



Unidad Bases Neurales de la Conducta, Depto. Neurofisiología
Celular y Molecular, IIBCE.

Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Ciencias. UdelaR.

Tesina de Grado de la Licenciatura en Bioquímica

“Diagnóstico y análisis del ritmo circadiano de la
conducta eléctrica en el pez eléctrico autóctono,
Gymnotus omarorum”

María Victoria Moreno

Orientadora: Dra. Ana Silva, Profesora Agregada, Laboratorio de
Neurociencias, Facultad de Ciencias

Co-orientadora: MSc. Adriana Migliaro, Asistente, Laboratorio de
Neurociencias, Facultad de Ciencias

SETIEMBRE, 2016

RESUMEN

Gymnotus omarorum es un pez nocturno que habita en aguas dulces uruguayas. Emite constantemente una señal eléctrica débil producida por la descarga de un órgano especializado (descarga del órgano eléctrico, DOE). Esta emisión es parte de un sistema sensorial que cumple funciones perceptuales y comunicativas. La DOE es modulada por influencias ambientales, sociales y cognitivas, y su frecuencia de emisión está bajo el control de un núcleo marcapasos ubicado en el bulbo raquídeo. En el laboratorio esta especie presenta un aumento nocturno en la frecuencia basal de la DOE (FB-DOE) junto con un aumento en la actividad locomotora, propia de la fase de actividad.

Se registró el comportamiento eléctrico en la naturaleza para evaluar la influencia de los cambios circadianos ambientales como el fotoperiodo y la temperatura sobre FB-DOE. Los peces fueron colocados en redes amplias que permitían sus movimientos bajo la vegetación natural durante 72hs. Encontramos un fuerte aumento de la FB-DOE cerca de la puesta del sol con una disminución gradual durante la noche. En forma interesante, este incremento se produjo aún en ausencia de cambios de luminosidad ambiental, ya que los peces se encuentran en oscuridad constante en sus refugios vegetales naturales. Para conocer el comportamiento de los peces durante la noche realizamos un experimento en condiciones seminaturales en un tanque de 500 l con 12 refugios. Los peces utilizaron los refugios en mayor proporción durante el día, indicando que aumentan su actividad exploratoria durante la noche. Con el fin de determinar si el aumento nocturno de la FB-DOE es un fenómeno secundario al aumento nocturno de la actividad locomotora o independiente de la misma, se ideó un procedimiento para registrar la FB-DOE de individuos aislados sólo si los animales estaban inmóviles en el interior de refugios individuales. Esta manipulación nos permitió comprobar que el aumento nocturno de la FB-DOE es independiente de la actividad locomotora. Este aumento nocturno mantiene la misma dinámica que el registrado en condiciones naturales indicando la existencia de un robusto ritmo circadiano de la conducta eléctrica.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar les quiero agradecer a mis tutoras, Ana Silva y Adriana Migliaro, por acompañarme incondicionalmente en este proceso, por apoyarme en lo académico y en lo personal; gracias por su cálido y genuino tiempo.

A todos mis compañeros del laboratorio Unidad Bases Neurales de la Conducta, gracias por el trabajo y las horas compartidas. Laura, Paula, Rose, Ceci, Fede, Lucía y Paul han hecho muy enriquecedor este paso por mi tesina.

A mi familia y amigos, los que me han ayudado en lo profesional y en lo personal. Gracias por confiar en mi por darme el apoyo que necesito. A todos los que me dedicaron horas a mi o a mi hijo para que esto sea posible.

A mi madre, sin su apoyo esto no hubiera sido posible (si mamá, ya entregué la tesis).

A Martin, por sacarme una sonrisa cada vez q lo necesito por cada abrazo y por acompañarme en la vida.

Y muy especialmente se lo quiero dedicar a mi hijo, quien me acompañó en la pancita durante este proceso, gracias por darme el impulso que me faltaba.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
2	HIPÓTESIS	6
3	OBJETIVO GENERAL	7
3.1	Objetivos específicos:	7
4	MATERIALES Y MÉTODOS	7
4.1	Colecta y mantenimiento de peces	7
4.2	Registros de las variaciones diarias de la DOE en <i>G. omarorum</i>	7
4.2.1	Registro en condiciones naturales	8
4.2.2	Registro en condiciones semi-naturales de peces en ambiente enriquecido.	8
4.2.3	Registro en condiciones semi-naturales en campo	9
4.3	Estadística.	10
5	RESULTADOS	10
5.1	Análisis de el aumento nocturno de la FB-DOE en la naturaleza y su relación con los parámetros ambientales	10
5.2	Análisis de la actividad locomotora.	12
5.3	Análisis de la dependencia del aumento nocturno de la FB-DOE con la actividad locomotora.	13
5.4	Analizar la sincronización del aumento nocturno de la FB-DOE con las variaciones diarias de luminosidad.	15
6	DISCUSIÓN	16
7	CONTRIBUCIONES Y PERSPECTIVAS	20
8	BIBLIOGRAFÍA	21

1 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Todos los seres vivos presentan variables que varían en el tiempo, muchas de las cuales son rítmicas. Los sistemas circadianos posibilitan la existencia de ritmos endógenos sincronizables con variables del entorno y esta capacidad de sincronización favorece la adaptación de los organismos a su medio. El conocimiento que tenemos de los sistemas circadianos en sus diversos niveles de organización es notable, y se está empezando a comprender cómo cada uno de estos niveles contribuye a la complejidad del sistema en su conjunto. En su mayor parte, estos análisis se han llevado a cabo utilizando organismos modelo en el laboratorio, pero para empezar a entender el significado adaptativo del reloj, se tiene que ampliar el alcance, estudiando diversas especies animales de diferentes grupos taxonómicos, que muestren diversos patrones de actividad en sus entornos naturales (TOMOTANI BM, 2012; KRONFELD-SCHOR N, 2013).

Los sistemas circadianos constan básicamente de un receptor y una vía aferente que transmite información del medio ambiente; un reloj circadiano primario, y vías eferentes a través de las cuales el oscilador regula y coordina la expresión de diferentes ritmos. Estos ritmos tienen un período de aproximadamente 24 horas, sincronizándose con el fotoperiodo, pero también persisten en ausencia claves ambientales. (GOLOMBEK, 2010).

El sistema circadiano comprende además, los diferentes componentes mediante los cuales la señal luminosa activa los fotorreceptores y se transforma en una señal nerviosa u hormonal cronometrada. La luz es percibida a través de sensores de luz específicos; a su vez, los relojes conducen a la producción de señales de salida. La melatonina es una de las señales principales transmitiendo información rítmica para el organismo. El patrón circadiano de la secreción de melatonina es muy conservado entre los vertebrados, la hormona es producida durante la noche en la glándula glándula pineal, presentando un pico nocturno de concentración sangre y líquido cefalorraquídeo. Sin embargo, la organización del sistema circadiano que controla el ritmo de la melatonina ha cambiado drásticamente durante la evolución de los vertebrados. En los mamíferos, la información fótica se percibe a través de los ojos y se transporta, a través de un tracto retino-hipotalámico (RHT), al núcleo

supraquiasmático (SCN) que es el reloj principal; a partir de ahí, una vía multisináptica conecta el SCN a la glándula pineal, la unidad de producción de melatonina. En insectos y otros vertebrados no mamíferos, el sistema circadiano está organizada como una red distribuída de relojes conectados entre si y con sus núcleos blanco mediante conexiones endócrinas y neurales (Fig. 1a).

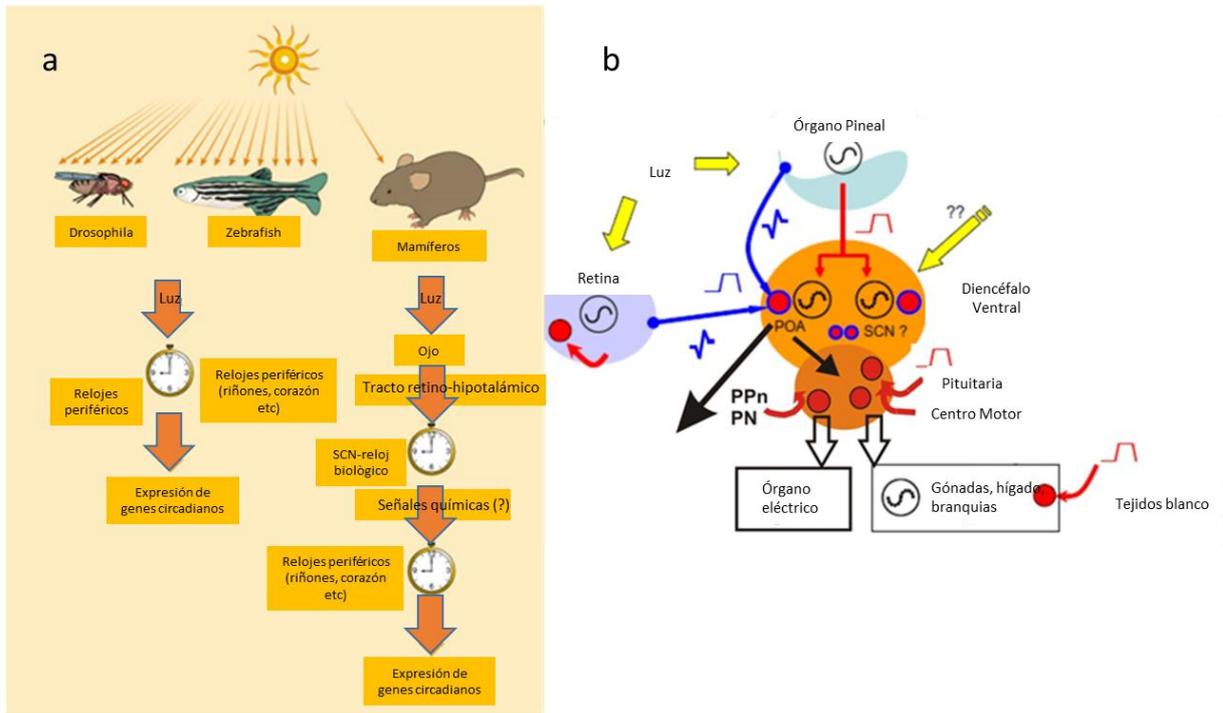


Fig. 1 Organización de sistemas circadianos en vertebrados. 1.a: Esquema que representa la complejidad de la red del sistema circadiano de vertebrados no-mamíferos (izquierda) y del sistema lineal en mamíferos (derecha). 1.b: Se muestra la red del sistema circadiano en teleósteos y su regulación. Con flechas amarillas se indica la incidencia de la luz. Flechas azules conexiones sinápticas. Flechas rojas conexiones químicas. Círculos rojos receptores de melatonina (modificado FALCON, 2010).

La caracterización del sistema circadiano en peces teleósteos se dificulta por la variabilidad propia de este grupo. En términos generales, los peces poseen relojes circadianos centrales y periféricos entre los que se destacan la retina y la glándula pineal, ambas secretoras de melatonina (Fig. 1b). El sistema circadiano está organizado como una red de unidades de oscilación sensibles a la luz, independientes e interconectados, que se encuentran en la retina, la glándula pineal, diencefalo ventral e incluso en órganos periféricos (FALCON, 2010).

Los Gymnotiformes son peces eléctricos sudamericanos de hábitos nocturnos que emiten continuamente descargas de baja intensidad. Estas descargas del órgano eléctrico (DOEs) forman parte de una refinada modalidad sensorial denominada electrorrecepción activa (Fig. 2) que permite al animal localizar objetos de conductividad eléctrica distinta de la del agua (LISSMANN, 1958). La DOE se repite con una frecuencia basal (FB-DOE) estable impuesta por un núcleo de comando bulbar (NEB). Este núcleo está formado por dos tipos de células: las neuronas marcapasos (MP) descargan espontáneamente y están acopladas electrotónicamente; las neuronas relé (R) descargan por la influencia de las marcapasos y proyectan a la médula espinal (CAPUTI A, CARLSON B, & MACADAR O, 2005). La descarga del NEB puede ser modulada por al menos dos núcleos superiores denominados núcleos premarcapasos: a) el complejo del núcleo central posterior tálamico y el núcleo premarcapaso (CP/PPN) (HEILIGENBERG W, 1981); y b) el núcleo sublemniscal (sPPN) (KAWASAKI M, 1988; KELLER CH, 1991). Un único comando del NEB activa el sistema espinal periférico responsable de la constancia de la forma de onda de cada DOE. En los gymnotiformes (con la excepción de la familia *Apteronoptidae*) el órgano eléctrico está formado por cientos de células especializadas de origen miogénico (electrocitos), inervados por electromotoneuronas espinales, en forma similar a las motoneuronas que inervan las fibras musculares esqueléticas. Las propiedades de membrana y el patrón de inervación- activación de los electrocitos determinan la forma de onda de la DOE, mientras que el tamaño y densidad de los electrocitos determinan su amplitud (CAPUTI A, CARLSON B, & MACADAR O, 2005).

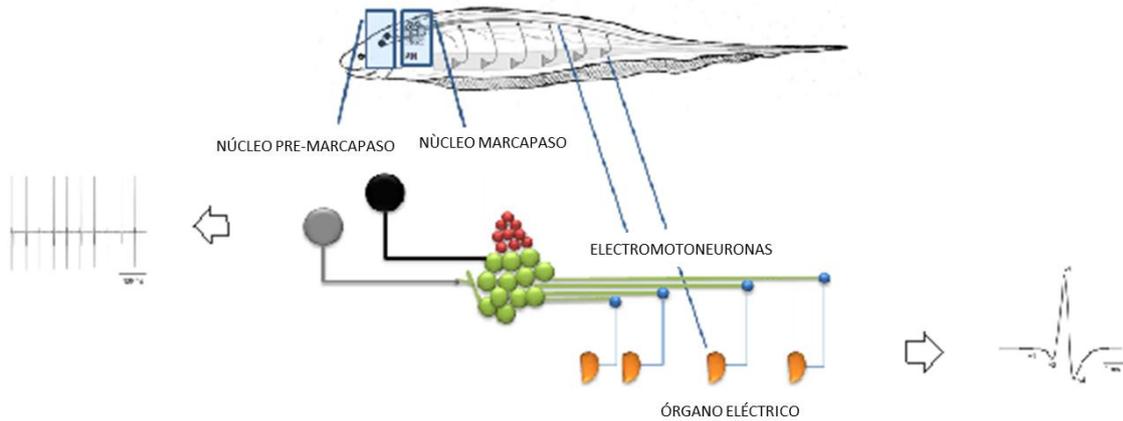


Fig.2 Sistema electrogenerador: La DOE se repite con una frecuencia basal (FB-DOE) estable impuesta por un núcleo de comando bulbar (NEB) compuesto por neuronas marcapaso y de relevo bulboespinales, las que activan electromotoneuronas espinales que finalmente inervan el órgano eléctrico periférico.

La FB-DOE depende de la especie y de factores perceptuales y sociales, siendo al mismo tiempo portadora de estímulos sensoriales para el propio pez y canal de comunicación entre coespecímenes. La conducta eléctrica (modulaciones de ritmo de la DOE), es un buen modelo para analizar el doble control social y circadiano ya que esta conducta presenta variaciones diarias y contexto social- dependientes, ambas probablemente sostenidas por modulaciones ejercidas a nivel del NEB (SILVA A. P., 2007a. PERRONE , 2010 PERRONE, 2014).

Gymnotus omarorum es una especie gymnotiforme de pulso distribuida en todo el Uruguay (RICHER-DE-FORGES M. M., 2009; SILVA A. Q., 2003). Es un pez altamente agresivo, solitario, territorial y con fidelidad al sitio (Lucía Zubizarreta comunicación personal). Es un reproductor estacional que despliega comportamiento agresivo dentro y fuera del período reproductivo (SILVA A. Q., 2003; BATISTA, 2012). Se ha observado que individuos aislados de *G. omarorum*, en condiciones de laboratorio con ciclos de luz controlados y a temperatura contante, presentan un aumento nocturno de la FB-DOE en la primer hora de la noche, el cual es dependiente de melatonina (Fig. 3a y 3b)(MIGLIARO A & SILVA A, 2016). Por otra parte se ha constatado un aumento nocturno de su actividad locomotora que coincide con la fase diaria de actividad (Fig. 3c) (SILVA et al, 2013).

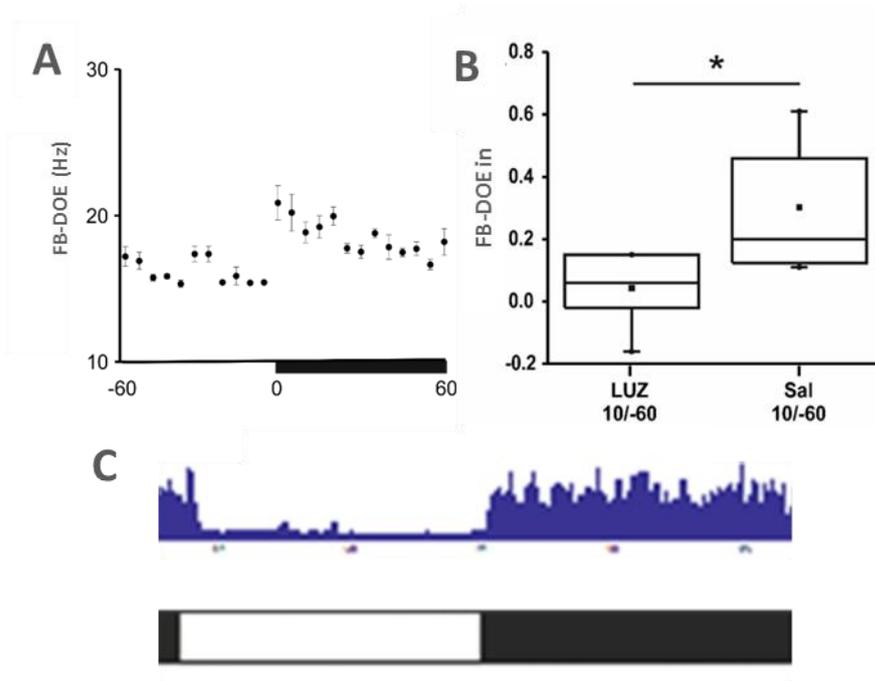


Fig. 3 (A) Aumento nocturno de la FB-DOE en un individuo aislado en la estación conductual al comienzo de la noche (barras blanca y negra señalan día y noche respectivamente). (B) Efecto de Luzindole (antagonista melatoninérgico) sobre el aumento nocturno de la FB-DOE (Modificado de Migliaro & Silva, 2016). (C) Variaciones en la actividad locomotora día-noche (barra blanca y negra respectivamente) (Modificado de Silva et al, 2013)

La modulación de la FB-DOE es un fenómeno complejo con múltiples factores. Esta conducta es influida por la temperatura ambiente de forma directamente proporcional e independiente de la hora del día. Esta relación presenta histéresis; es decir, para un mismo valor de temperatura la FB-DOE es mayor cuando la temperatura disminuye que cuando asciende (Fig. 4) (ARDANAZ JL, SiILVA A, & MACADAR O, 2001). Esta dependencia directa de la frecuencia basal con la temperatura ambiente debe tomarse en cuenta a la hora de analizar variaciones circadianas en un entorno en el cual la temperatura ambiente presenta ciclos de 24 hs. Es importante entonces corregir los valores registrados de forma tal de saber si las variaciones en la conducta eléctrica responden a un oscilador circadiano endógeno.

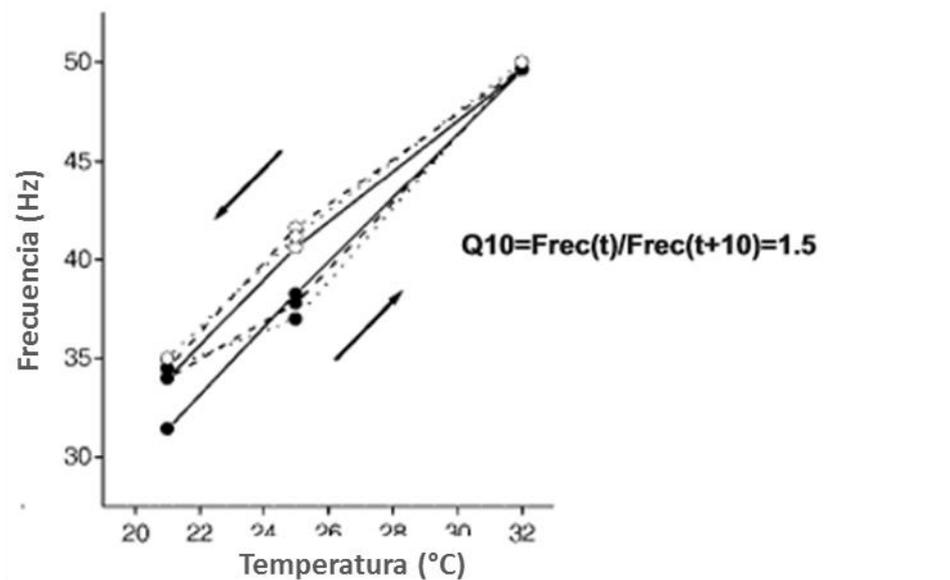


Fig. 4 Efectos del cambio de la temperatura sobre la FB-DOE. Valores obtenidos de un pez (representativo) durante tres ciclos de aumento y disminución de la temperatura del agua (21-32-21°C). Círculos sólidos: incremento en la temperatura. Círculos abiertos: disminución de temperatura (Ardanaz et al, 2001).

La estrategia utilizada en este trabajo permite detectar y analizar las variaciones circadianas de la conducta eléctrica en el entorno natural de *G. omarorum* y frente a las variables que naturalmente influyen en su sincronización.

2 HIPÓTESIS

El aumento nocturno de la frecuencia basal de la DOE de *Gymnotus omarorum* es un ritmo circadiano que ocurre en forma independiente de las variaciones de luminosidad y de la actividad locomotora.

3 OBJETIVO GENERAL:

Analizar los cambios circadianos de la FB-DOE y su relación con los parámetros ambientales y con la actividad locomotora.

3.1 *Objetivos específicos:*

- 3.1.1 Evaluar el aumento nocturno de la FB-DOE y su relación con los parámetros ambientales en la naturaleza.
- 3.1.2 Evidenciar el aumento nocturno de la actividad locomotora.
- 3.1.3 Evaluar si el aumento nocturno de la FB-DOE es dependiente de la actividad locomotora

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 *Colecta y mantenimiento de peces*

Se utilizaron ejemplares adultos (n=17) de *Gymnotus omarorum* (Richer des Forges et al 2009) en experimentos realizados en la naturaleza (Laguna del Sauce, Depto. de Maldonado (34° 48' S, 55° 18' W) y Laguna Pueblo Ansina, Depto. de Tacuarembó (32°1'S, 52°22'W) y en el Bioterio de animales poiquiloterms del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Los peces fueron detectados y colectados usando un detector de señales eléctricas que permite la pesca individual como ha sido descrito previamente (Silva et al. 2003). Los animales trasladados al laboratorio se alojaron en tanques exteriores de 500 l provistos de recintos individuales.

Todos los procedimientos realizados se guiaron por las normativas vigentes de cuidados de animales de experimentación y han sido aprobados por el CEUA del IIBCE (008/11).

4.2 *Registros de las variaciones diarias de la DOE en G. omarorum.*

4.2.1 Registro en condiciones naturales



Fig.5 Montaje experimental en condiciones naturales: Se muestran fotografías de la laguna del Sauce, lugar donde fue montada la estación experimental. También se visualiza en detalle la malla y detectores donde se colocó al pez.

Se realizaron registros de la actividad eléctrica de *G. omarorum* ($n = 6$) en campo, Laguna del Sauce ($34^{\circ} 48' S$, $55^{\circ} 18' W$). Los individuos fueron ubicados, recolectados y colocados en amplias bolsas de red equipadas con un par de electrodos para el registro de la de la DOE de cada individuo durante 72 horas cada 1 hora (Fig.5). Si bien en estas condiciones los animales no están restringidos en sus movimientos la capacidad de explorar se encuentra muy limitada. Los datos obtenidos se procesaron mediante software desarrollado *ad hoc*.

4.2.2 Registro en condiciones semi-naturales de peces en ambiente enriquecido.

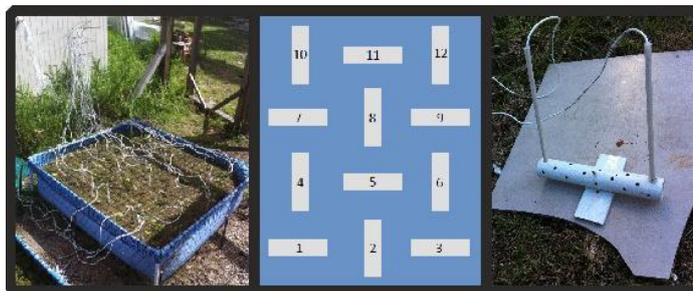


Fig. 6 Montaje seminatural con ambiente enriquecido: A la izquierda se puede visualizar el tanque de 500 l cubierto de plantas acuáticas. La imagen del medio muestra la distribución de los refugios en el interior del tanque. A la derecha se observa el refugio con los dos electrodos.

Los experimentos se llevaron a cabo en el Bioterio de Poiquiloterms del IIBCE con individuos aislados ($n = 6$) en un tanque exterior de 500 l cubierto de plantas

acuáticas flotantes provenientes del hábitat natural. El tanque contenía 12 refugios (tubo de PVC de 25 cm de largo) distribuidos simétricamente. Cada refugio estaba equipado con dos electrodos para permitir el registro de la DOE (Fig. 6), por lo que la DOE podía registrarse sólo si el individuo se encontraba en uno de los 12 refugios durante el muestreo. Las señales eléctricas de cada individuo fueron capturadas cada 30 min durante 24 horas para su posterior análisis. En cada muestreo, si el pez no se encontraba en ninguno de los refugios, se interpretó que se encontraba desplegando actividad locomotora de exploración.

4.2.3 Registro en condiciones semi-naturales en campo



Fig. 7 Montaje de experimento semi-natural en campo: La imagen muestra el tanque con el refugio en el interior y plantas acuáticas en la superficie y su disposición en la Laguna de Tacuarembó.

Los experimentos se llevaron a cabo con individuos aislados ($n = 5$) ubicados en tanques individuales de 60 l en su hábitat natural (Laguna Pueblo Ansina, $32^{\circ}1'S$, $52^{\circ}22'W$, Depto. de Tacuarembó) (Fig. 7). Cada tanque contenía un refugio (tubo de PVC de 25 cm de largo) equipado para permitir el registro de la DOE sólo si el pez se encontraba refugiado e inmóvil. Las señales eléctricas de cada individuo fueron capturadas durante 1 minuto cada una hora durante 24 horas, para su posterior análisis.

En todos los experimentos descriptos, se realizaron medidas periódicas (cada 30 minutos) de luminosidad y temperatura del agua mediante la colocación de un dispositivo (HOBO-MicroDAQ-modelo: UA-002-08) en cercanía de la ubicación de los peces en estudio. La temperatura y luminosidad ambiente exterior también se midió periódicamente utilizando un segundo dispositivo HOBO en cada experimento.

4.3 *Análisis de datos y estadístico.*

Las medidas de FB-DOE en las condiciones natural y seminatural se procesaron con el objetivo de conocer la variación de la conducta eléctrica en función del tiempo. En cada caso la actividad eléctrica se registró durante 10 segundos cada hora, utilizándose la frecuencia media de cada registro como valor promedio de la FB-DOE en cada hora. Para contrarrestar el efecto directo de la temperatura sobre la frecuencia de la DOE se calcularon las frecuencias correspondientes para una temperatura constante de 20°C utilizando el valor Q10 en la siguiente función:

$$Q10 = \text{Frec}(t) / \text{Frec}(t+10) = 1.5$$

Debido a que los datos no se distribuyen normalmente, se realizaron análisis utilizando el test de Wilcoxon, test estadístico no paramétrico para medidas apareadas. Por esta razón, los datos se expresan como mediana \pm desviación absoluta media (MAD) y se representan en las figuras utilizando gráfico de barras para una mejor visualización de los datos.

Con el fin de analizar la ritmicidad circadiana del aumento de nocturno de la FB-DOE se realizó el análisis de cosinor, el cual consiste en ajustar una función coseno a los datos de frecuencia en función del tiempo. De este análisis se extrajeron los valores de acrofase de cada individuo, en ambas condiciones de registro. La acrofase es la fase del ciclo en la cual se alcanza el máximo de FB-DOE tomando en cuenta todos los días registrados. Los valores de acrofases individuales (tomados en horas reloj) se analizaron estadísticamente mediante el test Rayleigh para cada condición (Refinetti et al, 2007).

5 RESULTADOS

5.1 *Análisis del aumento nocturno de la FB-DOE en la naturaleza y su relación con los parámetros ambientales*

Se registró la FB-DOE de individuos (n=6) en la Laguna del Sauce durante 72 horas cada una hora y la temperatura y luminosidad dentro y fuera del agua. Como se

muestra en la Fig. 8 se observó un aumento nocturno de la FB-DOE en todos los individuos cuyo máximo ocurre próximo al anochecer y con un posterior decaimiento de la frecuencia durante la noche. Se corrigieron los datos de las FB-DOE según la temperatura del agua poniendo en evidencia que este aumento no es producto del efecto inmediato de la temperatura sobre la frecuencia de la DOE. Los datos de luminosidad obtenidos en el interior de la laguna no mostraron variaciones a lo largo del día poniendo en evidencia que estos animales se encuentran en oscuridad constante.

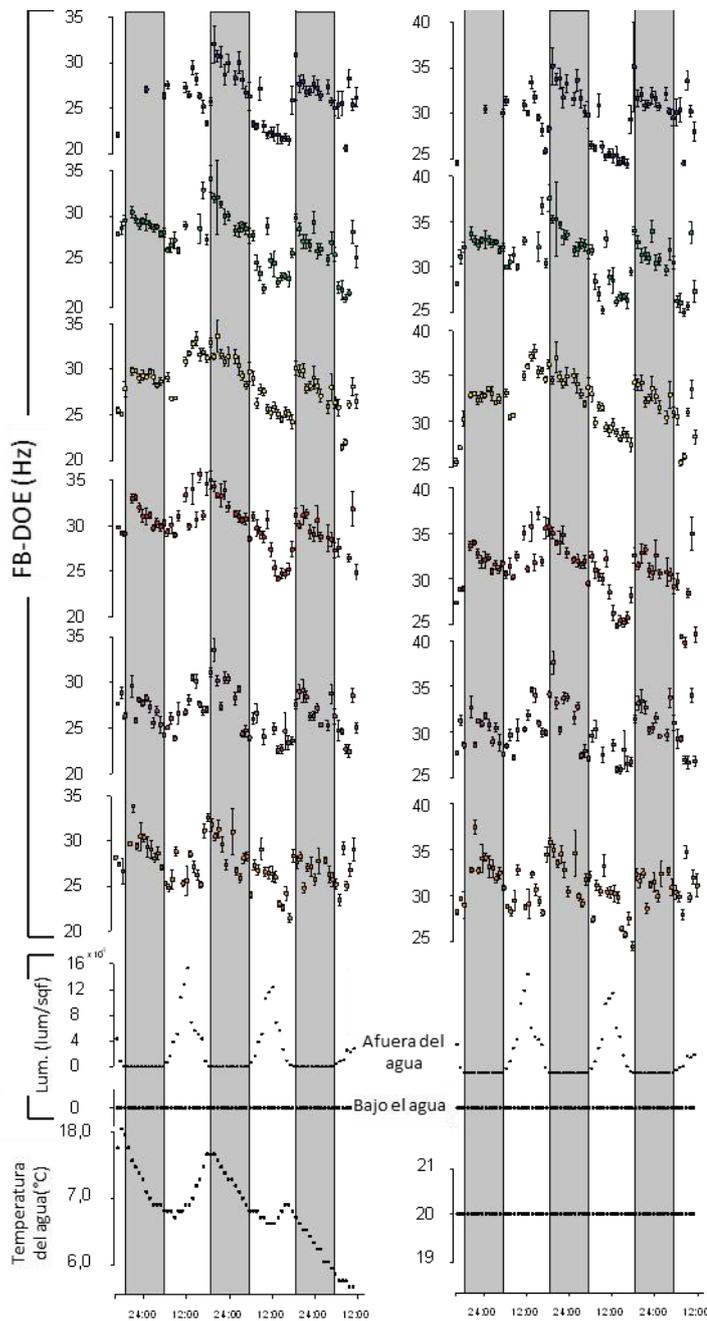


Fig. 8. FB-DOE de individuos en condiciones naturales. La columna de la izquierda muestra en los 6 registros superiores, el aumento de la FB-DOE coincidiendo con las primeras horas de la noche. Los tres registros inferiores corresponden (en orden descendente) a las medidas de luminosidad fuera y dentro del agua y a las variaciones de temperatura dentro del agua. La columna de la derecha muestra las variaciones de la FB-DOE corregidas para una temperatura constante de 20°C.

Con el objetivo de analizar el incremento nocturno de la FB-DOE se comparan los valores registrados al atardecer, con los de la hora previa (-60/At). Se observó que la FB-DOE al atardecer es significativamente mayor que 60 minutos antes (Fig. 9) (Wilcoxon, $p=0.02$).

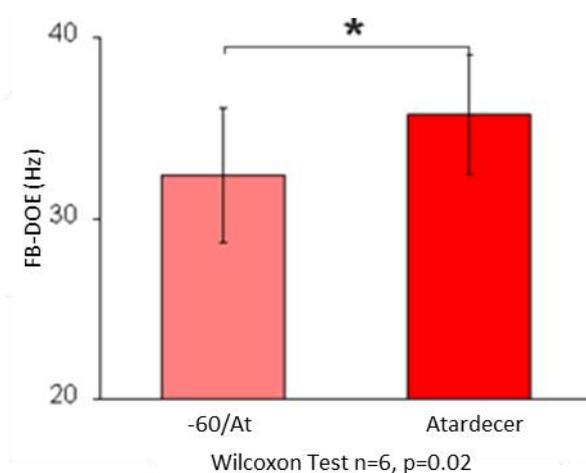


Fig. 9. FB-DOE antes y después del anochecer en condiciones naturales. Gráfico de barras que muestra la FB-DOE (mediana MAD) del segundo día en individuos aislados en condiciones naturales. La barra de la izquierda muestra la FB-DOE 60 minutos antes del atardecer y a la derecha la FB-DOE al atardecer. Se evidencia un aumento significativo de la FB-DOE en el atardecer ($p=0.02$).

5.2 Análisis de las variaciones diarias en la actividad exploratoria.

Con el objetivo de conocer si la actividad exploratoria está asociada a una fase particular del fotoperíodo se registró la presencia de individuos aislados en alguno de los 12 refugios disponibles en un tanque exterior de 500 l. Como se muestra en el histograma de la Fig. 10, los peces se encontraron mayormente refugiados durante el día, y mayormente fuera de los refugios durante la noche, y por lo tanto desplegando actividad locomotora nocturna. En conjunto, el hallazgo de peces

refugiados durante el día fue significativamente superior que durante la noche (Wilcoxon, $p=0.03$).

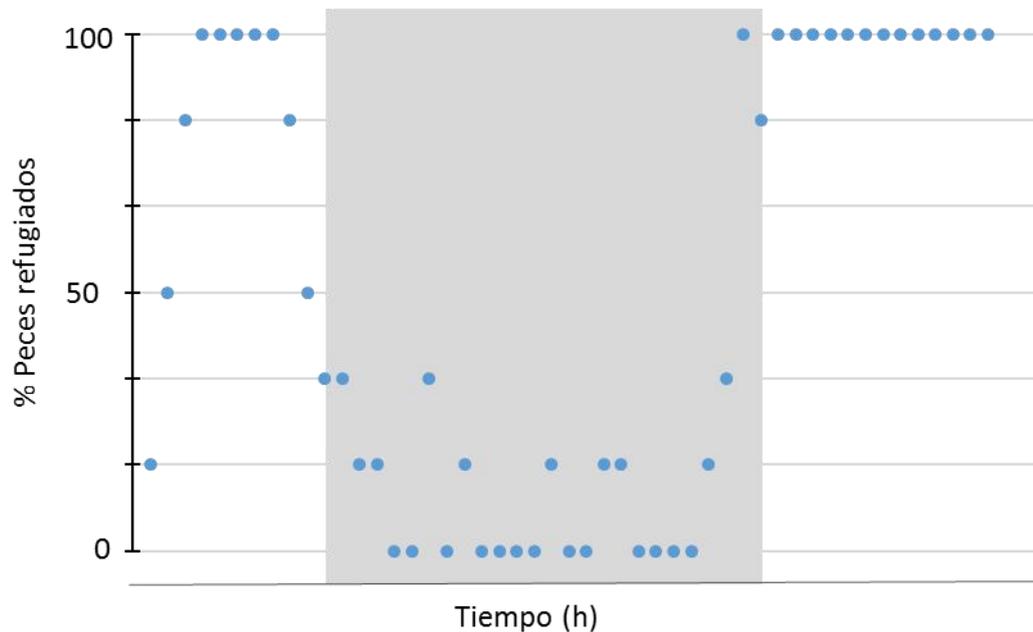


Fig. 10. Histograma de la actividad locomotora: porcentaje de peces ocupando refugios a lo largo de las 24 horas de registro. El sombreado gris indica el período de nocturnidad.

5.3 Análisis de la dependencia del aumento nocturno de la FB-DOE con la actividad locomotora.

Se registró la FB-DOE de individuos inmóviles ($n=5$), no restringidos, en la Laguna Pueblo Ansina durante 24 hs. Como se muestra en la Fig. 11, se observó un aumento nocturno de la FB-DOE en todos los individuos con los picos de frecuencia en el anochecer y con un posterior decaimiento de la frecuencia durante la noche. Se calcularon los valores de FB-DOE para una temperatura constante de 20°C en forma similar a lo realizado con los datos obtenidos en la condición natural. Los datos muestran que el aumento nocturno de la FB-DOE persiste con la corrección de temperatura y en animales que no se encuentran desplegando actividad locomotora.

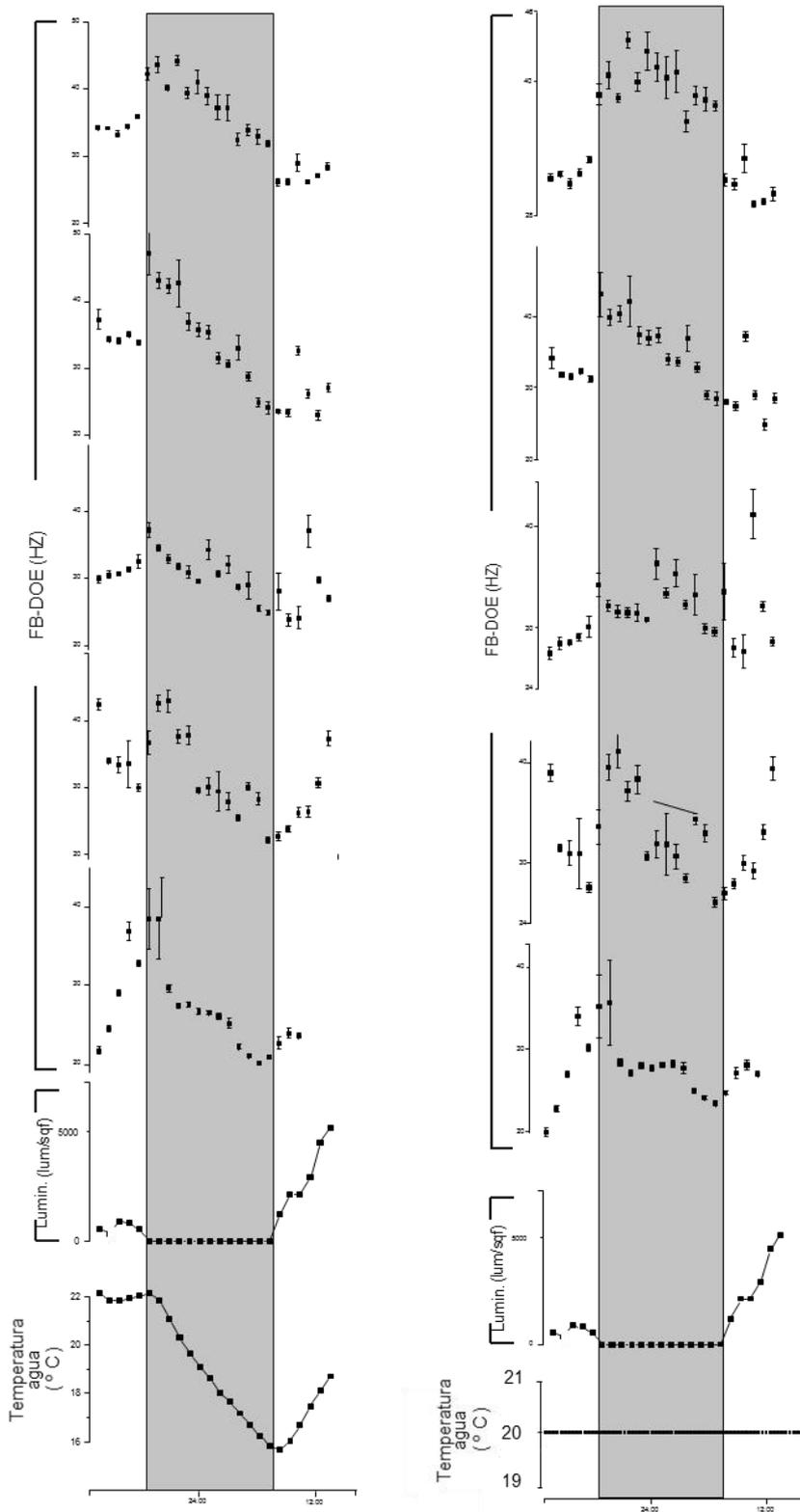


Fig. 11. FB-DOE de peces en condiciones semi-naturales en campo. La primera columna de la figura muestra el aumento nocturno de la FB-DOE de individuos aislados inmóviles en condiciones semi-naturales. Los dos registros inferiores muestran las medidas de luz y temperatura. La columna de la derecha muestra las variaciones de la FB-DOE con la temperatura corregida a 20°C.

Con el objetivo de analizar el incremento nocturno de la FB-DOE en estas condiciones, se compara la FB-DOE una hora antes del atardecer (-60/At) y al atardecer. Se observa que la FB-DOE al atardecer es significativamente mayor (Wilcoxon, $p=0.04$) que una hora antes (Fig. 12)..

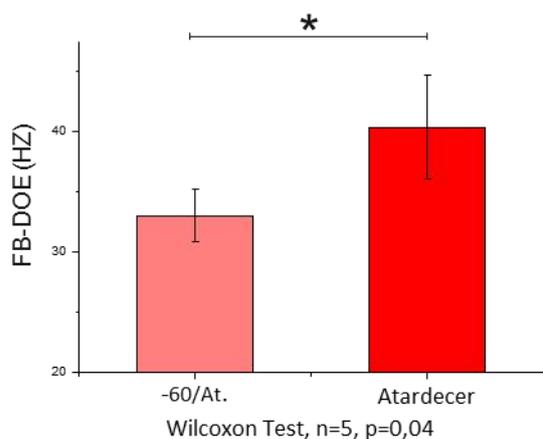


Fig. 12. FB-DOE antes y después del anochecer de semi-natural en campo. Gráfico de barras que muestra la mediana de la FB-DOE en individuos aislados en condiciones naturales. La barra de la izquierda la FB-DOE 60 minutos antes del atardecer y a la derecha la FB-DOE al atardecer. Se evidencia un aumento significativo de la FB-DOE al anochecer ($p=0.04$)

5.4 Análisis de la influencia de las variaciones de luminosidad ambiente sobre el aumento nocturno de la FB-DOE.

Las condiciones de luminosidad de las situaciones experimentales presentadas en las Figs. 8 (natural) y 11 (semi-natural) fueron diferentes. En el hábitat natural los animales se encuentran en oscuridad constante, mientras que en la condición seminatural se registran cambios en la luminosidad ambiente variando de 0 a 5000 lum/sqf aproximadamente. Esto permite evaluar el rol de la clave ambiental lumínica sobre la sincronización del ritmo circadiano de la FB-DOE como se muestra en la Fig. 13. Se calcularon, para cada individuo, las acrofases en hora reloj, es decir la hora del día en que el valor de la FB-DOE es máxima. Estos datos permiten el cálculo estadístico de Raighley. El gráfico circular representa el ciclo de 24 hs y se señalan las acrofases individuales y la acrofase promedio para cada grupo. En la condición natural la FB-DOE aumenta hacia la noche teniendo un

máximo disperso entre individuos durante la segunda y tercera hora de la noche subjetiva (20-21 hs) y correspondiéndose con el pico de temperatura (Fig. 13a). La acrofase promedio en estas condiciones es de 20:41 hs ($r=0.988$; $p=0.002$) y los individuos muestran una alta sincronización. En la condición seminatural la FB-DOE también aumenta en las primeras horas de la noche, teniendo un máximo más disperso entre individuos, aunque sin variaciones en su valor promedio (rango de acrofases individuales: 19-24 hs, Fig. 12b). La acrofase promedio es de 21:12 ($r=0.902$; $p=0.009$).

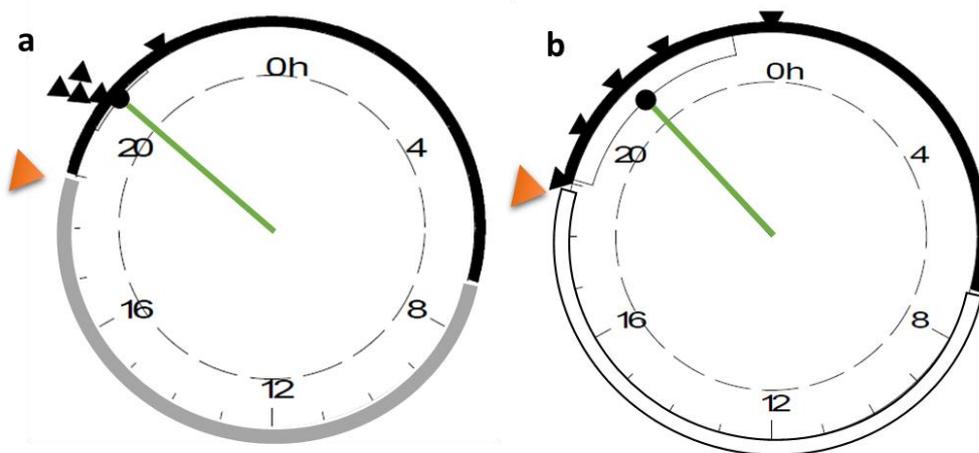


Fig. 12. Máxima frecuencia y su relación con la luminosidad: Los gráficos circulares representan las 24 horas en donde se registran con una marca (triángulo negro) las horas de máxima frecuencia y se marcan con línea verde el promedio de las acrofases. Con Triángulo naranja se indica el pico de temperatura promedio. (a) Condición natural en oscuridad constante. (b) Condición semi-natural con variaciones diarias de luminosidad.

6 DISCUSIÓN

En el presente trabajo nos planteamos la hipótesis de la existencia de un ritmo circadiano de aumento nocturno de la FB-DOE, el cual es independiente de la actividad locomotora desplegada en la noche, así como de las influencias de los cambios en la luminosidad ambiental.

Del análisis de los resultados presentados surge que:

- Los animales en su hábitat natural muestran una variación circadiana de la FB-DOE con valores máximos que ocurren en las primeras horas de la noche.

-Estas variaciones ocurren en oscuridad constante ya que bajo la vegetación no se registran las variaciones en luminosidad ambiental del fotoperíodo.

-Existe un aumento nocturno de la actividad exploratoria como se evidencia por las diferencias día/noche en la conducta de refugio, en individuos aislados colocados en un ambiente enriquecido.

-El aumento nocturno de la FB-DOE es independiente de la actividad locomotora ya que persiste en individuos en reposo.

En conjunto, los resultados sugieren fuertemente que el aumento nocturno de la FB-DOE constituye un ritmo circadiano, confirmando la hipótesis planteada.

Una vez aceptada la naturaleza periódica de un comportamiento, resta por determinarse su carácter endógeno. La prueba definitiva del carácter endógeno se realiza bajo condiciones controladas de temperatura y luminosidad en individuos aislados y en reposo (Golombek, 2010) permitiendo el diagnóstico de un verdadero ritmo circadiano. Los antecedentes nos señalan que *G. omarorum* aislado en condiciones de temperatura constante, presenta un aumento nocturno de la FB-DOE cuando se simula el atardecer (Migliaro et al, 2016) y que este aumento es melatonina dependiente. También se ha visto que el aumento nocturno de la FB-DOE en esta especie persiste en registros prolongados bajo condiciones controladas de ciclo luz oscuridad (LD, DD) (A. Migliaro comunicación personal).

Analizando la FB-DOE de *G. omarorum* en su hábitat natural pudimos ver que ésta presenta variaciones diarias. Como se muestra en la Fig. 8, en todos los individuos se puede observar un aumento nocturno de la FB-DOE, que se instala en forma brusca alrededor del anochecer, progresa durante el comienzo de la noche y disminuye gradualmente hacia el amanecer. Es importante destacar que estas variaciones diarias de la FB-DOE ocurren en ausencia de variaciones diarias de luminosidad, ya que los peces en sus refugios naturales se encuentran en oscuridad constante. Es decir, en el hábitat natural se ha confirmado que el principal sincronizador de los ritmos circadianos, la variación diaria de luminosidad, no sería en este caso el parámetro ambiental sincronizador. Esto es una evidencia importante para diagnosticar que las variaciones diarias de la FB-DOE constituyen un verdadero ritmo circadiano al estar en la naturaleza en curso libre de iluminación. Aunque los animales en sus refugios estén en oscuridad

constante, es importante señalar que los peces en su hábitat natural en libertad de movimiento podrían acceder a información lumínica variable en sus exploraciones en agua libre.

Si las variaciones diarias de luz no son el sincronizador ambiental de los ritmos circadianos en la naturaleza, se impone detectar qué otra variable ambiental presente en el hábitat natural de esta especie podría actuar de sincronizador circadiano. Estos datos sugieren que las variaciones diarias de temperatura podrían ser las claves del medio ambiente para sincronizar las variaciones diarias de FB-DOE en el medio natural. La temperatura del agua muestra variaciones diarias con un pico próximo al anochecer. Al analizar los datos de frecuencia y temperatura podemos observar que los máximos de temperatura anticipan a los máximos de FB-DOE tanto en condiciones naturales como semi-naturales (Fig. 12). Contrariamente a la correlación positiva entre temperatura y FB-DOE (Silva et al. 2007; Fig. 2), el aumento nocturno de la FB-DOE ocurre en la fase de descenso de la temperatura ambiental (Fig. 8; Fig. 10). Por tanto, después de compensar los efectos directos de la temperatura sobre la FB-DOE, las variaciones diarias de frecuencia son aún más notorias (comparación A-B en Fig. 8 y Fig. 10). De todas maneras, es interesante señalar que la segunda noche del experimento natural, en la que se registró la variación de temperatura más extrema, el aumento nocturno de la FB-DOE fue mayor que en las otras noches.

Como parte de un sistema sensorial activo, en el que la DOE aporta la energía portadora del estímulo, la FB-DOE es un determinante de la cantidad de información que el sistema nervioso recibe de su entorno por unidad de tiempo (Aguilera et al., 2001; Post y von der Emde; 1999; Caputi et al, 2003). Toda situación comportamental que requiera una mayor resolución perceptual, se acompañará de un aumento de la frecuencia de descarga. Es, por tanto, importante discriminar si el aumento nocturno de la FB-DOE registrado en condiciones naturales es o no consecuencia del aumento de la actividad locomotora que también debería aumentar en la noche en un animal nocturno. Los registros realizados en el ambiente natural impiden detectar la actividad exploratoria ya que los animales, a pesar de estar en libre movimiento, se encuentran restringidos a las amplias mallas que los alojaban. Analizando la conducta de peces solitarios en

condiciones semi-naturales en un ambiente enriquecido para explorar, pudimos ver como los individuos aumentan su conducta exploratoria durante la noche. En la figura 11 se ve claramente que el 100% de los peces se encontraban refugiados durante la mayor parte del día y que abandonan los refugios en la noche. Estos datos, que confirman la nocturnidad de la especie en cuanto a sus patrones locomotores, obligan a verificar si el aumento nocturno de la FB-DOE es sólo consecuencia del aumento nocturno de la actividad locomotora. Los peces registrados en la Laguna de Villa Ansina (Tacuarembó) se registraron en tanques pequeños con un refugio provisto de electrodos. Posiblemente debido al tamaño reducido del tanque los peces se encontraron refugiados la mayor parte del tiempo, independientemente del momento del día. Los datos de frecuencia analizados fueron registrados con peces refugiados y por lo tanto inmóviles. En estas condiciones también se registraron diarias de FB-DOE caracterizadas por un clero aumento nocturno que decae hacia el amanecer. Esto nos permite afirmar que el aumento nocturno de la FB-DOE no es una consecuencia de la actividad locomotora.

En las condiciones naturales los máximos de FB-DOE ocurren aproximadamente en la primer y segunda hora de la noche, coincidiendo con el máximo de temperatura (Fig. 12a). Las acrofases individuales de esta población muestran una importante sincronización. En algunos de los individuos registrados en condiciones semi-naturales, se puede ver un adelantamiento en la hora de máxima frecuencia junto con una mayor dispersión en las acrofases individuales, aunque la acrofase promedio de la población no cambia respecto a la acrofase promedio de la condición natural (Fig. 12b). El mantenimiento de la acrofase promedio es un hecho a destacar. Los individuos registrados en condiciones semi-naturales cuentan con la clave ambiental del fotoperíodo, pero este importante sincronizador no modifica la acrofase promedio de esta población respecto a la registrada en condiciones de oscuridad constante. La dispersión de las acrofases individuales registrada en las condiciones seminaturales podría deberse a influencias de la manipulación y principalmente de la luz sobre el ritmo circadiano. Sin embargo vale la pena considerar otro factor de sincronización. Los peces del experimento en condiciones naturales fueron colocados en mallas dentro de la

laguna en contacto social con el resto de la población. Durante el registro de datos se pudo detectar la presencia de otros peces eléctricos en la cercanía de los refugios, mediante el registro de sus señales las cuales se registraban con menor amplitud y no permanecían en el registro. En cambio, los peces en condiciones semi- naturales colocados en tanques al borde de la laguna se encontraban aislados, sin contacto social. En ambos experimentos se encontró un aumento nocturno de la FB-DOE, lo que demuestra que su persistencia en cualquier entorno social. Sin embargo, la mayor sincronización observada en condiciones naturales podría atribuirse a una sincronización social que ya ha sido sugerida en otras especies silvestres (Fuchikawa,2016; Bovet, J. & Oertli,,1974).

7 CONTRIBUCIONES Y PERSPECTIVAS

Los resultados encontrados concuerdan con nuestra hipótesis de que el aumento nocturno de la FB-DOE de *G. omarorum* es un ritmo circadiano endógeno que ocurre en forma independiente de las variaciones de luminosidad y de la actividad locomotora. El trabajo aporta un enfoque novedoso y actual al estudiar el comportamiento eléctrico en el hábitat natural y deja abiertas importantes preguntas para abordar en el futuro.

Hoy en día se conoce la importancia estudiar a los individuos en su hábitat natural a la hora de conocer el rol del sistema nervioso en la generación de conductas relevantes para la adaptación a un entorno variable. Nosotros en particular hemos creado tres modelos de trabajo en los que los individuos pueden ser estudiados en condiciones naturales.

En estos estudios se ha demostrado por primera vez que los peces en su hábitat natural aumentan la frecuencia basal y que no tienen variaciones diarias del ciclo luz oscuridad, encontrándose en oscuridad constante, y que están sometidos a un ciclo diario de aumento y disminución de la temperatura del agua.

Este trabajo se acerca a comprobar el carácter endógeno del ritmo diario de la FB-DOE al persistir en condiciones de oscuridad constante en el ambiente natural. Sin embargo, impone su estudio cronobiológico tradicional en el laboratorio en condiciones controladas de iluminación y temperatura.

Habitualmente se menciona a *G. omarorum* como una especie nocturna, pero es en estos estudios que por primera vez se demuestra la diferencia día/noche en la actividad exploratoria.

Este trabajo fue presentado en forma de poster:

Moreno, MV.; Migliaro, A.; Silva, A. Non-locomotion dependent nocturnal increase in the electric behavior of the weakly electric fish, *Gymnotus omarorum*. International Congress of Neuroethology. Montevideo, 30 de marzo al 4 de abril de 2016.

Los datos presentados en este trabajo forman parte del artículo en preparación, a enviarse próximamente al Journal of Biological Rhythms.

Migliaro, A.; Moreno, MV.; Marchal, P.; Silva, A. Nocturnal increase of the EOD basal rate in the wild: environmental and behavioral influences.

8 BIBLIOGRAFÍA

ARDANAZ JL, SiILVA A, & MACADAR O. (2001). Temperature sensitivity of the electric organ discharge waveform in *Gymnotus carapo*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.*, 187(11):853-64.

BASTIAN J, & YUTHAS J. (1984). The jamming avoidance response Eigenmannia properties of a diencephalic link between sensory processing and motor output. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 154, 895-908.

BATISTA, G. Z. (2012). Non-sex-biased dominance in a sexually monomorphic electric fish: fight structure and submissive electric signalling. *Ethology*, 118, 398-410.

BOVET, J. & OERTLI, E.F. J. (1974) *Comp. Physiol.* 92: 1. doi:10.1007/BF00696522

BULLOCK T, H. C. (2005). Electric organs and their control. En *Electroreception* (págs. vol 21, pp 410-451). Springer New York.

CAPURRO A. (1994). Respuesta de novedad en *Gymnotus carapo*: La frecuencia de un oscilador biológico como.

CAPUTI A, CARLSON B, & MACADAR O. (2005). Electric organs and their control. In *Electroreception* (pp. 410-451) Springer New York.

-
- FALCON, J. M.-C. (2010). Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol*, 165, 469-82.
- FUCHIKAWA.T, EBAN-R0THSCHILD A, NAGARI M, SHEMESH Y & BLOCH G.(2016). Potent social synchronization can override photic entrainment of circadian rhythms. *NATURECOMMUNICATIONS*:11662 | DOI:10.1038/ncomms11662
- GOLOMBEK, D. (2007). Introducción. La máquina del tiempo, . En *Cronobiología Humana*. (págs. 19-36.).
- GOLOMBEK D, ROSENSTEIN R. (2010), *Physiol Circadian Entrain* (pp. 1063–1102)
- HEILIGENBERG W, F. T. (1981). Input to the medullary pacemaker nucleus in the weakly electric fish, *Eigenmannia* (Sternopygidae, gymnotiformes). *Brain Research*, 211, 418-423.
- KAWASAKI M, M. L. (1988). Anatomical and functional organization of the prepacemaker nucleus in gymnotiform electric fish: the accommodation of two behaviors in one nucleus. *J Comp Neurol*, 276, 113-131.
- KELLER CH, K. M. (1991). The control of pacemaker modulations for social communication in the weakly electric fish *Sternopygus*. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 169, 441-450.
- KRONFELD-SCHOR N, B. G. (2013). Animal clocks: When science meets nature. . *Proc Biol Sci* 280:20131354.
- LISSMANN, H. W. (1958). On the function and evolution of electric organs in fish. *J. Exp. Biol*, 35, 156-191.
- MIGLIARO A & SILVA A. (2016). Melatonin regulates daily variations in electric behavior arousal in two species of weakly electric fish with different social structure
- MIGLIARO A, & SILVA A. (2012). The role of AVT in the modulation of the circadian rhythmicity of EOD basal rate in South American weakly electric fish. *International Congress of Neuroethology, Maryland, USA*.
- MIRANDA M. (2007). Indirect evidence for a polygynous breeding system in the gymnotiform electric fish *Brachyhypopomus pinnicaudatus* in Uruguay. *Florida International University*.
- PERRONE R, BATISTA G, LORENZO D, MACADAR O, SILVA A (2010) Vasotocin actions on electric behavior: Interspecific, seasonal, and social context-dependent differences. *Front Behav Neurosci* 4.

-
- PERRONE R, MIGLIARO A, COMAS V, QUINTANA L, BORDE M, SILVA A (2014) Local vasotocin modulation of the pacemaker nucleus resembles distinct electric behaviors in two species of weakly electric fish. *J Physiol Paris* 108:203-212.
- REFINETTI R, CORNÉ LISSEN G. & HALBERG F. (2007). Procedures for numerical analysis of circadian rhythms. *Biol Rhythm Res*; 38(4):275-325
- RICHER-DE-FORGES M. M., C. W. (2009). *A new species of Gymnotus (Gymnotiformes, Gymnotidae) from Uruguay: Description of a model species in neurophysiological research.* . *Copeia*, 3.
- SILVA, A. P. (2007a.). Environmental, seasonal, and social modulations of basal activity in a weakly electric fish. . *Physiology & Behavior*, 90, 525-536.
- SILVA, A. Q. (2003). Biogeography and Breeding in Gymnotiformes from Uruguay. . *Environmental Biology of Fishes*, 66, 329-338.
- SILVA A, MIGLIARO A. & MARCHAL P.(2014). An integrative study of the circadian rhythmicity of electric behavior: from the field to the dish. International Society for Neuroscience Annual Meeting.
- TOMOTANI BM, F. D. (2012). Field and Laboratory Studies Provide Insights into the Meaning of Day-Time. Activity in a Subterranean Rodent, the Tuco-Tuco. *PLoS ONE* 7(5): e37918. doi:10.1371/journal.pone.0037918.
- WONG CJ. (1997). Connections of the basal forebrain of the weakly electric fish, *Eigenmannia virescens*. . *J Comp Neurol*, 389, 49-64.