed in a fusiform pen consisting of a bamboo stick frame and nylon stocking mesh. This pen $(18\times2.5\times8 \text{ cm}, \text{ length}\times\text{width}\times\text{height})$ was placed inside a tank $(24\times36 \text{ cm} \text{ base})$ filled with water to a depth of 5 cm with a conductivity of 70 μ S cm⁻¹.

The EOD was recorded with a differential amplifier (AM Systems 3000, gain ×1000, bandwidth 10–10,000 Hz), visualized using a digital oscilloscope (Model GDS-1962A, GW-Instek, New Taipei City, Taiwan). Its timing was recorded by passing the raw signal through a homemade Schmitt trigger circuit. The output of this circuit was monitored by a microcontroller (Arduino Uno R3 ATmega328 microcontroller with up to 16 million instructions per second throughput at 16 MHz, Arduino LLC) which was also used to record the EOD timing and to control the stimuli generated by a white LED. We used a single LED (3.5 mm diameter) with a wavelength emission band bounded about 460 and 645 nm directly connected to the Arduino (Fig. 1A). The interval between pulses was evaluated by configuring an internal timer that keeps track of time. This timer was configured to generate an interrupt working as an internal clock. The time evaluation was performed by counting the interruptions of said timer. For example, between the two edges that measure the EOD, the number of counts was counted and scaled to time. The basic codes used for controlling the stimulus and acquisition are given in the Supplementary Materials and Methods. The current through the LED was determined by a series resistor. To change the intensity within the physiological range (i.e. up to 450 lx), we either placed the LED at different distances or changed the resistor controlling the current. In one experiment, we used a very bright intensity generated by four LEDs powered simultaneously to generate an illumination of 75,000 lx, well above the physiological range. The stimulus intensity used in each experiment was measured underwater at the depth of the fish's eye position using a light-dependent resistor (LDR, code GL5516; details as per the manual, https://www.kth.se/social/files/ 54ef17dbf27654753f437c56/GL5537.pdf) connected to а multimeter (Fluke 77, Fluke Co.). This device was calibrated using two methods at the temperature used during the experiments (24±1°C): (i) using a Minolta Autometer IV F (Minolta Camera Co. Ltd 1991) in illuminance measurement mode; (ii) with a Sper Scientific 840020 (Sper Scientific, Scottsdale, AZ, USA). The details of the LDR sensitivity to wavelength and intensity, the calibration curves and the method of construction of this device are given in the Supplementary Materials and Methods and Fig. S1. This device has the advantage over the Minolta and Sper Scientific meters that is waterproof and therefore can yield online



Fig. 1. The experimental setup and protocols. (A) Schematic diagram of the experimental setup. The fish is represented in black, and the water in gray (water conductivity 70 μ S cm⁻¹, temperature 25°C). (B) Protocol for evaluating tonic responses. The black and white sections at the top correspond to dark (1 k) and light (420 k) periods of stimulation. The gray sections labeled a-d correspond to four recording periods of 22,000 electric organ discharges (EODs) (approximately 10 min). (C–F) Protocols for evaluating phasic responses using a series of 22 trials (for the sake of simplicity, only two trials are represented). The arrows represent the sequence of bright (white) and dark (1 k; black) stimuli. Duration (no. of EODs) is shown within the arrows. (C) Exploration of the time course of the response to changes in illumination between 1 and 150 k. (D,E) Exploration of the amplitude of the response as a function of intensity (white boxes; D: 30, 150 and 75,000 k depending on the experiment; E: 19, 27, 52, 84, 262 and 411 k depending on the experiment). (F) Exploration of adaptation. The four arrows represent the four experimental series in which the sequence of light stimuli (150 k) corresponded to 100 and 700, 600 and 200, 500 and 300, or 400 EODs. (G) Exploration of adaptation [intensity (white boxes) was 19, 27, 52, 84, 262 and 411 k, depending on the experiment]. Paired pulses of 50 EODs were repeated in cycles of 1000 EODs.

measurements during the experiment in the field. This allowed us to measure underwater illumination at different depths in several conditions including open water, under the water plants (a large island *Eichornia crassipes* covering about 100 m²), and under a light spot caused by removing water plants in an area of 30 cm diameter.

Characterization of the tonic responses to light

These experiments were carried out on 7 fish. We recorded 22,000 EOD time stamps continuously in 7 fish under four constant illumination conditions. Because of the regularity of the discharge (Bullock, 1969; Forlim, 2013) when considering long evaluation periods, the experiment duration can be equivalently defined by the number of EODs or the total time. The first had a procedural advantage. Trials lasted between 10 and 11 min, and varied according to the fish and experimental conditions. The four experimental conditions were: 1 lx (comparable to the light measured in the fish's natural environment under aquatic plants during the day) in the morning (between 08:00 and 10:00 h), 1 lx during the early night (between 20:00 and 22:00 h), 420 lx (comparable to the light measured in the fish's natural environment without plants) in the late morning (between 10:00 and 12:00 h), and 420 lx during the early night (between 22:00 and 24:00 h). The procedure was as follows (Fig. 1B). (i) Fish were kept in darkness all night, and were recorded in the 1 lx light condition in the morning (recording a). (ii) Next, 420 lx illumination was applied with a tungsten filament lamp positioned 77 cm above the fish's head for 1 h, after which another recording trial was taken (recording b). (iii) This 420 lx illumination stimulus was kept on until early night,

when the third recording trial was taken (recording c). (iv) Lights were then switched off, and after 1 h of darkness (1 lx), the final recording was performed in these dark conditions (recording d) (Fig. 1B). Each recording was preceded by an adaptation period of 1 h (Gascue et al., 2019) at the stimulus intensity for a given condition. Recordings within a given time period (e.g. the early night) were carried out in the same fish order (individuals 1–7).

Characterization of the phasic responses

The time course of the responses to brief pulses of light were studied in 22 fish. Stimuli consisted of light pulses emitted by a LED controlled with homemade Arduino software. The intensity and duration of the pulse varied according to experimental conditions. All experiments consisted of 22 concatenated trials, without pause between them. Each experiment lasted 22,000 inter-EOD intervals corresponding to about 10 min depending on fish rate. The stimulus began at a given EOD ordinal number (referred to as EOD_0) and lasted for a fixed number of EODs (this value depended on the experiment). We performed three types of experiments in which the stimulus regime was varied in order to address the time course, the effect of stimulus intensity, and response adaptation during the day (all phase response trials were recorded between 10:00 h and 16:00 h). To evaluate the effects of the endogenous circadian cycle we repeated one of the experiments between 22:00 h and 24:00 h.

Time course

In 22 fish, we evaluated the time course of the transient effect of a light stimulus on the EOD interval sequence. In 16 fish, we

stimulated stepping light intensity from 1 lx (light intensity observed under the floating plants) to 150 lx (half of the light intensity without plants at noon in summer). In the other 6 fish, the light intensity effect was studied systematically (see below). The duration of the steps (100 EOD time stamps) was enough to encompass the transient response. Twenty-two stimulus steps were applied separated by periods of 900 EODs which were several times longer than necessary to reach a stable EOD rate (Fig. 1C).

The effect of stimulus intensity

In 10 fish, we stepped light intensity between 1 lx, and several values of illumination. We performed two series of experiments. In the first series made with 4 fish, we stepped the illumination from 1 to 30, 150 and 75,000 lx (this last, well above natural conditions) and vice versa. The dark and light conditions lasted 1000 EOD time stamps, repeated sequentially without pause (Fig. 1D). Steps down caused 'off' phasic responses only for the largest step well above natural conditions (between 75,000 and 1 lx). In the second series, we used 6 other fish in which we systematically explored the amplitude of the phasic response as a function of illumination. We stepped the illumination from 1 lx to six different light intensities compatible with values obtained in the field (19, 27, 52, 84, 262 and 411 lx) (Fig. 1E).

Evaluation of adaptation

To evaluate whether light-evoked phasic responses exhibit pairedpulse adaptation, we used two series of experiments. In 5 fish, we used light pulses of intermediate magnitude (1–150 lx) and 100 EOD duration (about 3–5 s depending on the fish) separated by different dark periods. Every fish was explored with four series of 44 pulses. Each series of paired stimuli consisted of 22 identical cycles of 1000 EODs. In each cycle, the pulses were separated by 100 and 700 EODs, 200 and 600 EODs, 300 and 500 EODs, or 400 EODs (Fig. 1F). In six other fish, we compared the adaptation of the response to light and to changes in conductance of a neighbor object using paired pulse stimulation. We used two protocols. In the first protocol, light pulses lasted 100 EOD and were separated by 100 EOD (similar to one of the experiments in a previous series – see above); in the second protocol, each stimulus lasted 50 EODs and they were separated by 50 EODs (Fig. 1G).

Light-avoidance behavior

To test phototaxis versus tenebrotaxis, we used two different experiments. First, we observed the behavior after placing the fish in a small narrow tank (30 cm long and 3 cm width) filled with aquarium water. This tank had a dark and an illuminated compartment. Seven fish were placed either in the bright or in the shaded compartment and fish behavior was observed for 10 min (see Movie 1). Second, we used the Y-maze method that was introduced by Waddell and Caputi (2021) to evaluate waveformspecific electrotaxis. To evoke electrotaxis, we applied the same electrical stimulus to the two arms of the Y-maze and evaluated the fish choice. In a preliminary experiment on 10 fish, we found that 5 fish chose the right side and the other 5 the left side in three out of three trials. Taking into account that fish lateralization (see Results) may bias the results, our experimental design focused on exploring the number of trials in which the difference in illumination between the two arms changed the natural choice. Then, we explored whether the fish reverse their natural choice side as a function of the difference in illumination between arms. A Y-maze with opaque walls was used. The arm not usually chosen was covered with thick cardboard and the other arm was illuminated in each series of experiments with 70, 1300 and 4745 lx using a tungsten filament light bulb placed at different distances. We counted the number of reversals of the natural tendency for each fish in three trials at each illumination intensity.

Data processing

In all cases, data from the Arduino was displayed on the screen as a text file, copied to a text editor, and transformed into binary to be processed off-line using Octave. The inter-EOD intervals were calculated as the difference in timing between subsequent EODs.

To evaluate tonic effects, we constructed first-order interval histograms and calculated and compared key statistical parameters. To evaluate transient effects, we normalized the sequence of inter-EOD intervals to the median of the 20 intervals before EOD_0 (basal interval) and expressed the time course of the inter-EOD interval sequence as a percentage of the control.

To evaluate the amplitude of the phasic response, we used an index (introduced in Pereira et al., 2012; also implemented in Jun et al., 2016). The response consists of an inter-EOD interval reduction reaching a minimum at about 20 EODs after stimulus onset. Therefore, we constructed a filter to detect a peak occurring at about 20 EODs on the normalized series of intervals. The cornerstone of this filter is to calculate the series of normalized intervals encompassing 20 EODs after every EOD for each trial. These series have a sharp minimum when the interval extends from EOD_0 to EOD_{20} and is about null in the control condition. Receiver operating characteristic curves (ROC curves) were constructed in the following way to verify the statistical significance of the response. We defined 250 equally spaced threshold values between -25% and 25%, and measured the number of trials that crossed every threshold within two windows: one including the intervals starting at the first 100 EODs after the stimulus (true positives) and the other including the intervals starting between EOD_{400} and EOD₅₀₀ (false positives). The ROC curve results from plotting the fraction of trials yielding true positive versus the fraction of trials yielding false positive responses for the thresholds explored. When the true and false positive distributions do not differ, the ROC plot yields a bisecting line (area under the curve=0.5). The degree of significance of the difference between two responses can be measured by the departure of the ROC curve from the bisecting line. When the area limited by the ROC curve and the bisecting line was larger than 0.25 (area under the curve=0.75), the difference was considered statistically significant (Green and Swets, 1966).

To evaluate the effect of intensity, we made a regression analysis between the amplitude of the response calculated as expressed above and the logarithm of the illumination. To evaluate adaptation, we used non-parametric tests between the responses obtained with the first and second paired stimuli.

RESULTS

The hypothesis evaluated in this study was that light has a direct sensory effect on fish behavior, in addition to the well-known effects on setting a circadian cycle. In order to use a light stimulus within the natural range, we explored the illumination intensity levels in nature. Fig. 2 compares the decay of illuminance with depth in three conditions: open water, under a light spot caused by removing the water plants, and under the plants; the corresponding values at which tonic, phasic and behavioral experiments were conducted are also indicated.

Taking into account that light may have multiple effects conveyed through different neural paths, we separately explored the effects of continuous illumination and step increments of light intensity at two



Fig. 2. Illuminance decays exponentially as a function of water depth. Filled squares indicate the illuminance in open water; data represented by filled circles were obtained by dipping the light-measuring cell through a clear spot of 30 cm diameter obtained by removing the plants; and data represented by filled triangles were obtained with the measuring cell under a closed island of *Eichornia crassipes* in Laguna del Sauce, Uruguay. Open symbols correspond to the light intensities used for the experiments in the laboratory.

opposite phases of the circadian cycle. Classically, sensory responses have two types of components: those depending on the present intensity of the stimulus, i.e. tonic responses, and those depending on the history of stimulation, i.e. phasic responses. To explore these components separately, a typical strategy is to apply abrupt steps between two constant values of stimulus intensity. Such abrupt increments caused a transient response (phasic) that increased as a function of the stimulus increment. Long-lasting periods of adaptation allowed us to explore steady-state components (tonic) signaling the present stimulus intensity.

Evaluation of the tonic responses

We evaluated the tonic response to light at opposite phases of the circadian cycle, comparing interval series obtained under light intensities similar to those observed in open water and beneath aquatic plants during the morning and early night under steady-state conditions (each stimulus intensity value was kept constant for at least 1 h prior to the start of the recordings).

Fig. 3 illustrates the results obtained from one fish. Under both dark experimental conditions, we found a tendency to switch between two activation states (previously described by Forlim and Pinto, 2014), reflected as a main (longer intervals, low frequency states) and a secondary (shorter intervals, high frequency states) mode in the inter-EOD histograms (compare histograms in Fig. 3, right).

Kruskal–Wallis one-way ANOVA test indicated that the mean (P=0.0059), median (P=0.0088) and coefficient of variation (P=0.016) of the EOD rate were not the same across the four conditions. All distributions exhibited a negative skewness due to the tendency of the fish to accelerate the EOD pacemaker, but no significant differences were observed across skewness values (Kruskal–Wallis test, P=0.22). However, the frequency of high-frequency bouts was larger and their average duration was longer during the night and dark conditions (Fig. 3C,D). This

change in the inter-EOD interval pattern is expressed in the inter-EOD interval as a secondary peak with a lower mode (arrow Fig. 3D).

Two-way ANOVA analyses (Friedman tests with repetition) confirmed previous observations that the EOD rate in *G. omarorum* exhibits an endogenous circadian cycle (Silva et al., 2007; Migliaro and Silva, 2016; Migliaro et al., 2018) and also indicated that light has an independent sensory-electromotor effect on the pacemaker (Fig. 4). We used the Friedman test with repetitions to compensate for the effects of light and dark, and found that median intervals at night were significantly smaller than median intervals during the day ($P=3\times10^{-4}$; Fig. 4A). No significant differences in median interval between light and dark were found when compensating for the effect of the endogenous rhythm (P=0.7664). However, the median interval in morning recordings was significantly shorter in light than in dark conditions (sign rank test P=0.0391; Fig. 4A), suggesting a tonic increase of the EOD rate due to photostimulation.

Similarly, two way ANOVA analysis indicated that light also reduced the interval variability after compensating for the effects of the circadian cycle (P=0.038; Fig. 4B). This was mainly due to an increase in the coefficient of variation during the night and dark conditions (P=0.0156 when compared with the other three conditions). During the night, median values of the coefficient of variation (0.037, 0.078 for light and dark, respectively; Fig. 4B) were larger than those during the day in the same condition (median values, 0.034 and 0.05 for light and dark, respectively; Fig. 4B). However, after compensating for the effects of light and darkness, there were no significant differences due to the endogenous rhythm (P=0.278; Fig. 4B).

This increase in variability under dark and night conditions led us to examine in detail the first-order histograms. We found that the inter-EOD interval distribution in dark conditions was bimodal for all fish at night and only for two fish during the day. The mean and median values frequently used are adequate for comparing distributions with a single mode. However, our results show skewed and bimodal distribution. Thus, such location parameters reflect a trade-off between the probability of intervals around each of the two modes and the separation of the modes. Therefore, to gain additional information, we complemented the previous analysis with a comparison of each mode of the distributions and the peak values for each mode.

When compensating for light and dark conditions, the mode corresponding to the histogram's largest peaks (the so-called main mode, reflecting the basal frequency state) is smaller during the night, (P=0.0294; Fig. 4C). This reflects a nocturnal EOD acceleration caused by the endogenous cycle. When compensating for the endogenous effect, the main modes in light conditions are shorter than in dark conditions (P=0.0057; Fig. 4C). This indicates that light caused per se an increase of the basal pacemaker frequency, independently of the endogenous rhythm effect.

The secondary peak mainly appears in dark conditions (Fig. 3). This corresponds to the emergence of high-frequency bouts that increase in duration and probability during the night in dark conditions (all 7 fish versus only 2 during the day). This nocturnal rise of the peak corresponding to the secondary mode is reflected in the reduction of the peak corresponding to the main mode (Fig. 4D; sign rank test, P=0.0156). The two effects, the increase in the basal rate and the increase in probability of the high-frequency bouts, combine to cause the highest EOD rate observed in *G. omarorum* during the night.



Fig. 3. Illumination causes tonic responses on inter-EOD interval. (A–D) The tonic effect of 420 lx (white background; top) and 1 lx (gray background; bottom) during the morning (A,C) and early night (B,D). The comparison across panels shows that the presence of high-frequency bouts (horizontal bars in D) is more probable during the night, causing a secondary peak in the first-order interval histogram (arrow in D). Illumination during the night suppresses high-frequency bouts and increases the basal frequency peak and reduces its corresponding mode (B), while darkness during the day facilitates high-frequency bouts (horizontal bars in C) and reduces the basal frequency.

Time course of phasic responses evoked by light stimuli

The responses evoked by short pulses of light were studied in 22 fish. They consisted of a successive reduction of the first 20 inter-EOD intervals after the onset of the light pulse, followed by a slower relaxation, which lasted approximately 60–100 EODs. For intensities within the natural daytime range (30 and 150 lx), pacemaker acceleration responses occurred at the stimulus onset only. At high stimulus intensities (75,000 lx, well above natural stimuli) the light-evoked response occurred at both the onset and cessation of the stimulus. In this case, the response at the 'off' was slower and of lower amplitude.

To characterize response time course, we recorded the sequence of intervals in contiguous trials of 1000 EODs initiated by a brief pulse of light (150 lx) lasting 100 EODs in 16 fish. Results obtained in a complete experiment on the same fish are plotted as a function of the EOD ordinal number in polar coordinates in Fig. 5A. As stimulation was repetitive, to show the consistency of the response, every circle turn corresponds to each of the 22 trials and the distance from the center corresponds to the inter EOD interval. The white sector corresponds to 'light-on' and the gray one to 'light-off' periods. For the sake of clarity, averaged responses from 7 fish are superimposed in Fig. 5B. These responses peak at about the 20th interval following stimulus onset. Taking this observation into account, we calculated a series of 20th order intervals for each trial (i.e. intervals between every 20 EODs; between EOD₀ and EOD₂₀, EOD_1 and EOD_{21} , EOD_2 and EOD_{22} , and so forth, with the subscript indicating the ordinal EOD number, with respect to the stimulus onset). This filtering procedure allowed us to define a clear peak in the 7 fish (Fig. 5C). This signal transformation also allowed us to verify the statistical significance of the response by contrasting, for each fish, the amplitude of the response obtained after the stimulus onset with the amplitude of any incidental accelerations that occur in the absence of stimulus in the period between EOD_{401} and EOD₅₀₀. To perform this comparison, we defined a series of threshold values and compared the fraction of traces crossing each threshold after the stimulus onset (true positives) with the fraction of traces crossing the same threshold in the absence of stimulus (false

positives). This allowed us to construct ROC curves (Fig. 5D), which showed significant differences in all cases (the area under the curve ranged from 0.79 to 1). Thus, in the rest of this study, the peak value of the series of the 20th order intervals was considered as a faithful indicator of response amplitude.

In a first series of experiments, we found that the amplitude of the response increased with stimulus strength (Fig. 6A). However, one of these intensities was beyond the natural range. Thus, we designed a second series of experiments on 6 fish at selected intensities within the natural range in order to perform a regression analysis. This experiment showed that the amplitude of the phasic response increased linearly with the logarithm of the illumination intensity (Fig. 6B).

Finally, we explored the adaptation of the response. In a first series or experiments, the amplitude of the light-evoked phasic response was not consistently altered when using pairs of similar stimuli (150 lx, 100 EOD) separated by inter-stimulus intervals of 100, 200, 300, 400, 500, 600 and 700 EODs (Kruskal–Wallis, P=0.53; Fig. 7A). In a second series of experiments, we paired a test pulse of 50 EODs with a conditioning pulse of 50 EODs separated by 50 EODs (about 1.5–2 s, depending on the fish). This experiment had the minimum possible separation between stimuli as the test stimulus was applied at the end of the response evoked by the conditioning. The results were visually similar, although when comparing the median amplitude of the responses to the conditioning stimulus across trials (Fig. 7B) with the median amplitude of the response to the test stimulus (Fig. 7C), we found a significant reduction (sign rank test, P=0.0068, N=11 fish; Fig. 7D).

Light-avoidance behavior

An interesting observation during these experiments was that one small fish (9 cm) exhibited a tendency to turn around after stimulus onset, which was clearly seen by the reversal of EOD waveform polarity monitored via an oscilloscope. While we were not able to use this fish in our analyses because of its intolerance to the experiment, this behavior suggested that the phasic response to light was part of a 'light-avoidance skeleton electromotor response'. This



Fig. 4. Differences in inter-EOD histograms. (A) Median values are different across the four conditions shown in Fig. 3 (Kruskal-Wallis, P=0.0088). Two-way ANOVA indicates a significant effect of the circadian cycle (Friedman tests with repetitions: χ^2 =13.24, d.f.=1, P=3×10⁻⁴, post hoc sign rank test: P=0.0156 and P=0.0078 in dark and light conditions, respectively), but fails to detect a global effect of light (Friedman tests with repetitions: χ^2 =0.09, d.f.=1, *P*=0.7664). However, pairwise comparison suggests a light acceleration effect during the day (post hoc sign rank test: P=0.031, Holm–Bonferroni corrected). (B) Coefficient of variation is different across conditions (Kruskal-Wallis test: P=0.016). Two-way ANOVA indicates a significant effect comparing light and darkness (Friedman tests with repetition: χ^2 =4.32, d.f.=1 *P*=0.038), but no significant differences due to the circadian cycle (Friedman test with repetition: χ^2 =1.18, d.f.=1, P=0.278). However, pairwise comparisons suggest an increase in variability during the night (P=0.0156, Holm-Bonferroni corrected). (C) Main modes of the histograms are smaller during the night (two-way Friedman test with repetition: χ^2 =4.74, d.f.=1, P=0.0294) and in light conditions (Friedman test: χ^2 =7.65, d.f.=1, *P*=0.0057). *Post hoc* comparison suggests an acceleration effect of light on the basal interval (sign rank test: P=0.031 in both cases). (D) The peak values of the histogram at the main modes significantly increase with illumination as a result of suppression of the high-frequency bouts (sign rank test: P=0.0156). White boxes, light (420 lx); gray boxes, dark (1 lx).

led us to examine whether fish prefer to stay in the shade or the bright side of a small tank. When fish were initially placed in the bright region, they immediately swam to the shaded region, and when placed in the shaded region, they remained there during 10 min of observation (sign test: P=0.0156, N=7).

To confirm this observation, we performed forced-choice experiments during electrotaxis behavior in a Y-maze. To provoke electrotaxis, we applied the same stimulus between the ends of the

Table 1. Tenebrotaxis explored in a forced-choice experiment

Stimulus comparison	No. of correct reversals						Sign rank vs
	0	1	2	3	Median	Mean	0 <i>P</i> -value
70 lx vs 0.43 lx 1300 lx vs 0.43 lx 4575 lx vs 0.43 lx	1 2 0	6 0 1	2 1 1	1 7 8	1 3 3	1.3 2.2 2.7	0.0002 0.0078 0.0039

We found that in *Gymnotus*, each individual consistently chose either the right or left of the Y-maze when illumination was the same in the two arms. The number of reversals of the swimming preference side when different illumination at each arm was applied is indicated. Illumination at the dark arm was always 0.43 lx; illumination in the other arm is indicated in column 1. Sign rank test indicates a significant difference between the number of reversals at 70 and 1300 lx (*P*=0.0430, *N*=10, Holm–Bonferroni corrected) and between the number of reversals at 70 and 4745 lx (*P*=0.001, *N*=10, Holm–Bonferroni corrected).

two parallel arms of the Y-maze and the base point. As the maze pen has a constant section, the current density and electric field were similar at each branch. In this condition, we expected that the fish would make a choice by chance between the two arms. However, we found that half of the fish systematically chose the right arm and the other half systematically chose the left one. This suggests that fish may have either a right or a left swimming preference (i.e. a rudimentary form of lateralization). Then, to test choices in the Y-maze, we evaluated whether the tenebrotaxis/ photophobia has enough influence to revert this natural lateralization. The distribution of reversals in the three trials for the three experimental conditions is shown in Table 1. These data indicate that the average number of reversals in the fish's habitual choice side increases with the difference in illumination between the two arms.

DISCUSSION

This article shows that photo-stimulation influences electromotor behavior in various complex ways. We found that besides its previously described influence on the endogenous circadian rhythm (Migliaro and Silva, 2016; Migliaro et al., 2018), light within the physiological stimulus range tends to increase pacemaker rate per se. Steady and transient stimuli evoke tonic and phasic responses, respectively, that may be relevant to fish life. A tentative hypothesis is that the complex effects on the EOD rate and variability previously observed along the circadian cycle (Silva et al., 2007) occur because the pacemaker interval receives multiple descending drives. Among these, we focus on two main light-dependent drives: one endogenous, associated to the circadian rhythm, and the exogenous, the illumination cycle. Although they have different and, in some cases, opposed effects, the light stimuli and the circadian cycle are associated in nature in a season-dependent way.

Our data confirm that photo-stimulation causes pacemaker acceleration per se

To reveal the sensory effects of light on pacemaker activity per se, we had to separate the effects of the endogenous circadian cycle, which are associated with the light cycle. Therefore, the first part of the study compared the histograms under light and dark conditions at two opposite phases of the circadian cycle. We confirmed that during the circadian cycle, the mean EOD rate and the EOD variability increase during the night (Silva et al., 2007; Migliaro and Silva, 2016; Migliaro et al., 2018; compare Fig. 3A and D). However, to make a proper analysis of pacemaker activity in steadystate conditions, we studied the inter-EOD interval histogram. As it



Fig. 5. Photosensory-evoked electromotor phasic response. (A) Experiment consisting of 22 trials lasting 1000 EODs in which a photic pulse (150 lx, 100 EODs) was applied. Raw data are represented in a polar plot where the white sector corresponds to the light pulse and the gray sector to the dark period (1 lx). (B) Comparison between the responses averaged across 22 trials for 7 fish. For the sake of clarity, we show only these responses, including the largest and the smallest, but all fish displayed similar responses. (C) Averaged data of the 20th order interval calculated from the same data used for B. (D) Receiver operating characteristic curves (ROC curves) for the same 7 fish. Each ROC curve represents the probability of true positives (i.e. the fraction of trials in which the 20th order traces after the stimulus crossed a series of thresholds) as a function of false positives (i.e. the fraction of trials in which the 20th order traces of thresholds in the absence of stimuli). The areas under the curve are: 1, 0.975, 0.945, 0.93, 0.895, 0.83 and 0.79.

showed a skewed distribution for long periods, the commonly used parameter mean rate would be influenced by the degree of asymmetry of the distribution (Pereira et al., 2012). We interpret that the main mode more likely corresponds to the tonic activity of the pacemaker, and the skewness of the histogram corresponds to transient effects driven by sensory stimuli, internal collaterals of skeletomotor commands and other endogenous signals. We found that during the night phase of the circadian cycle, the inter-EOD interval distribution histogram showed two modes, one larger, corresponding to the absolute maximum of the histogram (here referred to as the main mode) and another smaller one, corresponding to a local smaller maximum (here referred to as the secondary mode). The main source of this secondary mode is the emergence of spontaneous bouts of high frequency that stand out. intercalated between periods of lower basal frequency (Forlim, 2013; Forlim and Pinto, 2014). This suggests that the accelerating effects on the pacemaker of the night phase of the endogenous circadian cycle (Perrone et al., 2009; Migliaro and Silva, 2016; Migliaro et al., 2018) have two main causes: (i) an increase in pacemaker tonic activity, reflected in the reduction of the main modes of nocturnal with respect to diurnal histograms in the same light conditions, and (ii) an increase in the probability of highfrequency bouts during the night (Fig. 3C), contributing additionally to the increase in mean rate and also explaining the larger rate variability of the EOD.

The first set of evidence in favor of the hypothesis that light has a direct sensory effect on the pacemaker rhythm is that sustained illumination provoked a reduction of the mean EOD rate during the day (Fig. 4A) and also a reduction of the coefficient of variability of the EOD rate independently of the time of the day (Fig. 4B). The main mode of the inter-EOD interval histogram in the dark was larger than under illumination in both phases of the endogenous circadian cycle (Fig. 4C). As the main mode is likely a good indicator of the pacemaker tonus in a given condition, its reduction by illumination implies that tonic photo-stimulation per se causes an increase of the excitatory inputs on the pacemaker. In addition, light stimuli similar in amplitude to those found in open waters suppress high-frequency bouts, both during the day and during the night, indicating a powerful suppressing effect on this behavior. Highfrequency bouts alter the interval distribution from mono- to bimodal, with the net result being an increase in the EOD rate. However, there is a reduction of the median interval, an increase in

skewness and also an increase of the peak of the secondary mode at expense of the peak of the main mode. This is outstanding during the night (Fig. 4D). Thus, the direct tonic effect of photo-stimulation on EOD rate is twofold: it reduces the basal interval and it also reduces the probability of high-frequency bouts.

The second set of evidence in favor of the hypothesis is that light pulses evoke transient accelerations of the pacemaker. These phasic responses show three characteristics: (i) they are slow, (ii) their amplitude increases with stimulus intensity amplitude, and (iii) the effect of a phasic response on a subsequent one is present only when the interstimulus interval is very short.

Light-evoked phasic responses share with novelty responses the graded amplitude with stimulus intensity. However, their rising phases (about 20 EODs or about 500–600 ms) were significantly slower than those evoked by active electrosensory (2 EODs or about 60 ms; Aguilera and Caputi, 2003; Caputi et al., 2003) or mechanosensory (7–8 EODs or about 200 ms; Barrio et al., 1991) stimuli reported in the literature in similar experimental conditions. This slower time course suggests that these EOD rate accelerations are different from fast novelty responses observed with other sensory modalities. Another consistent difference is that the effect of one response on a subsequent one can be shown at short intervals only, implying that the memory trace decays much faster than in the case of novelty responses elicited by a change in a nearby object conductance (Caputi et al., 2003).

Phasic responses appear to be associated with skeletomotor activities, which have been observed in other circumstances in these fish. For example, Mauthner neuron antidromic activation causes a strong and sudden pacemaker acceleration response via the activation of multiple paths (Falconi et al., 1995, 1997; Comas and Borde, 2010). This response, referred to as a 'Mauthner initiated abrupt increase in rate' (Falconi et al., 1995), is associated with the escape reflex triggered by intense mechanosensory stimuli, and may have the role of increasing the active electroreception system sampling frequency during a fast movement that involves not only linear motion but critically a drastic change in swimming direction (Borde et al., 2004). Other pacemaker acceleration responses induced by skeletomotor activities are associated with back and forth movements during object electrosensory exploration (referred to as B-scans; Jun et al., 2016) and during object-following movements (Uyanik et al., 2019; Comertler and Uyanik, 2021). The latter is notable because in the wave fish *Eigenmannia*, the main



Fig. 6. Amplitude of the light-evoked response as a function of illuminance. (A) Amplitude of the response compared across three intensities in 4 fish: 30 lx (low), 150 lx (medium) and 75,000 lx (high) (Friedman test: χ^2 =8, d.f.=2, *P*=0.0183. Kendall's *W*=1). (B) Amplitude of the response as a function of increasing levels of illuminance.

feedback used by the fish for object-following behavior is visual stimuli (Comertler and Uyanik, 2021) and this may have a role in the adaptation of fish to their habitat.

The observed differences from novelty responses, including the slow time course, the shortness of the memory trace during the response, and the frequent association of accelerations and skeletomotor activity in these fish suggest that in our experiments the phasic electromotor response to light is the first stage of a global light-avoidance response in which the fish accelerates the EOD rate to increase the sampling sensory frequency just before moving away from the light. This was confirmed by the tenebrotaxic behavior observed in two independent light-avoidance behavioral experimental series.

What could be the functional role of the light effects on the pacemaker?

These fish are solitary animals whose natural habitats are islands of aquatic floating plants, primarily composed of the species



Fig. 7. Characteristics of the photosensory electromotor response. (A) The photosensory electromotor response is not altered by the interval between stimuli (Kruskal–Wallis, P=0.53). Paired responses after interstimulus intervals of 100 and 700 EODs (open circles, sign rank test, P=0.17), 200 and 600 EODs (filled circles, sign rank test, P=0.35), 300 and 500 EODs (open squares, sign rank test, P=0.46) did not show significant differences. (B–D) When a test stimulus (C was applied just at the end of a previous response evoked by a conditioning stimulus (Cond.; B), we found that the test-evoked response had a significantly smaller amplitude (sign rank test, P=0.0068; D).

Eichornia crassipes. These plants are clumped together by an entangled complex of fine and relatively long roots in which these fish hide during the day. Data obtained in experimental light conditions similar to those in nature suggest that in open water, the fish will have a regular and faster rate than expected by the effect of the endogenous cycle alone, while under the plants, the lack of a light acceleration effect is somewhat compensated for by the transient increases in rate caused by the appearance of high-frequency bouts.

The wide leaves and the root network of *E. crassipes* form a light barrier that protects these fish from their natural macroptic predators (genera *Australoheros* and *Hoplias*). The tonic effects on the pacemaker rate described herein may also have an important role in animal life. When the fish swims in open water during the day, light stimuli accelerate and regularize the rhythm, which increases the sensory sampling rate, facilitating the evaluation of heightened predation risks after losing the protection of floating plants. In the dark, fish display high-frequency bouts which are more frequent and last longer during the active phase of the circadian cycle; these may occur even though the fish is quiet, but also may be associated with skeletomotor exploratory behaviors. The light-avoidance response



Fig. 8. A tentative hypothesis on the effects of light and the endogenous circadian cycle on pacemaker rhythm. (A) During the night,

in the absence of light, the pacemaker nucleus (PM) is driven by two influences of the endogenous rhythms: one tonic, reducing the basal interval, and the other generating the high-frequency bouts (HFB). (B) During the day, in open water, the effects of photo-stimulation and the endogenous circadian cycle on the generator of the HFBs tend to cancel out, and the PM is mainly driven by the sum of tonic effects of light and endogenous rhythm. (C) During the day, under the plants, the effects of the endogenous circadian rhythm on the HFB generator (thick arrow) overcome the effect of light (thin arrow). The mild effect of light reduces the probability of HFBs and the influence of the bout generator on the PM (intermediate arrow). In addition, light causes a mild tonic acceleration effect on the PM (thin arrow), which adds to the effects of endogenous rhythm via the tonic and the bout control systems. The histograms on the side show the relative weight of basal and high-frequency bouts in each circumstance, expressed as a difference in height of the main and secondary peaks and their corresponding modes.

can be considered a subset of an object-following behavior (Uyanik et al., 2019; Comertler and Uyanik, 2021) that allows the fish to follow the shade of the floating aquatic plants (in which these fish find shelter during the day), and therefore allows them to stay within the island-like congregations of these plants as they move as a result of water currents and winds. In addition, light penetration between the leaves may generate bright 'sunspots', which slowly move according to the sun's position, and may reveal hiding fish to predators.

Our present view on how illumination and circadian cycle interact is schematized in Fig. 8. We postulate that the pacemaker interval is under two main drives, one tonic and the other transient, causing either high-frequency bouts or other sensory-driven accelerations. The endogenous rhythm tends to increase the rate by both mechanisms (reducing the main mode and facilitating highfrequency bouts during the night), but light has opposed effects on the mean EOD rate (increases the basal rate but blocks the appearance of bouts). In nature, the endogenous rhythm and the light cycle are associated. Therefore, during the night, the mean pacemaker rate increases because of the effect of the endogenous cycle only (reducing the basal intervals and increasing the probability of high-frequency bouts; Fig. 8A). The presence of high-frequency bouts also explains the higher nocturnal variability.

During the day, the endogenous circadian rhythm tends to reduce the pacemaker rate. This endogenous effect is attenuated by daylight in an intensity graded fashion (Fig. 8B,C). The observed differences in illumination between experimental conditions are similar to those in open water and hiding under aquatic plants, and suggest that in the first condition the fish would have a regular and faster rate (Fig. 8B), whereas under the second there was an increase in rate caused by the appearance of high-frequency bouts that somewhat compensated for the shift of the main mode to larger values (Fig. 8C).

Additional evidence supporting the nature of these behaviors as a global light-avoidance response is the absence of a direct anatomical projection from the optic tectum to the prepacemaker nucleus. The modulations of the EOD rate induced by light on the pacemaker nucleus require the activation of a connecting path originating from the optic tectum. No direct projections have yet been described between the tectum and the prepacemaker. For example, in *Eigenmannia virescens*, anterograde transport of byocitin injected into the prepacemaker nucleus showed no projections on the optic tectum (Wong, 1997). In *G. omarorum*, the injection of byocitin near the pacemaker cells resulted in two groups of retrogradely marked neurons at the level of the diencephalon and the brainstem (Comas and Borde, 2010). The activation of these groups of cells by the injection of glutamate resulted in increases of the frequency of the EOD.

In pulse fish – as in wave fish (Sas and Maler, 1986) – a direct projection from the retina to the suprachiasmatic nucleus has been found (Lázár et al., 1987; Wong, 1997). This suggests a possible role of the suprachiasmatic nucleus in the generation of the phasic response while tonic responses could be mediated by the tectum and pretectum.

A final and more general consideration is that peculiar homeoactive senses (i.e. those that use a self-generated carrier; Zweifel and Hartmann, 2020), such as the active electric sense, active whiskering and echolocation, are most often found in animals adapted to live in dark environments. It appears that light influences on these homeoactive sensory modalities may modulate speciesspecific sensory channels that enable swimming, running and flying, and also cryptic communication in relatively crowded dark environments, endowing these taxa with sensory advantages that allow them to capture prey and reproduce while avoiding predators with a sensory predominant visual system.

Acknowledgements

We thank Dr Joseph Waddell for critical comments and English editing of the manuscript, and Drs Leonardo Barboni and Federico Pedraja for their help with Arduino software.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests

Author contributions

Conceptualization: A.A.C., P.A.A.; Methodology: A.A.C., P.A.A.; Software: A.A.C., P.A.A.; Formal analysis: A.A.C., P.A.A.; Investigation: A.S.C., P.A.A.; Resources: A.A.C.; Data curation: P.A.A.; Writing - original draft: A.S.C., A.A.C., P.A.A.;

Writing - review & editing: A.S.C., A.A.C., P.A.A.; Visualization: A.S.C., A.A.C., P.A.A.; Project administration: P.A.A.; Funding acquisition: A.A.C.

Funding

This research was funded by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII; FCE_1_2019_1_ 155541) and Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA). A.S.C. received a Master's studentship from ANII (FCE_1_2019_1_ 155541).

Data availability

All relevant data can be found within the article and its supplementary information.

References

- Adibi, M. (2019). Whisker-mediated touch system in rodents: from neuron to behavior. Front. Syst. Neurosci. 13, 40. doi:10.3389/fnsys.2019.00040
- Adibi, M., Diamond, M. E. and Arabzadeh, E. (2012). Behavioral study of whiskermediated vibration sensation in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 971-976. doi:10.1073/pnas.1116726109
- Aguilera, P. A. and Caputi, A. A. (2003). Electroreception in *G. carapo*: detection of changes in waveform of the electrosensory signals. *J. Exp. Biol.* 206, 989-998. doi:10.1242/jeb.00198
- Aguilera, P. A., Castello, M. E. and Caputi, A. A. (2001). Electroreception in Gymnotus carapo: differences between self-generated and conspecificgenerated signal carriers. J. Exp. Biol. 204, 185-198. doi:10.1242/jeb.204.2.185
- Barrio, L. C., Caputi, A., Crispino, L. and Buño, W. (1991). Electric organ discharge frequency modulation evoked by water vibration in *Gymnotus carapo*. *Comp. Biochem. Physiol. A: Physiol.* **100**, 555-562. doi:10.1016/0300-9629(91)90369-N
- Borde, M., Curti, S., Comas, V. and Rivero, C. (2004). Modulación central de un sistema sensorial por un comando motor. Una intención con dos resultados. *Rev. Neurol.* 38, 253-260. doi:10.33588/rn.3803.2004006
- Bullock, T. H. (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. doi:10.1159/000125815
- Bullock, T. H. and Heiligenberg, W. (1986). *Electroreception*. New York, USA: John Wiley & Sons.
- Bullock, T. H., Hopkins, C. D., Popper, A. N. and Fay, R. R. (2005). Electroreception. In Handbook of Auditory Research, vol 21. New York, USA: Springer.
- Capurro, A., Reyes-Parada, M., Ardanaz, J. L., Silveira, R. and Macadar, O. (1994). Serotonergic control of electric organ discharge in *Gymnotus carapo*. Role of 5-HT2A/2c receptor subtypes. *Comp. Biochem. Physiol. A: Physiol.* **109**, 583-591. doi:10.1016/0300-9629(94)90197-X
- Caputi, A. A. and Aguilera, P. A. (2019). Encoding phase spectrum for evaluating 'electric qualia.' *J. Exp. Biol.* 222, jeb191544. doi:10.1242/jeb.191544
- Caputi, A. A., Aguilera, P. A. and Castelló, M. E. (2003). Probability and amplitude of novelty responses as a function of the change in contrast of the reafferent image in *G. carapo. J. Exp. Biol.* 206, 999-1010. doi:10.1242/jeb.00199
- Carr, C. E. and Konishi, M. (1990). A circuit for detection of interaural time differences in the brain stem of the barn owl. J. Neurosci. 10, 3227-3246. doi:10. 1523/JNEUROSCI.10-10-03227.1990
- Chen, J., Okimura, K. and Yoshimura, T. (2020). Light and hormones in seasonal regulation of reproduction and mood. *Endocrinology* 161, bqaa130. doi:10.1210/ endocr/bqaa130
- **Cobert, S. J.** (1984). Environmental control of rhythmic behavior in the weak-electric fish *Gnathonemus petersii* (mormoridae). *City University of New York Dissertation*.8409390.
- Comas, V. and Borde, M. (2010). Neural substrate of an increase in sensory sampling triggered by a motor command in a gymnotid fish. J. Neurophysiol. 104, 2147-2157. doi:10.1152/jn.00076.2010
- Comertler, M. S. and Uyanik, I. (2021). Salience of multisensory feedback regulates behavioral variability. *Bioinspir. Biomim.* 17, 016006. doi:10.1088/1748-3190/ac392d
- Cowan, M., Azpeleta, C. and López-Olmeda, J. F. (2017). Rhythms in the endocrine system of fish: a review. J. Comp. Physiol. B 187, 1057-1089. doi:10. 1007/s00360-017-1094-5
- De Sousa, A. A., Todorov, O. S. and Proulx, M. J. (2022). A natural history of vertebrate vision loss: insight from mammalian vision for human visual function. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **134**, 104550. doi:10.1016/j.neubiorev.2022.104550
- Diamond, M. E. and Arabzadeh, E. (2013). Whisker sensory system–from receptor to decision. Prog. Neurobiol. 103, 28-40. doi:10.1016/j.pneurobio.2012.05.013
- Falconi, A., Borde, M., Hernández-Cruz, A. and Morales, F. R. (1995). Mauthner cell-initiated abrupt increase of the electric organ discharge in the weakly electric fish *Gymnotus carapo*. J. Comp. Physiol. A **176**, 679-689. doi:10.1007/ BF01021588
- Falconi, A., Lorenzo, D., Curti, S., Morales, F. R. and Borde, M. (1997). Mauthner cell-evoked synaptic actions on pacemaker medullary neurons of a weakly electric fish. *J. Comp. Physiol. A* **181**, 143-151. doi:10.1007/s003590050101

- Forlim, C. G. (2008). Estudo experimental da eletrocomunicação em peixes de campo elétrico fraco da espécie Gymnotus carapo-uma aplicação da Teoria da Informação. MSc thesis, Instituto de Física, Universidade de São Paulo.
- Forlim, C. G. (2013). Estudo da eletrocomunicação em Gymnotus carapo e Gnathonemus petersii livres por tempos longos mediante protocolos realistas de estimulação. Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo.
- Forlim, C. G. and Pinto, R. D. (2014). Automatic realistic real time stimulation/ recording in weakly electric fish: long time behavior characterization in freely swimming fish and stimuli discrimination. *PLoS One* **9**: e84885. doi:10.1371/ journal.pone.0084885
- Fotowat, H., Lee, C., Jun, J. J. and Maler, L. (2019). Neural activity in a hippocampus-like region of the teleost pallium is associated with active sensing and navigation. *Elife* 8, e44119. doi:10.7554/eLife.44119
- Gascue, V., Migliaro, A. and Silva, A. (2019). Social modulation on daily variability in electric behavior. XV Latin American Symposium on Chronobiology 2019. doi:10.5935/1984-0063.20200012
- Godsil, B. P. and Fanselow, M. S. (2004). Light stimulus change evokes an activity response in the rat. Anim. Learn. Behav. 32, 299-310. doi:10.3758/BF03196029
- Green, D. M. and Swets, J. A. (1966). Signal Detection Theory and Psychophysics. New York: Wiley.
- Griffin, D. R. (1958). More about Bat "Radar". Sci. Am. 199, 40-45. doi:10.1038/ scientificamerican0758-40
- Harrell, E. R., Goldin, M. A., Bathellier, B. and Shulz, D. E. (2020). An elaborate sweep-stick code in rat barrel cortex. Sci. Adv. 6, eabb7189. doi:10.1126/sciadv. abb7189
- Jun, J. J., Longtin, A. and Maler, L., (2014). Enhanced attention precedes selfinitiated locomotion in an electric fish. *BMC Neurosci.* 15, P104. doi:10.1186/ 1471-2202-15-1
- Jun, J. J., Longtin, A. and Maler, L. (2016). Active sensing associated with spatial learning reveals memory-based attention in an electric fish. J. Neurophysiol. 115, 2577-2592. doi:10.1152/jn.00979.2015
- Knudsen, E. I. and Konishi, M. (1979). Mechanisms of sound localization in the barn owl (Tyto alba). J. Comp. Physiol. 133, 13-21. doi:10.1007/BF00663106
- Kreysing, M., Pusch, R., Haverkate, D., Landsberger, M., Engelmann, J., Ruiter, J., Ulbricht, E., Grosche, J., Franze, K., Franze, K. et al. (2012). Photonic crystal light collectors in fish retina improve vision in turbid water. *Science* 336, 1700-1703. doi:10.1126/science.1218072
- Lázár, G., Toth, P. and Szabo, T. (1987). Retinal projections in gymnotid fishes. J. Himforsch 28, 13-26.
- Lythgoe, J. N. (1988). Light and vision in the aquatic environment. In *Sensory Biology of Aquatic Animals* (ed. J. Atema, R. R. Fay, A. N. Popper and W. N. Tavolga), pp. 57-82. New York, NY: Springer.
- Maximino, C., Marques, T., Dias, F., Cortes, F. V., Taccolini, I. B., Pereira, P. M., Colmanetti, R., Gazolla, R. A., Tavares, R. I., Rodrigues, S. T. K. et al. (2007). A comparative analysis of the preference for dark environments in five teleosts. *Int. J. Comp. Psychol.* 20, 351-367. doi:10.46867/JJCP.2007.20.04.02
- Migliaro, A. and Silva, A. C. (2016). Melatonin regulates daily variations in electric behavior arousal in two species of weakly electric fish with different social structures. *Brain Behav. Evol.* 87, 232-241. doi:10.1159/000445494
- Migliaro, A., Moreno, V., Marchal, P. and Silva, A. (2018). Daily changes in the electric behavior of weakly electric fish naturally persist in constant darkness and are socially synchronized. *Biol. Open* 7, bio036319. doi:10.1242/bio.036319
- Migliaro González, A. (2018). Modulación ambiental y hormonal del ritmo circadiano de la conducta eléctrica. *Tesis de doctorado*, PEDECIBA, Área Biología. https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/21474/ 1/uy24-19275.pdf.
- Moller, P. (1995). Electric Fishes: History and Behavior. Fish and Fisheries. London: Chapman & Hall. Springer.
- Moller, P. (2002). Multimodal sensory integration in weakly electric fish: a behavioral account. J. Physiol. 96, 547-556. doi:10.1016/S0928-4257(03)00010-X
- Peña, J. L. and Debello, W. M. (2010). Auditory processing, plasticity, and learning in the barn owl. ILAR J. 51, 338-352. doi:10.1093/ilar.51.4.338
- Pereira, A. C. and Caputi, A. A. (2010). Imaging in electrosensory systems. Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci. 2, 291-307. doi:10.1007/s12539-010-0049-2
- Pereira, A. C., Aguilera, P. and Caputi, A. A. (2012). The active electrosensory range of *Gymnotus omarorum*. J. Exp. Biol. **215**, 3266-3280. doi:10.1242/jeb. 070813
- Perrone, R., Macadar, O. and Silva, A. (2009). Social electric signals in freely moving dyads of *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. J. Comp. Physiol. A 195, 501-514. doi:10.1007/s00359-009-0427-6
- Richer-De-Forges, M. M., Crampton, W. G. and Albert, J. S. (2009). A new species of *Gymnotus* (Gymnotiformes, Gymnotidae) from Uruguay: description of a model species in neurophysiological research. *Copeia* 2009, 538-544. doi:10. 1643/CI-07-103
- Rodríguez-Cattaneo, A., Aguilera, P. A. and Caputi, A. A. (2017). Waveform sensitivity of electroreceptors in the pulse-type weakly electric fish *Gymnotus* omarorum. J. Exp. Biol. 220, 1663-1673. doi:10.1242/jeb.153379
- Roenneberg, T. and Foster, R. G. (1997). Twilight times: light and the circadian system. *Photochem. Photobiol.* 66, 549-561. doi:10.1111/j.1751-1097.1997. tb03188.x

- Rojas, R. and Moller, P. (2002). Multisensory contributions to the shelter-seeking behavior of a mormyrid fish, Gnathonemus petersii Günther (Mormyridae, Teleostei): the role of vision, and the passive and active electrosenses. *Brain Behav. Evol.* 59, 211-221. doi:10.1159/000064908
- Rowan, W. (1925). Relation of light to bird migration and developmental changes. Nature 115, 494-495. doi:10.1038/115494b0
- Sas, E. and Maler, L. (1986). Retinofugal projections in a weakly electric gymnotid fish (*Apteronotus leptorhynchus*). *Neuroscience* 18, 247-259. doi:10.1016/0306-4522(86)90191-0
- Schumacher, S., Burt De Perera, T. and Von Der Emde, G. (2017a). Electrosensory capture during multisensory discrimination of nearby objects in the weakly electric fish *Gnathonemus petersii*. Sci. Rep. 7, 43665. doi:10.1038/ s41598-016-0028-x
- Schumacher, S., Von Der Emde, G. and De Perera, T. B. (2017b). Sensory influence on navigation in the weakly electric fish *Gnathonemus petersii*. *Anim. Behav.* **132**, 1-12. doi:10.1016/j.anbehav.2017.07.016
- Schuster, S. and Amtsfeld, S. (2002). Template-matching describes visual patternrecognition tasks in the weakly electric fish *Gnathonemus petersii*. J. Exp. Biol. 205, 549-557. doi:10.1242/jeb.205.4.549
- Silva, A., Perrone, R. and Macadar, O. (2007). Environmental, seasonal, and social modulations of basal activity in a weakly electric fish. *Physiol. Behav.* **90**, 525-536. doi:10.1016/j.physbeh.2006.11.003
- Spallanzani, M. (1798). V. Observations on the organs of vision in bats. *Philos. Mag.* 1, 134-136. doi:10.1080/14786447808676810
- Stoddard, P. K., Markham, M. R., Salazar, V. L. and Allee, S. (2007). Circadian rhythms in electric waveform structure and rate in the electric fish *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. *Physiol. Behav.* **90**, 11-20. doi:10.1016/j. physbeh.2006.08.013
- Teschke, M., Kawaguchi, S. and Meyer, B. (2008). Effects of simulated light regimes on maturity and body composition of Antarctic krill, *Euphausia superba. Mar. Biol.* **154**, 315-324. doi:10.1007/s00227-008-0925-z
- Théry, M., Pincebourde, S. and Feer, F. (2008). Dusk light environment optimizes visual perception of con-specifics in a crepuscular horned beetle. *Behav. Ecol.* 19, 627-634. doi:10.1093/beheco/arn024

- Tucker, H. A., Petitclerc, D. and Zinn, S. A. (1984). The influence of photoperiod on body weight gain, body composition, nutrient intake and hormone secretion. *J. Anim. Sci.* 59, 1610-1620. doi:10.2527/jas1984.5961610x
- Uyanik, I., Stamper, S. A., Cowan, N. J. and Fortune, E. S. (2019). Sensory cues modulate smooth pursuit and active sensing movements. *Front. Behav. Neurosci.* 13, 59. doi:10.3389/fnbeh.2019.00059
- Waddell, J. C. and Caputi, A. A. (2020a). Waveform discrimination in a pair of pulse-generating electric fishes. J. Fish Biol. 96, 1065-1071. doi:10.1111/jfb. 14298
- Waddell, J. C. and Caputi, A. A. (2020b). Electrocommunication in pulse Gymnotiformes: the role of electric organ discharge (EOD) time course in species identification. J. Exp. Biol. 223:jeb226340. doi:10.1242/jeb.226340
- Waddell, J. C. and Caputi, A. A. (2021). The captivating effect of electric organ discharges: species, sex and orientation are embedded in every single received image. J. Exp. Biol. 224, jeb243008. doi:10.1242/jeb.243008
- Waddell, J. C. and Crampton, W. G. (2020). Environmental correlates of circannual breeding periodicity in a multi-species assemblage of Amazonian electric fishes. *Environ. Biol. Fishes* **103**, 233-250. doi:10.1007/s10641-020-00950-3
- Waddell, J. C., Njeru, S. M., Akhiyat, Y. M., Schachner, B. I., Correa-Roldán, E. V. and Crampton, W. G. R. (2019). Reproductive life-history strategies in a speciesrich assemblage of Amazonian electric fishes. *PLoS One* 14, e0226095. doi:10. 1371/journal.pone.0226095
- Webb, A. R. and Holick, M. F. (1988). The role of sunlight in the cutaneous production of vitamin D3. *Annu. Rev. Nutr.* 8, 375-399. doi:10.1146/annurev.nu. 08.070188.002111
- Wong, C. J. (1997). Connections of the basal forebrain of the weakly electric fish, Eigenmannia virescens. J. Comp. Neurol. 389, 49-64. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19971208)389:1<49::AID-CNE4>3.0.CO;2-E
- Zweifel, N. O. and Hartmann, M. J. (2020). Defining "active sensing" through an analysis of sensing energetics: homeoactive and alloactive sensing. *J. Neurophysiol.* **124**, 40-48. doi:10.1152/jn.00608.2019