



FACULTAD DE  
CIENCIAS  
UDELAR | [fcienc.edu.uy](http://fcienc.edu.uy)



Tesis para optar por el título de MSc en Biología

# La Temperatura como Sincronizador de Ritmos Conductuales Diarios

Lic. Juan I. Vázquez  
2025

Orientadoras:  
Adriana Migliaro, PhD  
Laura Quintana, PhD



Tesis de para optar por el título de:

MSc en Biología

PEDECIBA Biología

(Subárea Neurociencias)

2025

Laboratorio de ejecución:

Departamento de Neurofisiología Celular y Molecular, IIBCE

Tribunal:

Michel Borde, PhD (Presidente)

Ignacio Estevan, PhD (Vocal)

Sabrina Clavijo, PhD (Vocal)

## **Índice de Contenido**

0. Agradecimientos.....	4
1. Introducción.....	5
1.1. Ritmos diarios y circadianos.....	5
1.2. Los peces eléctricos como modelo de estudio.....	13
2. Hipótesis y objetivos.....	19
2.1. Hipótesis General:.....	19
2.2. Objetivo General:.....	19
2.3. Objetivos Específicos:.....	19
2.4. Aproximación Experimental.....	19
3. Materiales y métodos.....	21
3.1. Colecta y alojamiento de animales.....	21
3.2. Diseño experimental.....	21
3.3. Procesamiento y análisis de datos.....	23
4. Vínculo entre el ritmo diario de temperatura ambiental y la fDOE.....	31
4.1. Objetivos específicos.....	31
4.2. Resultados.....	31
4.3. Discusión.....	52
5. Descripción de los ritmos de actividad locomotora de <i>G. omarorum</i> :.....	58
5.1. Objetivos específicos.....	58
5.2. Resultados.....	58
5.3. Discusión.....	70
6. Reflexiones finales y perspectivas.....	73
7. Anexo: Material suplementario sobre variables ambientales.....	76
7.1. Descripción del termociclo de la temperatura del aire:.....	76
7.2. Periodicidad de la luz en las piscinas experimentales:.....	77
8. Anexo: Puesta a punto de la cuantificación de genes de la vía melatoninérgica vía qPCR.....	78
8.1. Objetivo específico.....	79
8.2. Materiales y métodos.....	79
8.3. Resultados.....	82
8.4. Discusión.....	86
9. Referencias.....	87

## 0. Agradecimientos

Quién quiera que diga que una tesis se escribe solo está equivocado. La ciencia, como toda buena empresa humana, se nutre del apoyo, del sostén y de la opinión de muchos otros y otras que lo vuelven posible. Además hacen todo muchísimo menos solitario. En mi caso, me gustaría agradecer a estas personas, sin las cuales nadie estaría leyendo esto ahora. Ahora saben con quién quejarse:

- **A mi padre y a mi madre.** Hay tantas maneras de, en el intento de apoyar a un hijo en su camino, marear, confundir y restar más que ayudar. De alguna manera, ustedes no cayeron en ninguna. Una constancia, un temple y un norte infinito para mí. Un amor absoluto.
- **A Adri y a Lau.** Decir que esta tesis no existiría sin ellas es un poco obvio, pero de haber sido ellas otras y yo el mismo esta tesis no existiría. Cuando pienso en qué me gusta de la ciencia y en porqué elegí este camino pienso en ustedes y en la suerte que tuve. Son la alquimia perfecta entre el amor, la curiosidad y el rigor. No podría haber pedido mejores maestras.
- **A la UBNC.** Yo quería estudiar pájaros y como nadie lo hacía termine estudiando peces. Que suerte tuve, porque así llegué a este laboratorio que hoy es más hogar que mi hogar. Así que gracias Wally, gracias Ceci, Lu y Roxi. Gracias por recibirme todas las mañanas con cariño, risas y el monto justo de abuso verbal. Gracias por escuchar cada uno de mis problemas y mirar cada una de mis figuras. Es muy bello trabajar con amigos tan queridos.
- **A Vale, a Sabri y a Anto.** No podría haber pedido mejores amigas para transitar estos últimos años. La academia es cruel y hay que saber elegir con quienes podemos darnos abrazos y también con quienes podemos gritar a la nada. Por suerte elegí bien.
- **A Mati.** Apareciste hacia el final, cuándo justo te necesitaba. No existe universo en el que hoy yo estuviera acá sin haberte conocido. Gracias.
- **A muchos otros,** que no quiero dejar de mencionar, pero está quedando larga la sección.

# 1. Introducción

## 1.1. Ritmos diarios y circadianos

*¿Qué son los ritmos diarios y circadianos?*

Todos los animales de este planeta, desde el protozoo más simple hasta mamíferos con más de treinta mil millones de células, deben enfrentarse a condiciones ambientales que ciclan drásticamente a varias escalas temporales. El verano da paso al invierno, la marea alta a la baja y, tal vez el caso más conspicuo de todos, el movimiento de rotación de la tierra determina la alternancia entre el día y la noche.

Este ciclo diario es acompañado por cambios en la temperatura ambiental, disponibilidad de alimentos y presencia de depredadores. Bajo la influencia de estos cambios, los individuos han de adaptar la mayoría de sus procesos biológicos como el metabolismo, el comportamiento y la expresión génica de forma cíclica, desarrollando patrones de oscilaciones diarias (Paranjpe y Sharma 2005).

Estos *ritmos diarios* podrían desarrollarse de forma reactiva, es decir en respuesta directa a las oscilaciones ambientales: los cambios en el ambiente podrían ser percibidos por los animales y esto desencadenaría cambios en sus procesos internos a modo de respuesta. Este mecanismo, aunque sencillo, presenta algunas dificultades. Adaptar la fisiología y el comportamiento es un proceso costoso y que suele implicar la regulación de varios procesos metabólicos y funcionales concatenados. Un mecanismo puramente reactivo hace que los sistemas comiencen a aprontarse (por ejemplo para la noche) en el momento que estos cambios ya tendrían que estar instalados. Es así que a lo largo de toda la escala evolutiva, desde cianobacterias (Cohen y Golden 2015) a plantas (Creux y Harmer 2019) y en todos los grupos de animales (Hamanaka y cols. 2024, Menaker y cols. 1997, Panda y cols. 2002, Refinetti 2010, Tosini y cols. 2000, Zhadanova y Reebbs 2005) observamos la presencia de *ritmos circadianos* que permiten a los individuos anticipar y prepararse para cambios predecibles en el ambiente.

Los ritmos circadianos son generados de forma endógena (Aschoff 1981a) por lo que no requieren de un estímulo externo para mantener un período constante. El ejemplo más claro es quizá de animales que continúan exhibiendo un ritmo diario en el comportamiento locomotor incluso

cuando se encuentran en condiciones de oscuridad constante (DD, de sus siglas en inglés *Darkness-Darkness*), lo que se conoce como ritmo de curso libre o *free-running* (Aschoff 1981b).

En la mayoría de los casos conocidos la fuente de la ritmicidad circadiana endógena es un mecanismo de oscilación celular compuesto de elementos positivos y negativos (promotores o inhibidores de la transcripción respectivamente) que forman bucles de retroalimentación transcripcional. Estos bucles de retroalimentación circadianos tienen un período de aproximadamente 24 horas, lo que le confiere a estos ritmos el nombre de circadianos (revisado en mamíferos, Buhr y Takahashi 2013, peces, Zhdanova y Reebbs 2005, y *D. melanogaster*, Tataroglu y Emery 2015).

Los relojes biológicos se organizan en sistemas circadianos que, a pesar de existir en varios niveles de complejidad, mantienen una estructura general similar en los diferentes grupos (Menaker y cols 1997). Cualquier sistema circadiano debe contar con 1) un oscilador interno encargado de generar el ritmo (el reloj biológico), 2) aferencias sensoriales que captan la información ambiental relevante para sincronizar los ritmos internos a los externos y 3) eferencias neurohormonales que transmiten la señal circadiana a otros tejidos y sistemas, coordinando la expresión de diferentes ritmos (Golombek y Rosenstein 2010). Las variables ambientales capaces de *encarrilar* (i.e.: ajustar la fase de los relojes internos) los ritmos circadianos se conocen como *zeitgebers*. El *zeitgeber* dominante para la mayoría de las especies es el ciclo de luz y oscuridad (LD, de sus siglas en inglés *Light-Darkness*) y hay mecanismos fotorreceptores y fototransductivos especializados que han surgido en la evolución de todos los sistemas de relojes biológicos (Menaker y cols. 1997, Pérez y cols. 2019). El *zeitgeber* confiere información del tiempo externo al reloj biológico, que modula la progresión del bucle de retroalimentación circadiano de forma acorde. La representación del tiempo externo generada por la progresión de estos bucles se transmite al resto de la célula en forma de programas circadianos de expresión génica. (Ashton y cols. 2022, Bell-Pedersen y cols. 2005, Buhr y Takahashi 2013). Los ritmos fisiológicos, metabólicos y conductuales son el resultado de la coordinación de estos programas.

Al considerar cómo las variables ambientales pueden sincronizar los ritmos circadianos debemos detenernos en la diferencia entre el encarrilamiento o *entrainment* de los ritmos y lo que los cronobiólogos denominan *masking* o enmascaramiento. En el primer caso, la variable ambiental afecta directamente los relojes moleculares mediante su acción sobre los bucles de

retroalimentación, retrasando o adelantando su fase y sincronizado al ritmo con la variable ambiental en cuestión. Esto significa que, al desaparecer el estímulo ambiental, el ritmo permanecerá con la fase inducida por la variable ambiental (Aschoff 1981b, Refinetti 2010). Este mecanismo es lo que convierte a un sincronizador ambiental en un *zeitgeber*. En contraste con estos efectos persistentes, un estímulo ambiental puede *enmascarar* el ritmo endógeno, haciendo que este se exprese con la temporalidad del estímulo ambiental pero sin afectar el reloj biológico. De esta forma, los ajustes temporales observados desaparecen inmediatamente cuando el factor externo deja de estar presente (López-Olmeda 2017, Mrosovsky 1999). Ambos mecanismos implican sincronización, pero las bases fisiológicas detrás de ambos son diferentes. Cabe destacar que un mismo factor ambiental, por ejemplo la luz, puede tanto actuar como *zeitgeber* como enmascarar un ritmo endógeno (Figura 1.1).

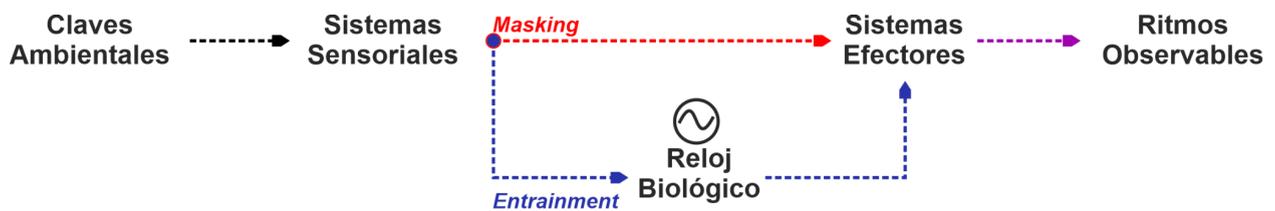


Figura 1.1: Esquema conceptual de la sincronización de ritmos diarios. Adaptado de López-Olmeda 2017.

### Bases neurales de los sistemas circadianos

Los animales cuentan con múltiples osciladores circadianos que se organizan formando redes interconectadas, con diferentes niveles de jerarquía y acopladas a través de mecanismos celulares y hormonales que acompañan sus fases. En vertebrados, podemos definir un “eje circadiano” formado por estructuras con relojes biológicos, conservadas a lo largo de la evolución. Estas son los núcleos supraquiasmáticos (NSQ), la glándula pineal y la retina. Aunque estas estructuras están presentes en todos los vertebrados, su contribución al sistema circadiano puede variar considerablemente entre clases e incluso dentro de la misma clase. Lo que es más, los sistemas circadianos de distintos grupos de vertebrados muestran diferentes grados de jerarquización de sus osciladores (Bell-Pedersen y cols. 2005).

En general, podemos observar una centralización y simplificación de los procesos desde vertebrados basales como los peces hasta grupos más nuevos como las aves o los mamíferos (Kumar y Sharma 2018). En lugar de un sistema dominado por un reloj maestro en el NSQ, los peces, anfibios,

reptiles y aves muestran diversos grados de descentralización en sus redes circadianas, con múltiples osciladores sincronizados de forma independiente (Cassone 2014, Falcón y Muñoz-Cueto 2024, Tosini y cols. 2005). Los peces, como el grupo troncal de vertebrados, muestran quizás el mayor grado de organización no jerárquica (Figura 1.2). Por otro lado, mientras en mamíferos el único punto de acceso de la luz al sistema es a través de la retina, el resto de los vertebrados tienen múltiples estructuras centrales (e incluso periféricas) con capacidades fotosensibles.

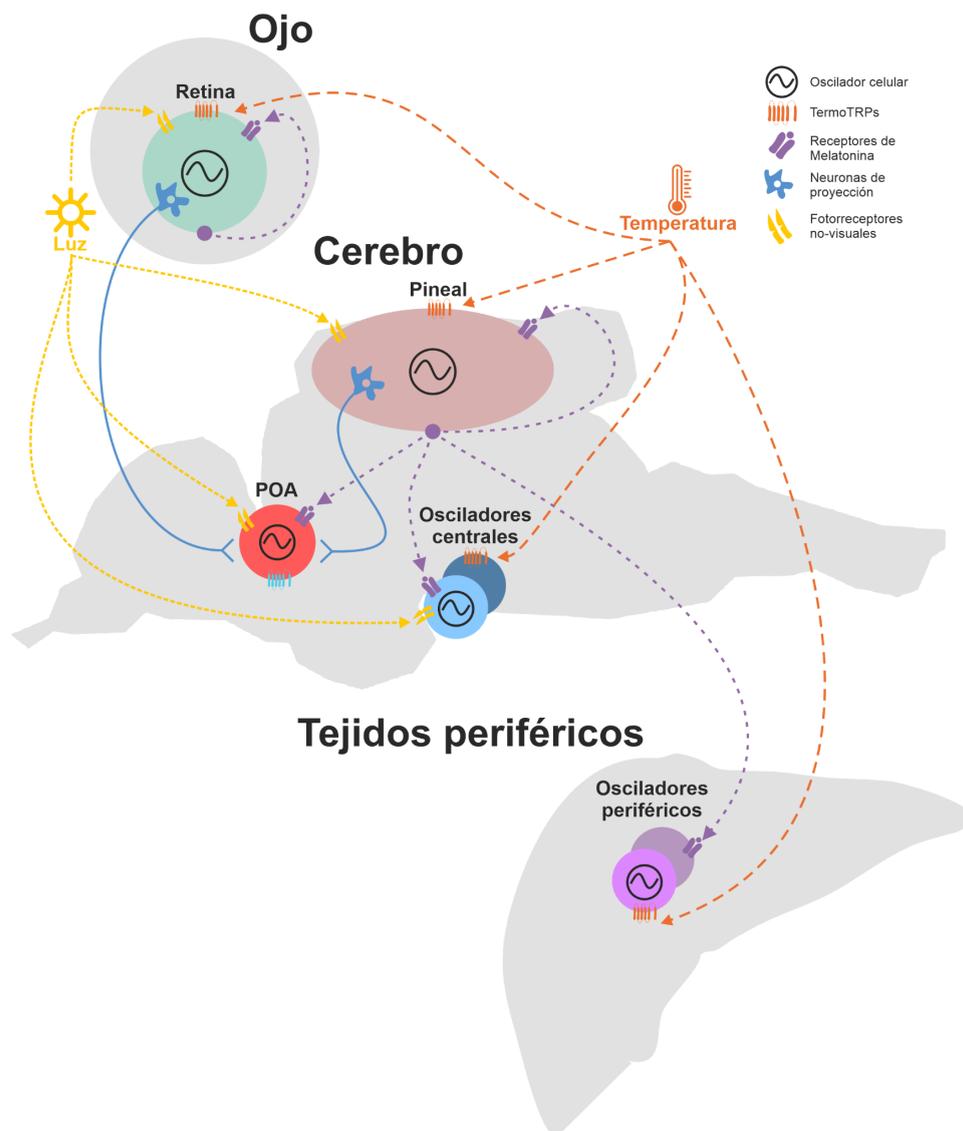
En los peces la estructura neural clave implicada en la regulación circadiana es el órgano pineal. Este contiene tres tipos de células: células fotorreceptoras llamadas pinealocitos, células ganglionares de segundo orden y glía. La estructura de la pineal es básicamente la de una retina simplificada. La glándula pineal de los peces contiene todos los componentes necesarios de un sistema circadiano, al contar con fotorreceptores, genes reloj que forman el bucle de retroalimentación circadiana, y eferencias neurohormonales (Falcón y Muñoz-Cueto 2024). De esta forma, la luz que llega a los pinealocitos puede enfatizar los bucles de retroalimentación circadianos. Esta información lumínica puede transmitirse al resto del cerebro y del cuerpo a través de dos vías complementarias. La primera, la vía neuronal, es una señal rápida que involucra a las células ganglionares. La segunda vía, mucho más conocida, es la vía de señalización melatoninérgica (Falcón y cols. 2010). Tanto la hormona, como la enzima que cataliza el paso limitante de su síntesis (arilalquilamina N-acetiltransferasa o AANAT) están bajo una estricta regulación diaria, con niveles plasmáticos de la hormona que alcanzan su punto máximo durante la noche y disminuyen a lo largo del día (Falcón y cols. 2010, Falcón y Muñoz-Cueto 2024, Klein 2007). La luz inhibe la actividad de la AANAT mediante su desfosforilación (Ivanova y Iuvone 2003), y en consecuencia la exposición a luz continua (LL, por sus siglas en inglés *Light-Light*) inhibe la secreción de melatonina. A su vez, en la mayoría de los teleósteos la síntesis y liberación de melatonina se encuentra regulada por relojes circadianos ubicados en los pinealocitos (Zhdanova y Reeb 2005).

Hay abundancia de evidencia que vincula el ciclo diario de la melatonina con los ciclos diarios de distintos comportamientos, incluido la actividad locomotora, el comportamiento social, la ingesta de alimentos y la formación de cardúmenes, entre otras (Feng y Bass 2016, Kavaliers 1989, Lima-Cabello y cols. 2014, López-Olmeda y cols. 2006a, Migliaro y Silva 2016). La regulación melatoninérgica de estos ritmos varía según la especie y la pinealectomía de los animales puede ocasionar arritmicidad, ritmos en libre curso, o ritmos divididos (Falcón y cols. 2010).

En algunas especies se ha demostrado que el comportamiento social también está bajo regulación melatoninérgica. En el pez sapo, una especie donde los machos vocalizan para atraer a las hembras y defender sus territorios, la mayoría de las áreas del cerebro anterior involucradas en la producción de vocalizaciones expresan receptores de melatonina (Feng y cols. 2019). Con pocas excepciones, estas regiones también expresan receptores de hormonas esteroides. La convergencia de las vías de señalización hormonal dentro de la red auditiva-vocal resalta el probable efecto combinatorio de estas hormonas en la regulación de los cambios diarios en la comunicación acústica y, más ampliamente, en los comportamientos sociales. Es más, el tratamiento con melatonina potencia el patrón nocturno de vocalizaciones en esta especie y rescata vocalizaciones que se pierden en animales sometidos a condiciones de luz constante (Feng y Bass 2014; 2016)

El papel del órgano pineal en la fisiología circadiana de los peces está claro en el sentido de que la pineal transduce y transmite información sobre el ambiente fótico y, por tanto, sobre la duración del día y la noche durante el ciclo de 24 h. Las señales del órgano pineal sincronizan los ciclos fisiológicos y conductuales diarios y coordinan la expresión de los ritmos circadianos en otros osciladores periféricos.

Algo interesante de destacar de los sistemas circadianos de los peces es su gran necesidad de versatilidad y adaptabilidad. Estos animales, al ser poiquiloterms, deben ser capaces de ajustar la fisiología que subyace a sus ritmos circadianos a temperaturas corporales que dependen directamente de la temperatura ambiental (Lahiri y cols. 2005).



**Figura 1.2:** Esquema del sistema circadiano en peces. El sistema circadiano en peces consiste en una serie de osciladores interconectados dentro (osciladores centrales) como fuera (osciladores periféricos) del cerebro. La luz accede al sistema circadiano a través de células que expresan opsinas no-visuales como la melanopsina (Falcón y Muñoz-Cueto 2024). La temperatura en cambio, accede al sistema a través de distintos receptores sensibles a temperatura, entre los que se encuentran los termoTRPs (Nisembaum y cols. 2015, ver Anexo 2). Tanto la pineal como la retina proyectan axones hacia estructuras diencefálicas como el área preóptica (POA) (Falcón y Muñoz-Cueto 2024). La melatonina actúa como el principal mensajero circadiano. En la retina cumple una función mayoritariamente paracrina, mientras que la melatonina pineal es liberada al líquido cefalorraquídeo y al torrente sanguíneo, sincronizando la actividad de distintos tejidos blanco.

### *El termociclo como sincronizador de los ritmos diarios*

Si bien el ciclo de luz/oscuridad constituye el zeitgeber más extendido y estudiado en el reino animal, no todos los organismos habitan nichos ecológicos donde la alternancia de luz y oscuridad representa fielmente la alternancia día/noche. En muchos hábitats, como cuevas y aguas profundas

o turbias, los ritmos circadianos se sincronizan con otras variables ambientales.. En los ectotermos la temperatura ambiental emerge como un candidato de *zeitgeber* particularmente relevante. En condiciones naturales, las variaciones diarias de temperatura suelen acompañar al ciclo de luz-oscuridad, definiendo dos fases características: la termofase, correspondiente al periodo de mayor temperatura, generalmente coincidente con el fotoperiodo, y la criofase, de menor temperatura, asociada al periodo de oscuridad. Bajo este patrón, los aumentos de temperatura tienden a producirse en torno al amanecer y los descensos al atardecer (Johnson 2004), proporcionando una referencia temporal predecible que puede complementar o incluso sustituir a la luz como señal de sincronización circadiana.

Gran parte del trabajo sobre la sincronización de los ritmos circadianos por el termociclo se ha realizado en *Drosophila melanogaster*. Como en muchos otros animales, los ritmos de temperatura son capaces de encarrilar el ritmo circadiano de la actividad locomotora de *Drosophila* (Busza y cols. 2007, Glaser y Stanewsky 2005, Roessingh y cols. 2019, Tomioka y Yoshii 2006). En esta especie, se ha propuesto un modelo de dos osciladores, en el cual la luz y la temperatura pueden encarrilar osciladores formados por poblaciones neuronales distintas (Bellemer 2015, Miyasako y cols. 2007). La actividad locomotora entonces es comandada de forma conjunta por ambos osciladores.

En cuanto a vertebrados, la sincronización a la temperatura es mucho menos comprendida (Rensing y Ruoff 2002, López-Olmeda 2017). En 1969, Hoffmann (Hoffmann 1969) concluyó que “los ciclos de temperatura son fuertes *zeitgebers* [...] para organismos poiquilotermos, pero débiles para homeotermos.” En ectotermos, incluso los termociclos de apenas 1 o 2 °C pueden sincronizar ritmos biológicos. Por ejemplo, la actividad locomotora del lagarto *Uta stansburiana* parece sincronizarse mejor con los ciclos de temperatura que con los de luz (Evans y cols. 1966). En el lagarto *Podarcis sicula campestris*, un termociclo con una amplitud de 1.78 °C es suficiente para sincronizar la actividad locomotora y generar un patrón bimodal de actividad típico del verano, incluso en animales de invierno (Foà y Bertolucci 2001).

A pesar de la importancia de la temperatura ambiental para los organismos ectotermos, se sabe muy poco sobre los efectos de los termociclos en los ritmos biológicos de los peces. En cuanto al reloj molecular, estudios previos en pez cebra han demostrado que termociclos de solo 2 °C de amplitud pueden sincronizar los ritmos de expresión de genes reloj tanto en larvas como en células mantenidas en oscuridad constante (Lahiri y cols. 2005). Estos efectos sobre el reloj molecular

luego se reflejan en cambios en los ritmos fisiológicos y comportamentales. Por ejemplo, los ritmos diarios de actividad locomotora en el pez cebra pueden sincronizarse con termociclos, bajo condiciones de luz constante (López-Olmeda y cols. 2006a). Más aún, frente a ciclos de luz y temperatura con períodos diferentes, los individuos exhiben ritmos que muestran componentes regulados en forma independiente, asociadas a cada variable ambiental (López-Olmeda y Sánchez-Vázquez 2009). Este fenómeno se conoce como coordinación relativa y podría representar la interacción de dos osciladores débilmente acoplados (Emens y cols. 2005). La actividad de la enzima AANAT responde in vitro a cambios de temperatura (Cazaméa-Catalan y cols. 2012; 2013). A nivel celular, la secreción de melatonina pineal se ve regulada por los canales termosensibles de la familia de los TRP (Gau y cols. 2013, Hunt y cols. 2012, Laursen y cols. 2015, ver Anexo 1).

#### *Diferentes aproximaciones al estudio de los ritmos circadianos*

Ricklefs y Wikelski (2002) sostienen que para comprender los rasgos de historia de vida de una especie se requiere entender cómo los individuos responden a su ambiente específico y que los estudios que ahonden sobre este tema deberían “integrar el comportamiento y la fisiología dentro de los contextos ambientales y demográficos de la selección”. Por aspectos un poco obvios, el estudio de los mecanismos que subyacen a la ritmicidad circadiana se ha basado principalmente en el uso de organismos modelo como murinos, moscas y peces cebra, que permiten la manipulación genética, siempre bajo condiciones estandarizadas de laboratorio (Helm y cols. 2017). Lejos de desmerecer la potencia de este enfoque, hay que señalar que conlleva ciertas limitaciones, especialmente cuando se intenta responder preguntas vinculadas a las implicancias ecológicas y evolutivas de estos ritmos biológicos.

El entorno natural de un animal es un sistema mucho más complejo que el de las condiciones de laboratorio. Los patrones rítmicos expresados en ambientes naturales pueden estar influidos tanto por factores abióticos (temperatura, humedad, precipitaciones, intensidad y composición espectral de luz variable) como bióticos (interacciones intra e interespecíficas, disponibilidad de alimento, riesgo de depredación). Estas influencias pueden afectar dramáticamente la fisiología y el comportamiento adaptativo de una misma especie, o incluso de un mismo individuo, entre condiciones de laboratorio y naturales (Calisi y Bentley 2009; Helm y cols. 2017; Kronfeld-Schor y

cols. 2008; 2013). Tanto en roedores (Ben-Shlomo y cols. 1995, Blanchong y cols. 1999, Kronfeld-Schor y cols. 2008, Urrejola y cols. 2005) cómo en otros grupos de mamíferos (Rattenborg y cols. 2008) los patrones de comportamiento diario difieren entre condiciones naturales y de laboratorio. Esto puede ir desde una estructura más laxa de la actividad hasta un cambio completo del patrón nocturno al diurno.

La contracara de los abordajes en condiciones naturales es que la multiplicidad de variables ambientales que fluctúan de manera simultánea y no controlada dificulta identificar cuáles de ellas actúan efectivamente como zeitgebers, cómo se integran a nivel sensorial y cuáles son los mecanismos fisiológicos que median su efecto sobre el comportamiento. Esta complejidad puede enmascarar relaciones causales y hacer difícil aislar los factores clave que modulan la ritmicidad diaria. En este sentido, diseñar protocolos semi-naturales que sin perder del todo la riqueza de escenarios naturales, mantienen un grado de control suficiente para manipular variables específicas se vuelve una estrategia alternativa increíblemente atractiva (Flôres y cols. 2016, Sanguinetti-Sheck y Gálvez 2024, Shemesh y cols. 2024)

## **1.2. Los peces eléctricos cómo modelo de estudio**

### *Los peces eléctricos y el sistema electrogénico*

Los peces eléctricos de descarga débil han resultado ser un excelente modelo para el estudio de los ritmos biológicos, tanto desde un punto de vista mecanístico como eco y etológico. Estos animales pertenecen a dos familias en las cuáles el sistema electrogénico emergió de forma convergente: los mormíridos, nativos de África y los gymnotiformes encontrados en América del Sur (Kramer 1990). Estos peces se caracterizan por emitir descargas de corriente eléctrica de baja amplitud de forma constante, generadas por un órgano especializado llamado órgano eléctrico (OE) (Bennett 1971). Estas descargas del órgano eléctrico (DOEs) cumplen con una función doble: por un lado permiten a los animales detectar objetos en el agua por deformaciones en el campo eléctrico autogenerado, lo que se conoce como electrolocalización activa (Lissman 1958). Por otro lado, modulaciones de estas señales son utilizadas en la comunicación con otros individuos (Crampton 2019, Quintana y Salazar 2025).

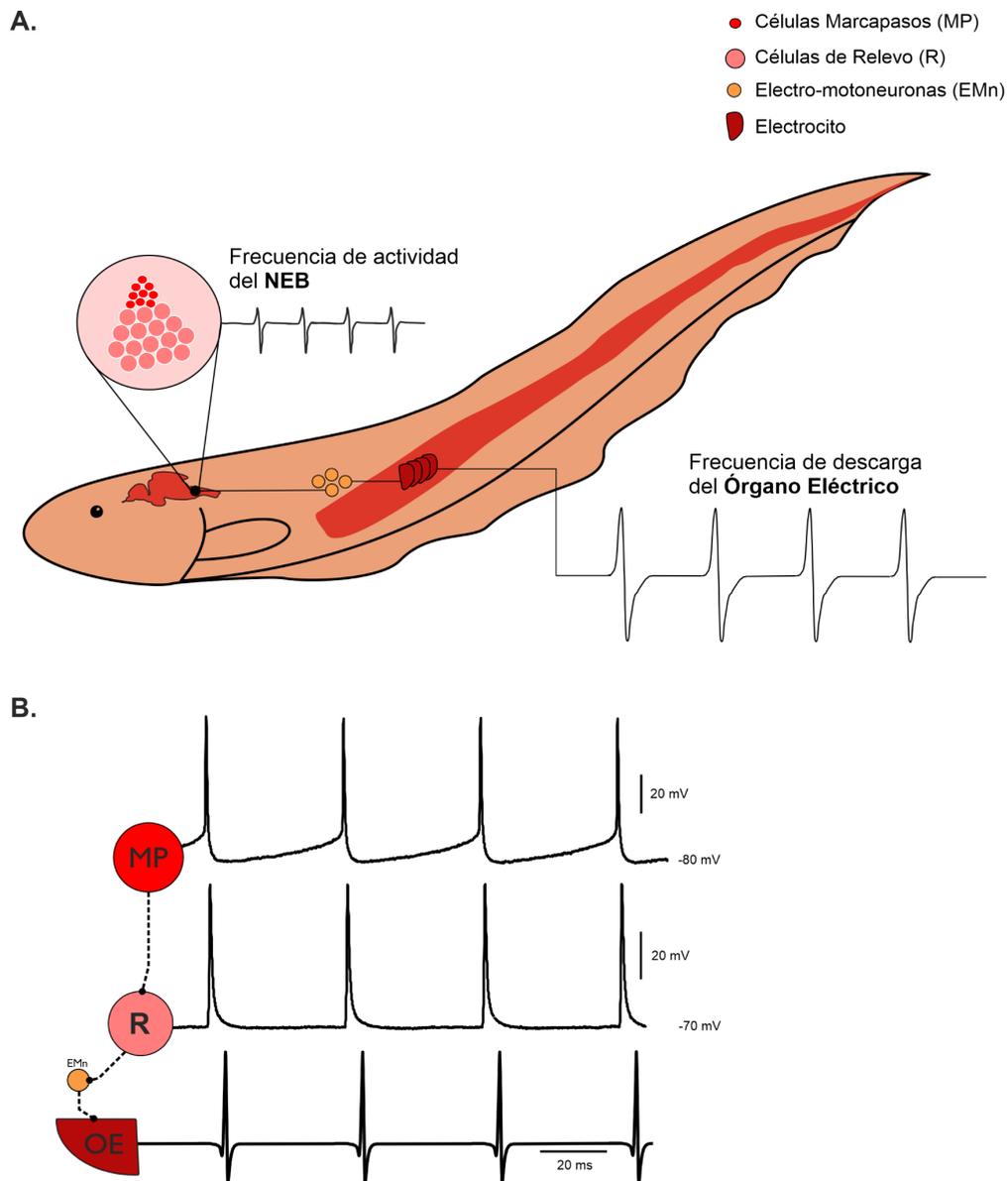
La forma de onda de las DOEs, que depende del patrón de inervación y secuencia de activación de los electrocitos, transmite información sobre la especie, el estado fisiológico y en algunas especies

sobre el sexo (Bennet 1971, Hopkins y cols. 1990, Silva y cols. 2002). Por otro lado, la frecuencia de descarga del órgano eléctrico (fDOE) también cumple funciones sensoriales y comunicativas. La detección de estímulos novedosos y más generalmente los estados de alerta llevan a un aumento en la fDOE que, en consecuencia, genera un incremento en la cantidad de información que el animal adquiere a través del canal electroceptivo. Así, los movimientos exploratorios o la respuesta a estímulos inesperados se asocian con incrementos en la fDOE (Caputi y cols. 2003, Jun y cols. 2014, Kawasaki y Heiligenberg 1989). Por otro lado, en algunas especies la fDOE puede dar información acerca de la jerarquía social o el estado fisiológico. En el mormirido *Sternarchorhynchus* sp la fDOE aumenta con el tamaño del animal y en experimentos de playback los animales tienen a acercarse a los electrodos que emiten señales a menor frecuencia (Fugère y cols. 2010). Esto se observa también en el caso del gimnotiforme *Apteronotus leptorhynchus*, donde la fDOE correlaciona con el tamaño corporal (Dunlap y cols. 2002) y con la dominancia (Hagedorn y Heiligenberg 1985, Henninger y cols. 2018). En *Gymnotus omarorum*, tras una contienda agonística entre dos animales, el animal subordinado tiende a bajar su fDOE por debajo de la de su contrincante (Batista y cols. 2012), un efecto que involucra al neuropéptido hipotalámico vasotocina (AVT) (Perrone y cols. 2018). En *Brachyhyppopomus gauderio*, una especie simpátrida con *G. omarorum*, durante la época reproductiva los machos tienen un aumento nocturno en la fDOE mayor a lo observado durante en invierno (Silva y cols. 2008). Tanto el sistema de electrolocación activa como el sistema encargado de regular el comportamiento social hacen uso de las emisiones eléctricas, y estas deben responder a las necesidades sensoriales y comunicacionales de forma óptima y dinámica. Esto exige un sistema intrincado y con un alto grado de interconexión, con estructuras, moduladores y circuitos en común.

En los gimnotiformes, la generación de las DOEs (así como la regulación de su frecuencia) es comandada por un núcleo del tronco encefálico denominado Núcleo Electromotor Bulbar (NEB). El NEB y el OE tienen una relación de actividad 1 a 1: por cada descarga concertada del núcleo se genera una única DOE (Bennett y cols. 1967, Borde y cols. 2020). Este núcleo cuenta con dos poblaciones celulares: las células marcapasos (MP) y las células bulbo espinales de relevo, o células relé (R) (Bennett y cols. 1967, Quintana y cols. 2011). Las células MP presentan despolarización espontánea rítmica y se encuentran acopladas electrónicamente entre sí mediante sinapsis eléctricas, asegurando que disparen sincrónicamente (Bennett y cols. 1967, Moortgat y cols. 2000). Las células

R reciben aferencias de las MP, proyectando sus axones hacia las electromotoneuronas que inervan los electrocitos del OE (Caputi y Trujillo-Cenóz 1994, Comas y Borde 2021).

El NEB, a su vez, es modulado por diferentes estructuras superiores. Entre estas se encuentran los núcleos pre-marcapasos (Heiligenberg y cols. 1981, Comas y Borde 2010) y el área preóptica (POA), un núcleo de la red del comportamiento social que en *Gymnotus omarorum* proyecta fibras AVT positivas en la vecindad del NEB cuya actividad espontánea es sensible a AVT (Perrone y cols. 2014, Pouso y cols. 2017). El POA está fuertemente vinculado con la expresión de la conducta social en esta especie (Eastman y cols. 2021, Pouso y cols. 2024) y es uno de los núcleos que integran el sistema circadiano en diversas especies de teleósteos (ver más arriba, Falcón y cols. 2010). El NEB funciona como un centro integrador, recibiendo proyecciones de distintos núcleos cerebrales que responden a estímulos ambientales bióticos y abióticos y que modulan su descarga tanto por vía sináptica como por modulación de las propiedades intrínsecas de sus neuronas (Comas y cols. 2019). Un esquema del sistema electrogenerador se encuentra en la figura 1.3. El NEB debe integrar la información de forma rápida y efectiva generando una salida conductual (cambios en la fDOE) que responda a las necesidades perceptuales y sociales del animal en cada momento.



**Figura 1.3:** Organización anatómica y neurofisiológica del sistema electrogenerador en gymnotiformes. **A.** Diagrama de un pez eléctrico mostrando la ubicación y conexión funcional del Núcleo de Emisión Bulbar (NEB), responsable de generar el patrón de descarga eléctrica. Las células marcapasos (MP) generan potenciales de acción espontáneos que determinan la frecuencia base de la descarga. Estas células activan a las células de relevo (R), que a su vez hacen sinapsis con las electromotoneuronas (EMn). Las EMn proyectan sus axones hacia el órgano eléctrico (OE), compuesto por electrocitos, que descargan de forma concertada para generar la DOE. **B.** Actividad eléctrica intracelular registrada en los distintos componentes del sistema electrogenerador. De arriba hacia abajo se observan trenes de potenciales de acción de las células MP, seguidos por las células R, las EMn y, finalmente las descargas del órgano eléctrico (OE). Cada descarga de las células MP desencadena una DOE. Escala de voltaje y tiempo indicada en los registros. Adaptado de Cómas y Borde 2021.

### *Los ritmos circadianos en peces eléctricos*

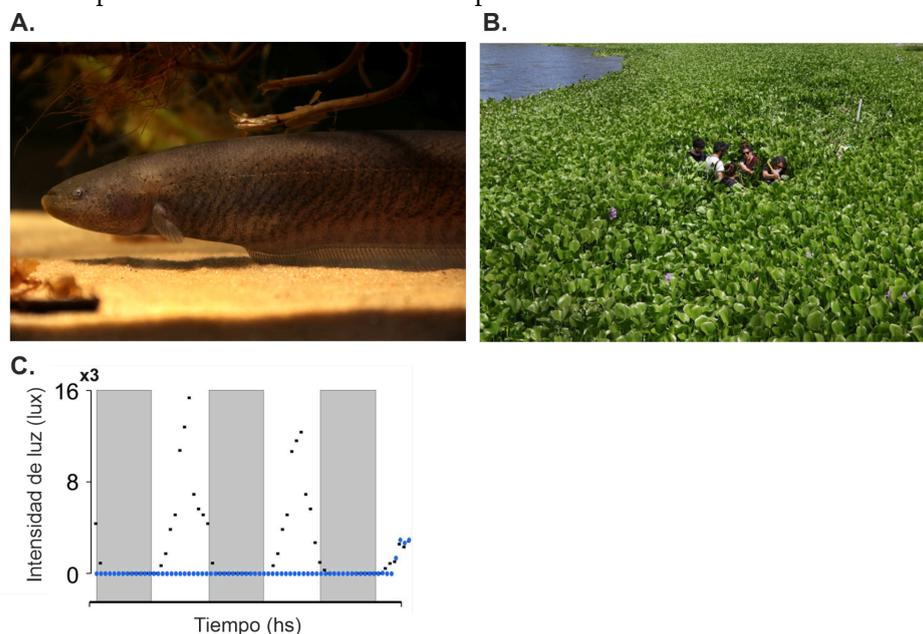
En la mayoría de los casos estudiados, los peces eléctricos de descarga débil muestran hábitos de comportamiento nocturnos o crepusculares, tanto en mormíridos (Lissman y Schwassmann 1965,

Mucha y cols. 2022), como en nuestros propios gymnotiformes. La nocturnidad de los peces eléctricos sudamericanos ha sido analizada con diversas aproximaciones tanto en condiciones de laboratorio como en el campo (Black-Cleworth 1970, Kawasaki y Heiligenberg 1989, Migliario y cols. 2018, Migliario y cols. 2025, Migliario y Silva 2016, Silva y cols. 2007, Stoddard y cols. 2007, Zupanc y cols. 2001). Durante la noche se incrementa la actividad locomotora y la fDOE, maximizando la obtención de información externa y reduciendo los gastos metabólicos que implicaría mantener esta frecuencia alta a toda hora (Salazar y cols. 2013). Tanto *A. leptorhynchus* y *E. virescens* (Deng y Tseng 2000), cómo *B. gauderio* y *G. omarorum* muestran aumentos nocturnos de la fDOE. En *G. omarorum*, la especie modelo de esta tesis, la fDOE aumenta al atardecer y disminuye progresivamente a lo largo de la noche en condiciones naturales (Migliario y cols. 2018). En el laboratorio en condiciones de aislamiento, temperatura constante y con un fotoperíodo 12:12 se observa un incremento durante la noche más modesto con una duración menor en ambas especies. En estas condiciones el aumento nocturno puede ser eliminado utilizando el antagonista de los receptores MT2 de melatonina luzindole (Migliario y cols. 2016). A su vez, en *B. gauderio*, tanto la inyección intraperitoneal de melatonina como la aplicación de melatonina directamente en una rodaja de tronco encefálico que contiene el NEB generan respuesta análogas compatibles con la actividad nocturna sobre la fDOE y la frecuencia de descarga del NEB respectivamente (Vázquez y cols. 2024). Esto sugiere que la melatonina actúa o bien sobre el NEB directamente, o sobre alguna de las estructuras cercanas que proyectan a este.

En cuanto al carácter endógeno de este ritmo, la información es más escasa. En 2007 Stoddard y colaboradores demostraron que los ritmos de fDOE de *B. gauderio* se mantenían durante varios días aún en condiciones de LL y DD (Stoddard y cols. 2007). Estos experimentos, sin embargo, se realizaron con animales en grupo y no puede aislarse del rol sincronizador del contexto social (Mellert y cols. 2024, Migliario y cols. 2018, Siehler y cols. 2021). *G. omarorum* mantiene su ritmo circadiano de fDOE en condiciones de DD y temperatura constante, aunque la ritmicidad parece volverse menos robusta al poner a los animales bajo libre curso. En estas condiciones, los animales presentan ritmos con períodos variables de entre 20 y 28 hs (Migliario 2018).

Esta tesis se centra en el estudio de 2 ritmos conductuales de *G. omarorum* (eléctrico y locomotor) y su vínculo con el ciclo luz/oscuridad y temperatura utilizando una aproximación semi-natural. Esta especie nos presenta un caso excepcional para estudiar la sincronización de los ritmos conductuales

a diferentes variables ambientales ya que vive bajo condiciones lumínicas que se alejan de las 12L:12D utilizadas normalmente en el laboratorio. Estos animales viven en aguas dulces y quietas, cerca de la orilla y cubiertas de muy espesa vegetación (en nuestros cuerpos de agua usualmente *Eichhornia crassipes*). Son animales altamente territoriales durante todo el año y mantienen territorios de aproximadamente 1 m<sup>2</sup> (Zubizarreta y cols. 2020). Un trabajo reciente muestra que, en condiciones naturales, los ritmos de fDOE de estos animales guardan una mayor relación con el momento de máxima temperatura que con el atardecer (Migliaro y cols. 2025). Lo que es más, bajo la vegetación de la laguna los niveles de luz son muy bajos o nulos (Migliaro y cols. 2018). Sin embargo esto varía a lo largo de las zonas cubiertas por vegetación dado que esta se distribuye de forma heterogénea (Camargo y cols. 2023, Migliaro y cols. 2025) y cabe la posibilidad de que los animales tengan acceso a la información lumínica, por ejemplo acercándose a aguas abiertas o a parches descubiertos. En este marco, en esta tesis se plantea una aproximación seminatural que combina ambientes enriquecidos y complejos con un control absoluto sobre los niveles de luz, permitiéndonos explorar el rol del termociclo como sincronizador de los ritmos diarios de dos comportamientos que abordaremos de forma independiente.



**Figura 1.4:** **A.** Especimen de *Gymnotus omarorum*, fotografía por Marcelo Casacuberta. **B.** El hábitat natural de *G. omarorum*. La fotografía fue tomada en la Laguna del Sauce, Maldonado, durante una salida de campo. En el caso más extremo, el extremo superior de la vegetación era superior al miembro más alto del equipo. **C.** Registro de la intensidad de luz (en lux) durante 3 días en el hábitat natural. El sombreado gris señala la noche. Los puntos negros marcan los niveles de iluminancia captados por un sensor ubicado en la superficie del agua. Los puntos azules marcan los niveles captados por un sensor ubicado bajo la vegetación. Adaptado de Migliaro y cols. 2018.

## **2. Hipótesis y objetivos**

### **2.1. Hipótesis General:**

El termociclo natural es capaz de sincronizar los ritmos conductuales de *G. omarorum*.

### **2.2. Objetivo General:**

Estudiar la ritmicidad conductual de *G. omarorum* en condiciones de oscuridad absoluta y la relación temporal entre estos ritmos y el termoperiodo.

### **2.3. Objetivos Específicos:**

1. Validar el diseño experimental para estudiar la relación entre la conducta y los ritmos ambientales naturales.
2. Estudiar la expresión del ritmo diario de fDOE en condiciones seminaturales con y sin acceso al ciclo ambiental de luz y oscuridad.
3. Comparar cuantitativamente los ritmos de fDOE y temperatura.
4. Describir el ritmo diario de comportamiento locomotor.
5. Comparar la expresión del ritmo diario de actividad locomotora en condiciones seminaturales con y sin acceso al ciclo ambiental de luz y oscuridad.
6. Realizar un estudio preliminar sobre las preferencias en el uso del espacio.
7. Obtener un protocolo eficiente para la cuantificación de la expresión de genes asociados a la sistema circadiano mediante RT-qPCR.

Estos objetivos se abordaron en tres secciones de la tesis. En el capítulo 4 “Vínculo entre el ritmo diario de temperatura ambiental y la fDOE” se abordaron los objetivos específicos 1 a 3. En el capítulo 5 “Descripción de los ritmos de actividad locomotora de *G. omarorum*” se abordaron los objetivos específicos 4 a 6. Asimismo, la puesta a punto del protocolo de cuantificación génica, que permitirá un análisis a futuro del efecto de la temperatura sobre el sistema melatoninérgico (incluido en el objetivo específico 7) se detalla en el Anexo 2.

### **2.4. Aproximación Experimental**

Para abordar los objetivos planteados en esta tesis, adoptamos un enfoque experimental que permitió integrar el análisis de ritmos conductuales con las condiciones ambientales que los modulan, en un modelo que preserva tanto la expresión natural de la conducta como el control experimental de variables externas. *Gymnotus omarorum* ofrece la ventaja de permitir el registro no

invasivo de su comportamiento a través de las descargas de su órgano eléctrico (DOEs), incluso en ausencia de observación visual directa.

Nos centramos en el estudio simultáneo de dos ritmos conductuales: la locomoción y la frecuencia de la DOE (fDOE), los cuales presentan una asociación temporal con máximos nocturnos, pero cuya relación causal exclusiva ha sido descartada previamente. Esta aproximación abre la posibilidad de explorar cómo ambos ritmos, aunque independientes en su generación (el ritmo de fDOE es independiente de la locomoción del animal) (Migliaro y cols. 2018), pueden estar modulados de forma conjunta por variables ambientales como la temperatura.

Diseñamos así un esquema experimental basado en registros prolongados de la actividad eléctrica de los animales bajo condiciones semi-controladas que permitieron cuantificar las dinámicas diarias y extraer parámetros rítmicos para su posterior comparación.

### **3. Materiales y métodos**

#### **3.1. Colecta y alojamiento de animales**

Individuos de *G. omarorum* (n=12) fueron colectados en la Laguna de los Cisnes, Maldonado-Uruguay (34°50' S, 55°07' W). Los animales fueron capturados utilizando un detector de señales eléctricas, según Silva y cols. 2003. Los animales fueron transportados de forma individual en bolsas plásticas y luego alojados en condiciones de semi-naturalidad en piscinas comunales exteriores de 1 m<sup>2</sup> de área y 30 cm de altura, ubicadas en el bioterio de poiquiloterms en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Dentro de estas piscinas los animales ocuparon compartimientos individuales que impiden el acceso físico a los vecinos pero permiten el intercambio de señales eléctricas y químicas. Las piscinas fueron cubiertas por vegetación obtenida del área de captura y cada compartimiento individual contó con un refugio cilíndrico de PVC. Los animales fueron alimentados cada 5 días con *Tubifex tubifex*. Estas condiciones cumplen con la ley de experimentación animal (N°18611) y se encuentran avaladas por la comisión de Ética para el uso de animales de experimentación del Instituto Clemente Estable (CEUA-IIBCE, protocolo n° 001-02-2018). Los animales fueron mantenidos en estas condiciones por al menos 1 mes (y no más de 3) previo a los experimentos para permitir la aclimatación de los individuos. Tras finalizar los experimentos, los animales fueron devueltos a las piscinas comunales para su posterior uso en otros proyectos.

#### **3.2. Diseño experimental**

##### *Arena experimental*

Las arenas experimentales (Fig. 3.1A) consistieron de piscinas idénticas a las utilizadas para alojar a los animales y ubicadas en el mismo bioterio, con un volumen de agua aproximado de 1000 L. Cada piscina contaba con un tubo de PVC a modo de refugio para el animal. A este tubo se le adhirió un sensor de luz y temperatura (*HOBO TM Pendant Temperature/Light Data Logger*). El sensor fue seteado para tomar datos cada 10 o 15 minutos. El sensor cuenta con rango de entre -20 y 70 °C de temperatura, y 0 y 320.000 lux de luz, y una resolución y precisión de 0,14 y 0,53 °C respectivamente. El resto de las especificaciones del sensor se encuentran en: <https://www.onsetcomp.com/resources/documentation/ua-002-manual>.

Para el registro de las descargas eléctricas (DOEs) se instaló una grilla de ocho varas de carbono de 30 cm, distribuidas en una matriz de 90 × 90 cm. Los electrodos se posicionaron desde (x=0, y=90) en pasos de 45 cm, cubriendo uniformemente el área de la piscina. Los electrodos se conectaron a un sistema de adquisición de señales basado en un amplificador multicanal (Migliaro y cols. 2025), comandado por una placa Teensy 4.1, utilizando un script específico (Migliaro y cols. 2025). Este sistema permite registrar de forma continua las DOEs, guardando los datos directamente en tarjetas SD. Los registros se almacenan como archivos de audio WAV con ocho canales y se utilizó una frecuencia de muestreo de 20000 Hz. La alimentación se realizó mediante powerbanks de 10,000 o 20,000 mAh, lo que garantizó autonomía de varios días sin intervención externa.

### *Protocolo experimental*

Cada animal fue trasladado individualmente a su piscina experimental un día antes de iniciar el experimento, permitiendo así un período de aclimatación a las nuevas condiciones. Estas piscinas eran idénticas a las de alojamiento y se encontraban cubiertas por vegetación natural (Fig 3.1B). Una vez comenzado el protocolo se registraron las DOEs de los animales de forma continua durante al menos cinco días. En esta fase experimental (*condición descubierta*) los peces estuvieron expuestos a los ritmos ambientales naturales, incluyendo el fotociclo y el termociclo.

Finalizada esta primera etapa, las piscinas fueron completamente cubiertas con una tela black-out, bloqueando completamente el ingreso de luz ambiental pero permitiendo que la temperatura del agua continuara fluctuando de forma natural (*condición cubierta*). Se continuó registrando la actividad eléctrica durante otros cinco días bajo estas nuevas condiciones. Los experimentos en los que se detectó ingreso de luz durante esta fase fueron descartados del análisis. Al finalizar el protocolo, los peces fueron devueltos a sus piscinas de alojamiento y las arenas experimentales fueron reacondicionadas para un nuevo grupo de animales. Los experimentos fueron realizados entre octubre y marzo (n=10), y en julio (n=2).

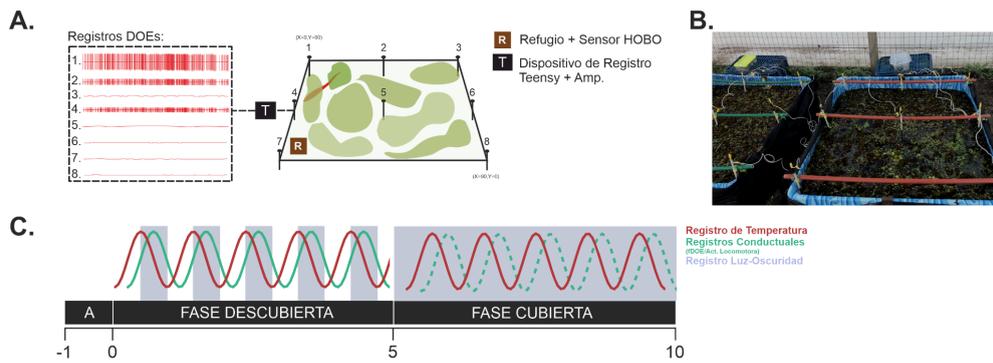


Figura 3.1: Resumen gráfico del diseño experimental. **A.** Esquema del diseño de las arenas experimentales. **B.** Fotografía de una de las piscinas de registro. **C.** Protocolo experimental.

### 3.3. Procesamiento y análisis de datos

Los datos obtenidos de los registros eléctricos, de temperatura y de comportamiento de los animales fueron procesados y analizados para extraer parámetros que permitieran caracterizar sus ritmos diarios bajo diferentes condiciones experimentales. A continuación se describen los procedimientos aplicados para obtener la frecuencia de descarga del órgano eléctrico (fDOE), estimar la actividad locomotora y el uso del espacio, procesar los datos de temperatura y realizar los distintos análisis de ritmicidad. Todo el procesamiento y análisis de datos fue realizado en Python utilizando códigos *ad hoc* o librerías ya existentes detalladas en el texto.

#### *Obtención de la fDOE:*

En cada archivo WAV correspondiente a 1 minuto de registro se normalizó la amplitud de cada canal por su amplitud máxima y se corrigió la línea de base mediante la sustracción de la mediana por canal. Luego se combinaron los ocho canales en una única señal compuesta sumando los cuadrados de cada uno. A esta señal combinada se le aplicó un filtro de z-score y se identificaron las DOEs como eventos de alta amplitud con una distancia mínima entre picos de 150 muestras. La frecuencia instantánea (frecuencia entre cada DOE) fue calculada como el inverso del tiempo entre una y otra. A esta frecuencia se le aplicó un filtro de pasabanda entre 6 y 70 Hz. Para cada registro de minuto se obtuvo la mediana y la desviación estándar de la frecuencia de descarga del órgano eléctrico (fDOE). Los resultados fueron almacenados en un único archivo por animal que incluye la fDOE minuto a minuto, junto con información sobre fecha, hora y condición experimental. A

estos valores de fDOE se les realizó una corrección por los cambios metabólicos dependientes de la temperatura. Esta corrección (Q10) ajusta los datos a una temperatura estable de 20°C y se realizó según la ecuación E1, siguiendo a Dunlap y cols. 2000 y Silva y cols. 2002:

$$fDOE_{Q10}(t) = fDOE(t) * 1,5^{\frac{20-T(t)}{10}} \quad (1)$$

Donde  $fDOE_{Q10}$  es la frecuencia corregida, fDOE la frecuencia original y T la temperatura en cada tiempo (t). Estos valores de  $fDOE_{Q10}$  corregidos fueron los luego utilizados en el análisis de datos y serán a los que nos referimos al hablar de fDOE.

Para realizar el análisis de Cosinor se utilizaron las medianas de la fDOE por hora. En el resto de los análisis de ritmicidad (Lomb-Scargle, Hilbert, Wavelet) y con el objetivo de estudiar los ritmos con períodos en el rango de interés (12 a 48 hs) se aplicó un filtro pasabanda (*Butterworth* de segundo orden) con frecuencias de corte entre 0,25 y 10 ciclos por día (equivalente a 1/5760 y 1/144 Hz), a fin de eliminar componentes de muy baja frecuencia y ruido de alta frecuencia en la señal. Un ejemplo de la señal original y filtrada en cada condición experimental se puede ver en la figura 3.2A.

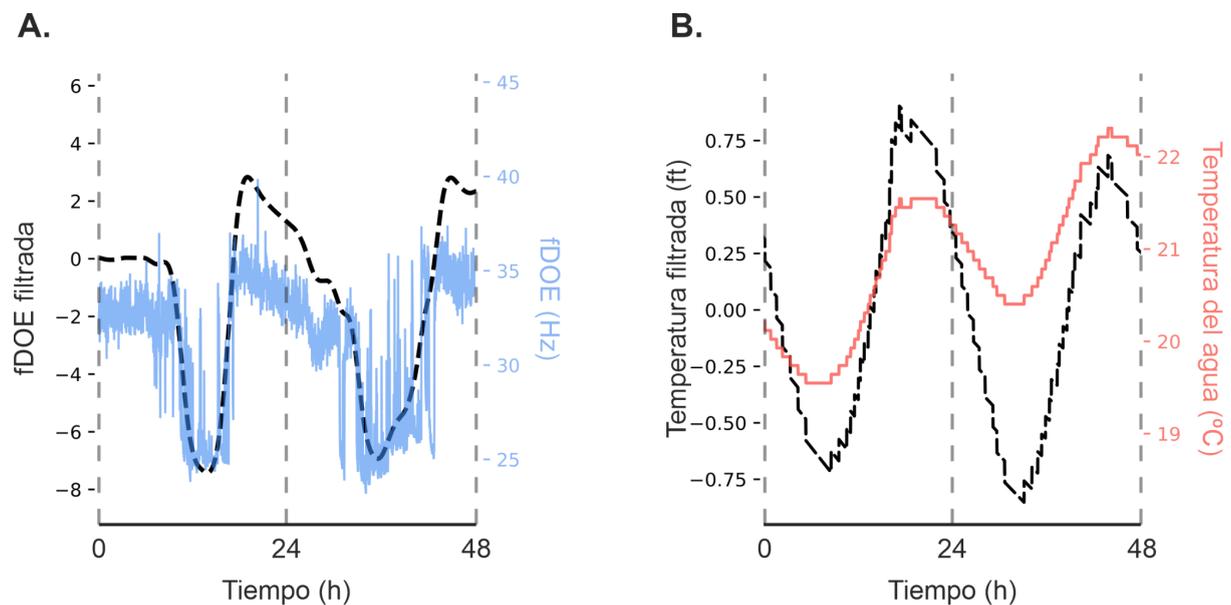


Figura 3.2: **A.** Señal de fDOE original (línea azul) y filtrada (línea negra discontinua) durante 48hs. **B.** Temperatura del agua original (línea rosa) y filtrada (línea negra discontinua) durante 48hs.

#### *Estimación de la actividad locomotora:*

Para obtener un parámetro de movimiento los archivos WAV se segmentaron en ventanas consecutivas de 5 segundos de duración. Para cada ventana se calculó la mediana del valor absoluto de la amplitud de la señal en cada canal. A partir de estas medianas se identificó el canal con mayor actividad, interpretado como una estimación de la posición del pez dentro de la grilla. Se consideró que ocurrió un evento de movimiento cuando el canal con mayor amplitud cambiaba respecto a la ventana anterior, lo que se interpretó como un desplazamiento del animal. La cantidad de eventos de movimiento para cada minuto de registro se almacenaron en archivos CSV que incluyen la fDOE, información sobre fecha, hora y condición experimental. Los datos de locomoción se muestran como el porcentaje de movimiento, que se obtuvo dividiendo el número de ventanas con entre el número de ventanas totales.

#### *Estimación del uso del espacio:*

Los archivos de grabación fueron segmentados en ventanas consecutivas de 5 segundos de duración. Para cada ventana se calcularon los valores de la amplitud absoluta de la señal en cada canal. A partir de estos valores, se identificaron los dos electrodos que registraron una mayor amplitud, asumiéndose como los más cercanos a la posición del animal en ese momento. Con el objetivo de representar la probabilidad espacial de presencia se asignaron pesos relativos a 3 puntos: 1 para el electrodo de mayor amplitud, 0.25 para el segundo y 0.5 para el punto medio entre ambos. Estos pesos fueron acumulados para cada posición espacial en todas las ventanas del archivo. Finalmente, los conteos acumulados fueron normalizados dividiendo por el total de peso registrado en cada archivo, resultando en una métrica proporcional de uso del espacio.

#### *Obtención y procesamiento de información de la temperatura:*

Los datos de temperatura fueron extraídos de los sensores utilizando el software HOBOWare TM. Los datos se promediaron por hora del día para observar patrones diarios en la temperatura del agua. También se calculó la amplitud térmica de cada experimento y cada condición. Para esto se tomaron los valores máximos y mínimos de temperatura de cada día para cada experimento, y se promediaron. Luego se obtuvo la diferencia entre los máximos y mínimos medios. Para calcular la

estabilidad del termociclo, se utilizó la variabilidad entre días (IS, de *interdaily Stability*, según Van Someren y cols. 1999).

La temperatura ambiental presenta fluctuaciones diarias sumadas a otros cambios no-rítmicos (e.g.: tendencias dadas por cambios en las temperaturas medias, que pueden resultar en cambios de amplitud no relacionados con el ritmo diario. Estos pueden alterar los resultados obtenidos por los métodos ritmométricos, por lo que para estudiar la relación entre el termociclo y el ritmo de fDOE se optó por realizar un filtro a los datos de temperatura. Para cada pez y condición experimental se ajustó un polinomio  $P(t)$  de 6º orden a la serie temporal de temperatura. El orden del polinomio se eligió como un compromiso entre la fidelidad al ciclo térmico y el suavizado de las fluctuaciones de mayor frecuencia. Posteriormente, se sustrajo el polinomio ajustado de la señal original, obteniendo así una serie corregida de temperatura, denominada "ft":

$$ft(t) = T(t) - P(t) \quad (2)$$

La figura 3.2B muestra un ejemplo de la serie temporal de temperatura original y los valores filtrados.

#### *Análisis de cosinor:*

Para evaluar la presencia de ritmos diarios en las series temporales de fDOE y actividad locomotora se aplicó un análisis de Cosinor de componentes múltiples (Cornelissen 2014) utilizando la librería de Python CosinorPy (Moškon 2020). Este análisis consiste en ajustar una función sinusoidal de la siguiente forma:

$$Y(t) = M + \sum_{i=1}^n A_i * \cos\left(\frac{2\pi t}{T} + \phi_i\right) \quad (3)$$

Donde M representa el mesor (media ajustada por el ritmo), A la amplitud del ritmo,  $\phi$  la acrofase (máximo del ajuste), T el período y n el número de componentes del modelo. Para testear la periodicidad diaria se limitó el modelo a un período de 24 h. Para cada animal se crearon modelos de 1,2 y 3 componentes sinusoidales. Se seleccionó el modelo con mejor ajuste utilizando el test de suma de cuadrados extra F:

$$F = \left(\frac{SSR_1 - SSR_2}{SSR_2}\right) * \left(\frac{GL_1 - GL_2}{GL_2}\right)^{-1} \quad (4)$$

Donde  $SSR_1$  y  $SSR_2$  son las sumas de residuos cuadrados para los dos modelos comparados y  $GL_1$  y  $GL_2$  son los grados de libertad para cada modelo respectivamente.

Se conservó un modelo por pez y por condición y posteriormente se compararon los parámetros estimados (acrofase, mesor y amplitud), así como el ajuste del modelo ( $R^2$ ) entre condiciones experimentales. Para estudiar diferencias en  $R^2$ , mesor y amplitud se utilizaron test de t pareados ( $R^2$ ) y test de Wilcoxon (mesor y amplitud), dependiendo de si los datos seguían una distribución normal o no. Para estudiar diferencias en las acrofases se aplicaron test de Rayleigh para evaluar si las fases se distribuían aleatoriamente o mostraban una agrupación significativa y se usó la prueba de Watson-Williams de medias circulares para comparar la acrofase entre condiciones experimentales.

#### *Análisis de Lomb-Scargle:*

Para analizar la periodicidad de los ritmos de fDOE y locomoción se crearon periodogramas de Lomb-Scargle (Refinetti y cols. 2007, VanderPlas 2018) utilizando la librería AstroPy (The Astropy Collaboration 2022). A diferencia de la transformada de Fourier tradicional, el método de Lomb-Scargle permite estimar la densidad espectral de potencia sin requerir una interpolación uniforme de la serie temporal. A su vez, este análisis permite acotar el rango de frecuencias de interés con más facilidad y precisión. Este análisis consiste en ajustar senos y cosenos de distintas frecuencias a los datos y medir cuán buena es la correspondencia a cada frecuencia por mínimos cuadrados, de la forma:

$$P(\omega) = \frac{1}{2} * \left( A^2 \sum_i \cos^2(\omega t'_i) + B^2 \sum_i \sen^2(\omega t'_i) \right) \quad (5)$$

Donde  $P(\omega)$  es la potencia espectral para la frecuencia  $\omega$ , A y B son las amplitudes de los componentes seno y coseno respectivamente y  $t'$  es el tiempo con un corrimiento de fase en caso de datos que no fueron tomados de forma uniforme en el tiempo.

Para cada combinación de pez y condición, se calculó la potencia espectral en un rango de frecuencias correspondientes a períodos entre 1 y 48 horas muestreadas linealmente con 10.000 puntos, lo que contempla ritmicidad infra, circa y ultradiana. Se identificó el período de oscilación dominante (aquel asociado a la mayor potencia espectral), así como el valor de dicha potencia. La significancia de los períodos dominantes fue evaluada aproximando la tasa de falsos positivos según

el método de Baluev (Baluev, 2008). A su vez, se determinó que un periodograma contaba con un único pico cuando ningún otro período alcanzaba el 50% de la densidad de potencia espectral del pico máximo.

*Análisis de fase por transformadas de Hilbert:*

Para complementar el análisis espectral y explorar la relación temporal entre las oscilaciones de fDOE y temperatura, se analizaron las fases de ambos ritmos a través de el uso de transformadas de Hilbert, que permite obtener la fase instantánea de una señal oscilatoria. Esta técnica consiste en, dada una señal  $y$ , construir una señal  $\hat{y}(t)$  corrida de fase  $90^\circ$  de la forma:

$$\hat{y}(t) = \frac{1}{2}PV * \int_{-\infty}^{\infty} \frac{y(\tau)}{t-\tau} d\tau \quad (6)$$

Donde PV es el valor principal de Cauchy y  $\tau$  una variable muda. Con la señal original y su transformada se puede construir la señal analítica:

$$z(t) = y(t) + i * \hat{y}(t) \quad (7)$$

Donde la señal original  $y$  es el componente real de la función compleja  $z(t)$ , mientras que la transformada representa el componente irracional de la función. Trabajar con esta señal analítica nos permite obtener la fase instantánea  $\phi$  de la forma:

$$\phi(t) = \arg(z(t)) = \arctan2(\hat{y}(t), y(t)) \quad (8)$$

Para este análisis se utilizó la función hilbert incluida en la librería SciPy (Virtanen y cols. 2020). Se obtuvieron las fases instantáneas de la fDOE de cada animal en cada condición y de la temperatura durante esos períodos de tiempo. El desfase entre fDOE y temperatura se calculó como la diferencia de fase entre ambas señales a lo largo del tiempo, promediando luego ese valor para obtener un desfase medio. Para evaluar la variabilidad en el defasaje medio se utilizó el valor del vector medio o *Mean Resultant Length* (MRL). Este consiste en convertir las fases angulares en puntos cartesianos y sumar los vectores de la forma:

$$MRL = \frac{1}{N} \left( \sum_i^N e^{i\theta_i} \right) \quad (9)$$

Donde  $N$  es el número de valores y  $e^{i\theta_i}$  es la representación en forma compleja de cada fase en el círculo unitario. El vector resultante puede tomar valores de 0 a 1. Valores más altos de MRL implican fases más cercanas entre sí y por lo tanto una menor variabilidad en los datos.

#### *Análisis de Wavelets:*

En último lugar, para evaluar la estabilidad de la periodicidad de los ritmos de fDOE de animales sujetos a termociclos con dinámicas diferentes, se optó por utilizar un análisis de tiempo-frecuencia de Transformada de Wavelets Continua (TWC).

La TWC es una convolución de nuestra señal original con una *wavelet madre* de parámetros conocidos, que permite descomponer una señal temporal en sus componentes de frecuencia de forma local en el tiempo, proporcionando así una representación tiempo-frecuencia de la serie analizada. La transformada  $W(a,b)$  puede definirse como:

$$W(a, b) = \frac{1}{\sqrt{a}} * \int_{-\infty}^{\infty} x(t) \bar{\Psi}\left(\frac{t-b}{a}\right) dt \quad 10)$$

Donde  $\bar{\Psi}$  es el conjugado complejo de la función wavelet madre,  $a$  es la escala de esta wavelet madre (un coeficiente inversamente proporcional a la frecuencia) y  $b$  es el parámetro de traslación temporal. Para cada instante se obtienen la energía de la señal para cada escala  $a$ , lo que nos permite observar el aporte de cada componente periódico a la señal original en cada momento del tiempo. Luego se identifica, para cada instante de tiempo, la escala  $a$  que maximiza la energía de la señal.

Para realizar este análisis se utilizó la librería PyWavelets (Lee y cols. 2019). En este análisis solo se utilizaron datos de fDOE y temperatura durante la condición cubierta de cada animal. Como wavelet madre se utilizó la wavelet compleja de Morlet, que combina una función gaussiana con una oscilación sinusoidal. Se definieron 300 escalas linealmente espaciadas entre los valores correspondientes a períodos de entre 1 y 48 h. A partir de la matriz de coeficientes de la TWC, se identificó para cada tiempo el período dominante de oscilación, correspondiente al valor de escala de máxima energía (*ridge* o relieve de la wavelet).

Los períodos dominantes de fDOE y temperatura fueron promediados cada 2 horas para suavizar las series y para cada individuo se calculó la media y el coeficiente de variación de los períodos dominantes obtenidos tanto para la fDOE como para la temperatura. Se agruparon los peces según

el ritmo de temperatura bajo el cuál estuvieron sujetos: un termociclo simple con un único componente circadiano (TS) y un termociclo complejo con un componente circadiano y un componente infradiano (TC). Finalmente se comparó el período medio y la variabilidad entre grupos.

*Estadística general:*

Diferentes tests estadísticos fueron utilizados para evaluar significancia dependiendo de las características de los datos. La normalidad de los datos fue testeada utilizando el test de Shapiro-Wilk. De cumplir normalidad las diferencias entre grupos experimentales fueron evaluadas utilizando test de t pareados o independientes. Para estudiar el efecto de múltiples variables en una variable dependiente se utilizaron ANOVA multivariados seguidos de un test de Tukey (corrección de Bonferroni) para comparaciones múltiples. En estos casos los datos poblacionales se muestran como media  $\pm$  SEM. De contar con datos distribuidos de forma no uniforme, se trabajó con tests U de Mann-Whitney (datos no pareados) o tests de Wilcoxon (datos pareados). Para evaluar diferencias entre más de 2 grupos de datos no-paramétricos se utilizó el Test de Friedman. En estos casos los datos se muestran como mediana  $\pm$  CI (95%).

## **4. Vínculo entre el ritmo diario de temperatura ambiental y la fDOE**

### **4.1. Objetivos específicos**

1. Validar el diseño experimental para estudiar la relación entre la conducta y los ritmos ambientales naturales.
2. Estudiar la expresión del ritmo diario de fDOE en condiciones seminaturales con y sin acceso al ciclo ambiental de luz y oscuridad.
3. Comparar cuantitativamente los ritmos de fDOE y temperatura.

### **4.2. Resultados**

Este capítulo presenta un análisis detallado de los ritmos diarios en la frecuencia de descarga del órgano eléctrico (fDOE) de *Gymnotus omarorum*. Se examina la expresión de estos ritmos tanto en condiciones seminaturales bajo la influencia de la luz natural (condición descubierta) como en condiciones de oscuridad absoluta (condición cubierta). Se analiza la presencia de ritmicidad diaria, su relación con variables ambientales y cómo la eliminación de la información lumínica puede afectar la sincronización de estos ritmos. A través de modelos estadísticos y matemáticos, como el análisis de cosinor y periodogramas de Lomb-Scargle, se busca entender la plasticidad y la estabilidad de los ritmos de fDOE en relación con el entorno.

#### *Descripción de las variables ambientales en condiciones seminaturales.*

Para caracterizar las condiciones ambientales bajo las cuales se desarrollaron los experimentos, se registraron simultáneamente temperatura y luz en cada una de las piscinas experimentales bajo ambas condiciones experimentales (Figura 4.1). Durante la condición descubierta, tanto la temperatura como la luz mostraron ciclos diarios bien definidos. La temperatura alcanzó valores máximos hacia la media tarde que coincidieron con los momentos de “atardecer”. La luz en cambio alcanzó valores máximos cerca del mediodía (Fig. 4.1C). Al cubrir las piscinas se eliminó por completo la entrada de luz al sensor, pero la temperatura continuó ciclando. La eliminación del ciclo de luz-oscuridad tuvo un efecto amortiguador sobre la amplitud del termociclo (Fig. 4.1D; test pareado de t:  $p < 0.0001$ ). Durante la condición descubierta la amplitud térmica fue de  $2,0^{\circ}\text{C} \pm 0,13^{\circ}\text{C}$  y al cubrir las piscinas este disminuyó a  $1,12^{\circ}\text{C} \pm 0,12^{\circ}\text{C}$ . Sin embargo, esta reducción de amplitud no se tradujo en una menor estabilidad del ciclo. La variabilidad entre días (IS, Fig. 4.1E)

no presentó diferencias significativas, con valores medianos de 0.23 durante la condición descubierta y 0,19 durante la cubierta (test de Wilcoxon:  $p=0,9$ ). Estos valores parecen ser menores de los obtenidos para la temperatura del aire durante este período de tiempo por el INUMET en la estación climática más cercana (Ver Anexo 1).

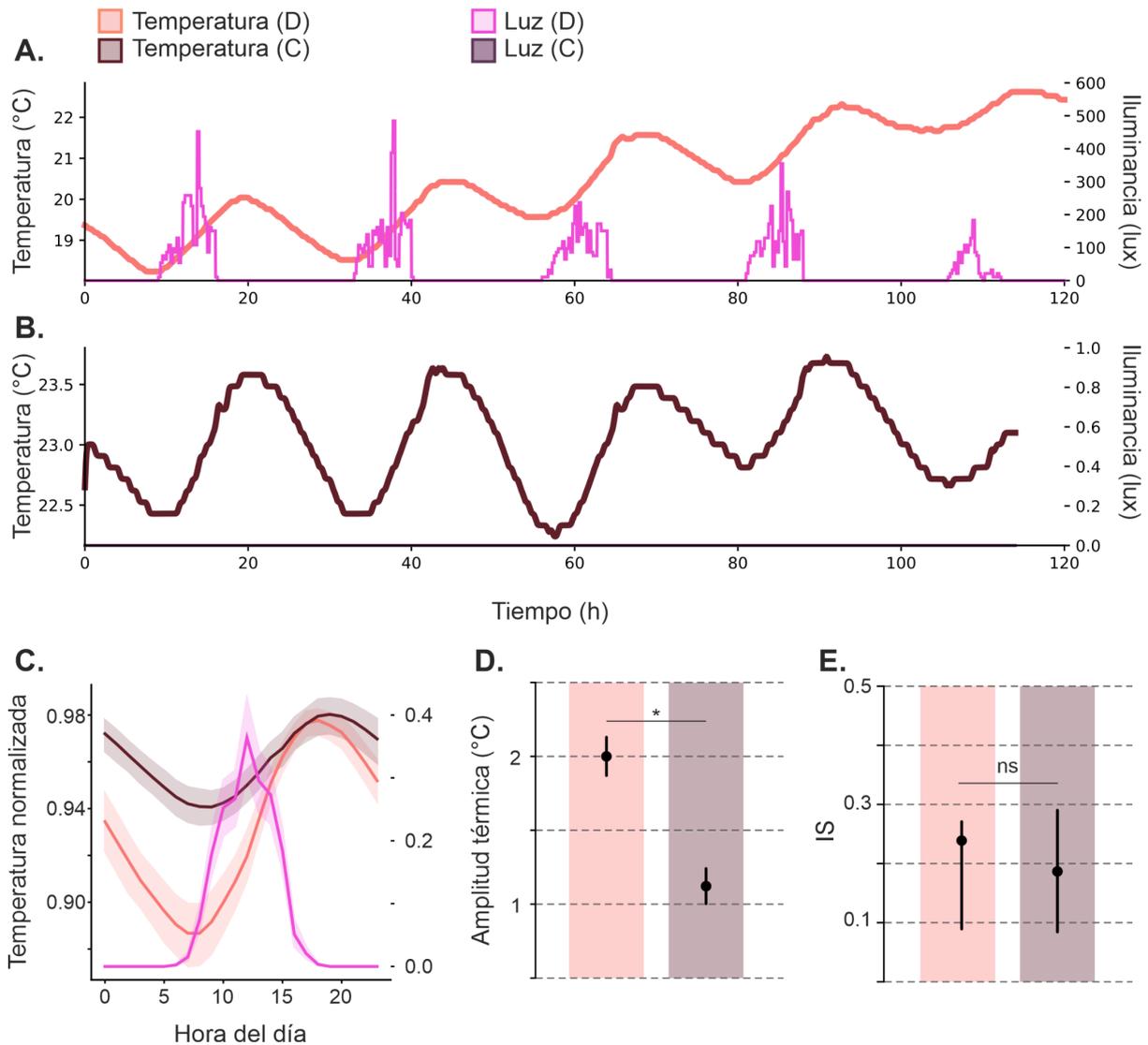


Figura 4.1: Variación temporal de temperatura y luz en las arenas experimentales bajo las condiciones experimentales descubiertas (D) y cubiertas (C). **A.** Ejemplo representativo de los registros continuos de temperatura e iluminancia en la condición D. **B.** Ejemplo representativo de los registros de temperatura e iluminancia en la condición C. **C.** Promedio por hora de la temperatura y la iluminancia normalizadas para cada condición. **D.** Comparación de la amplitud diaria de la temperatura entre condiciones (media  $\pm$  SEM). El asterisco indica diferencia significativa ( $*p < 0.05$ ). **E.** Comparación del índice de estabilidad entre días (IS) de la temperatura entre condiciones (mediana  $\pm$  CI). “ns” indica que no hubo diferencias significativas.

### *Descripción de los ritmos diarios en fDOE en condiciones seminaturales*

Esta primera sección de resultados describe un aspecto de la conducta eléctrica de *G. omarorum*, la regulación diaria de la fDOE, en las condiciones seminaturales diseñadas para estos experimentos. La figura 4.2 muestra los valores de fDOE a lo largo del tiempo durante los 5 días de la condición descubierta para un animal representativo. Se observan cambios en la fDOE consistentes a lo largo de los días. Estos consisten de un aumento gradual de la fDOE durante el día, seguido de un aumento puntual y pronunciado tras el anochecer. El animal mantuvo su fDOE alta durante la noche, pero se observa una disminución gradual al avanzar. Cerca del amanecer se observa una disminución pronunciada, opuesto a lo observado durante el anochecer.

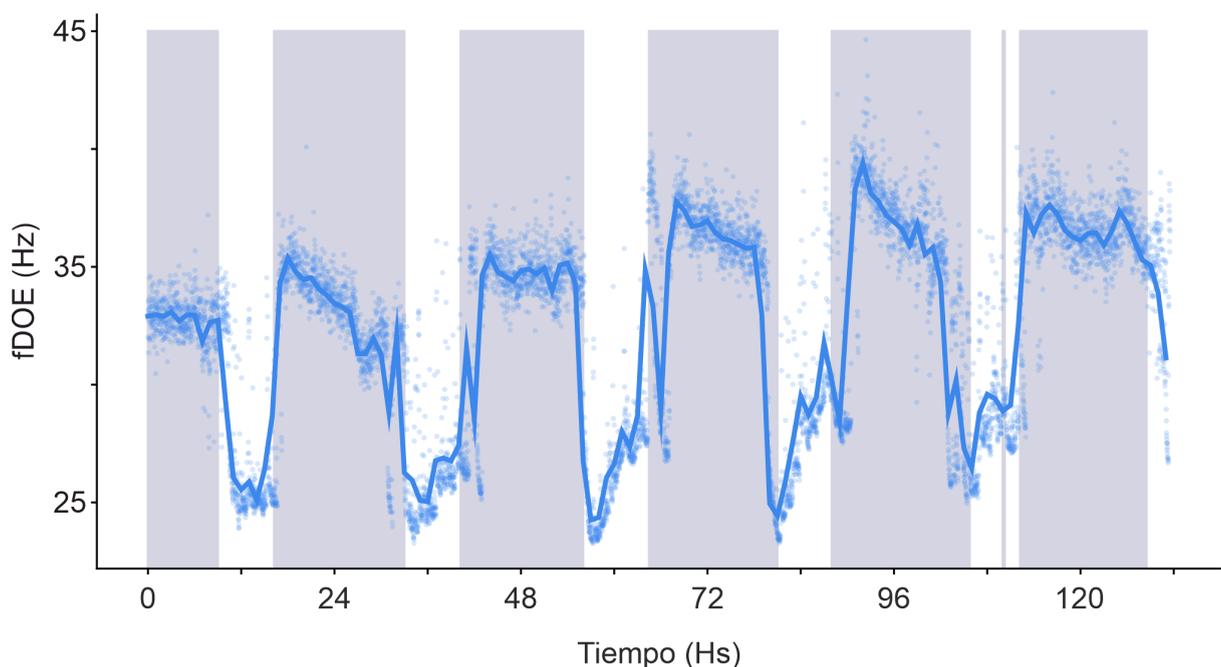


Figura 4.2: Curso temporal de la fDOE de un animal durante 5 días consecutivos bajo la condición descubierta. Los puntos azules representan las medianas para cada minuto y la línea azul continua muestra la mediana por hora. Las franjas sombreadas en gris indican el periodo de oscuridad.

Para estudiar la dinámica temporal de cada animal se construyeron gráficos que muestran la frecuencia mediana de fDOE para cada hora del día, promediando todos los días que duró el experimento. La figura 4.3A muestra estos gráficos para todos los animales ( $n=12$ ). Los animales muestran un patrón global similar, con niveles basales más bajos durante el día y un aumento en algún momento de la tarde. Al observar con más detalle se evidencia mayor heterogeneidad entre individuos. Algunos animales presentaron dinámicas rápidas de aumento al aproximarse el

atardecer, mientras en otros casos el aumento en fDOE se dió de forma gradual a lo largo del día, hasta llegar a un máximo en la tarde. En promedio, la fDOE fue un  $34,1\% \pm 5,6\%$  más alta durante la hora de máxima amplitud (test de t pareado:  $p < 0,0001$ ).

Para cuantificar los cambios se calculó la fDOE mediana de todo el período experimental para cada animal y se comparó la mediana de cada hora contra este valor global. La figura 4.3B muestra una matriz de diferencias entre la fDOE mediana global y la fDOE mediana de cada hora para todos los animales. Valores negativos (por debajo de la mediana global) se muestran en azul y positivos (por encima de la mediana global) en rojo. Se cuantificó mediante tests U de Mann-Whitney y las diferencias significativas se muestran con asteriscos. 10 de los 12 animales estudiados muestran valores que se alejan significativamente de la mediana. Estas diferencias se observan tanto en la mañana, con valores significativamente menores, como en la noche, con valores significativamente mayores. Dos animales (peces 1 y 2) no se diferencian estadísticamente de la mediana a ninguna hora del día. Esto puede deberse a dos razones: 1) la magnitud del cambio es baja debido a que ambos animales mantuvieron valores relativamente bajos de fDOE durante todo el período, o 2) hay más variabilidad en los momentos en los que los animales incrementan o disminuyen su fDOE, evidenciado también por el error alto mostrado por estos individuos (primeros 2 gráficos) en la figura 4.3A.

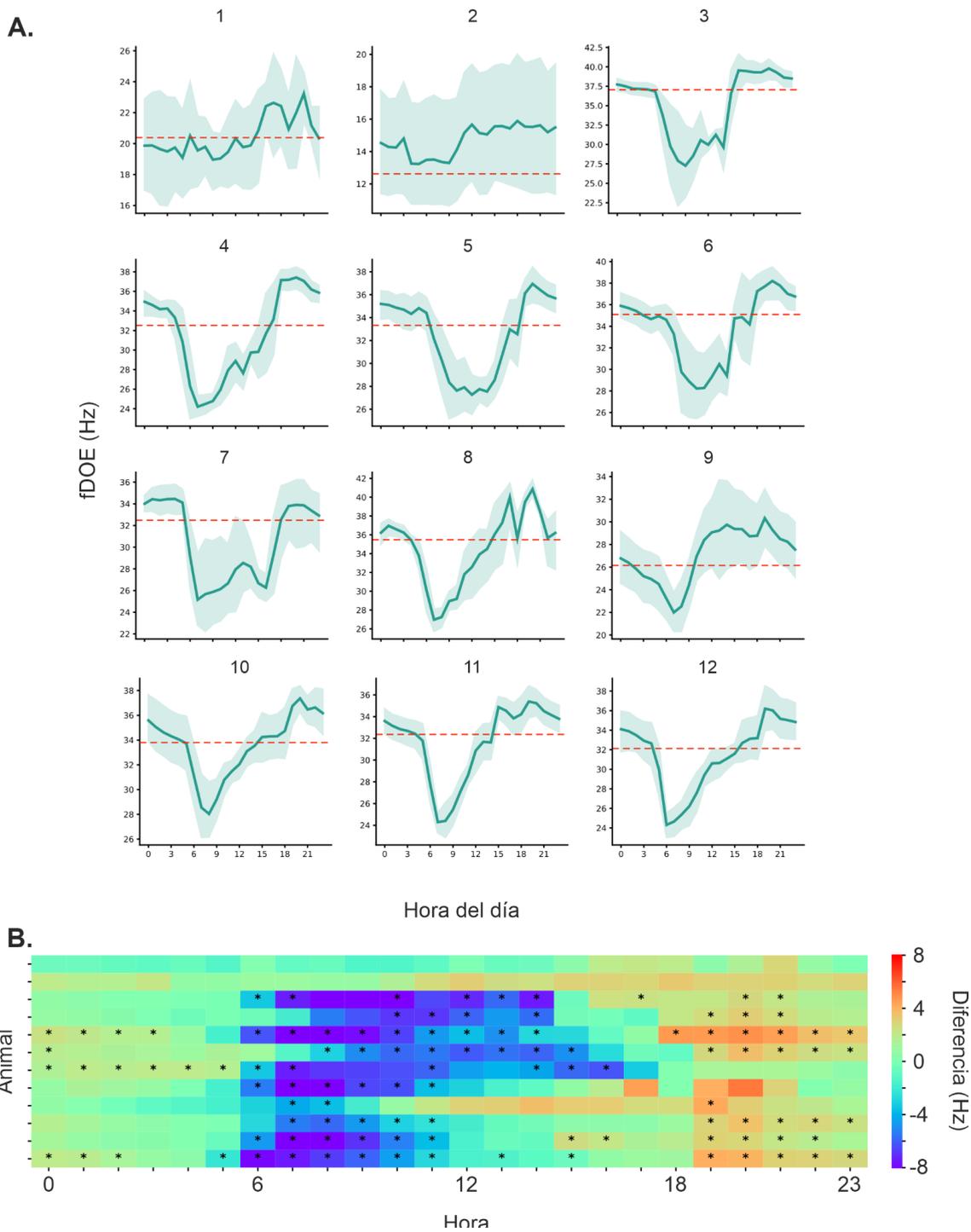


Figura 4.3: fDOE de todos los animales a diferentes horas del día. **A.** Mediana de la fDOE por hora para cada animal. La zona bandeada representa el IC. La línea roja marca la fDOE mediana global en cada caso. **B.** Mapa de calor mostrando la diferencia entre la mediana de la fDOE calculada por hora y la mediana global. Las columnas marcan las horas del día y cada fila representa un animal. Los asteriscos marcan horas en las que las diferencias son estadísticamente significativas (test U de Mann-Whitney: umbral de significancia  $p < 0.05$ )

Este tipo de análisis es útil para determinar patrones de cambio, pero no es capaz de afirmar ni descartar la presencia de componentes rítmicos en una serie temporal. Para determinar esto, en primer lugar se realizó un análisis de Cosinor. Para analizar el ajuste de los datos a un período de

24hs, se construyeron modelos de cosinor de 1-3 componentes y con un período de 24hs. Todos los animales ajustaron un modelo de cosinor, cuyos parámetros se encuentran en la tabla 4.1. La figura 4.4 muestra el modelo de cada animal respectivamente. Este análisis nos permite afirmar que, en las condiciones seminaturales aplicadas, *G. omarorum* expresa un ritmo diario en su fDOE.

Los resultados también revelan ciertas similitudes y diferencias en la expresión de los ritmos entre animales. En primer lugar, el ajuste ( $R^2$ ) de los modelos fue variable entre individuos. En 10 de estos animales este fue mayor a 0,4, mientras que en dos de ellos (peces 1 y 2) estuvo por debajo de este valor. El ajuste promedio fue de  $0,46 \pm 0,065$ . La acrofase (el punto máximo del modelo) se encontró entre las 21:34 y las 03:21. Para determinar si las acrofases se encontraban distribuidas de forma uniforme se realizó un Test de Rayleigh y se confirmó una dirección preferencial (test de rayleigh: MRL=0,97;  $p=7.88e-04$ ) con una acrofase media en las 19:54 h. La amplitud mediana del ritmo fue de  $4,63 \pm 0,52$  Hz y el MESOR de  $28,93 \pm 1,76$  Hz.

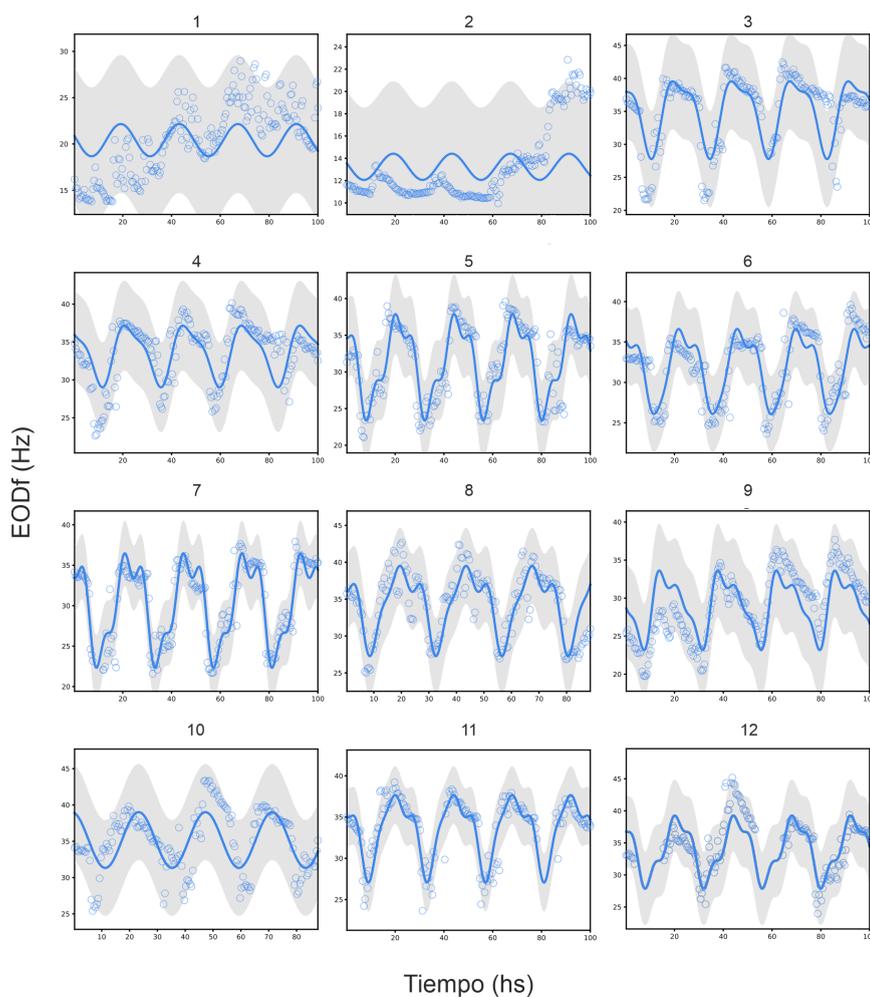


Figura 4.4: Modelos de cosinor de la fDOE de cada animal. Se construyeron modelos con 1, 2 y 3 componentes para cada animal y se conservaron los modelos con mejor ajuste. En la figura se muestran estos modelos óptimos. Las líneas azules muestran el modelo en cada caso y los puntos marcan los datos crudos. El sombreado representa el intervalo de confianza

<b>Pez</b>	<b>n°</b>	<b>F</b>	<b>p&lt;</b>	<b>R2</b>	<b>Amplitud (Hz)</b>	<b>Acrofase (rad)</b>	<b>Acrofase (h)</b>	<b>MESOR (Hz)</b>
1	1	10,03	0,0001	0,07	1,35	1,23	19,32	20,44
2	1	4,39	0,01	0,03	1,14	1,47	18,40	14,71
3	2	177,35	0,0001	0,58	6,16	1,29	19,08	33,78
4	2	143,24	0,0001	0,53	4,81	1,04	20,04	33,04
5	3	339,55	0,0001	0,72	6,99	0,96	20,32	31,03
6	2	204,39	0,0001	0,61	4,78	0,64	21,57	31,44
7	3	119,11	0,0001	0,48	5,24	-0,88	3,36	30,23
8	3	185,32	0,0001	0,68	6,12	1,18	19,51	33,39
9	3	73,75	0,0001	0,29	3,67	2,72	13,60	26,18
10	3	162,78	0,0001	0,39	4,26	0,77	21,05	32,86
11	3	447,72	0,0001	0,65	5,35	1,03	20,08	29,91
12	3	250,90	0,0001	0,51	5,68	0,92	20,47	30,20

Tabla 4.1: Parámetros de los modelos de cosinor óptimos para todos los animales. La columna n° marca el número de componentes cosenoidales del modelo.

#### *Efecto de la eliminación de la luz en la expresión del ritmo de fDOE*

Una vez establecida la ritmicidad de la fDOE en condiciones seminaturales, nos propusimos analizar si impedir el acceso de los animales al ciclo natural de luz-oscuridad generaba cambios en la expresión del ritmo. Para ello hicimos una comparación de las condiciones descubierta y cubierta para los mismos animales. La figura 4.4 muestra la fDOE en el tiempo para el mismo animal que en el caso de la figura 4.2, pero esta vez durante el período en el cuál la arena experimental se mantuvo cubierta. Bajo estas condiciones, el animal mantuvo una dinámica en su fDOE muy similar a la observada durante la condición descubierta.

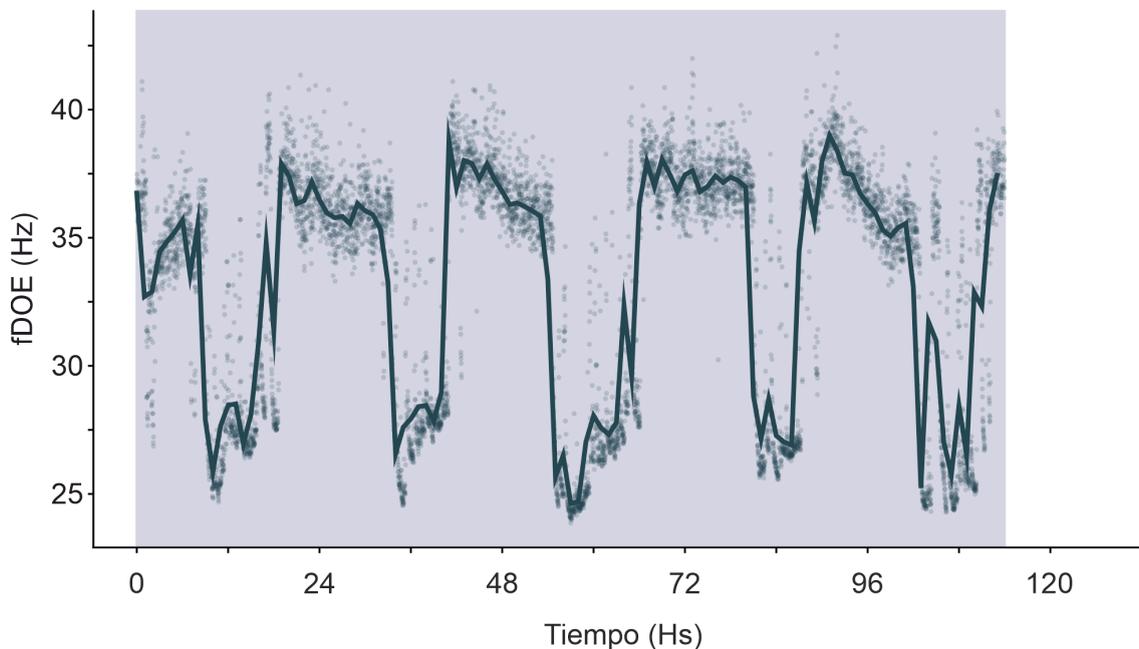


Figura 4.5: Curso temporal de la fDOE de un animal durante 5 días consecutivos bajo la condición cubierta. Los puntos azules representan las medianas para cada minuto y la línea azul continua muestra la mediana por hora.

La dinámica diaria de todo el grupo de individuos bajo la condición de oscuridad absoluta puede observarse en la Fig. 4.6A. Como en el caso anterior, se comparó la mediana de la fDOE para cada hora contra la mediana global (Fig. 4.6B). Durante la fase cubierta los 12 animales presentaron momentos del día en el cuál la fDOE difería de la mediana (Test U de Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ). Se encontró una correlación positiva fuerte entre las matrices de las condiciones D y C (correlación de Spearman:  $r = 0,76$ ,  $p < 0,001$ ), lo que sugiere que eliminar la información lumínica no afecta en gran medida este parámetro conductual.

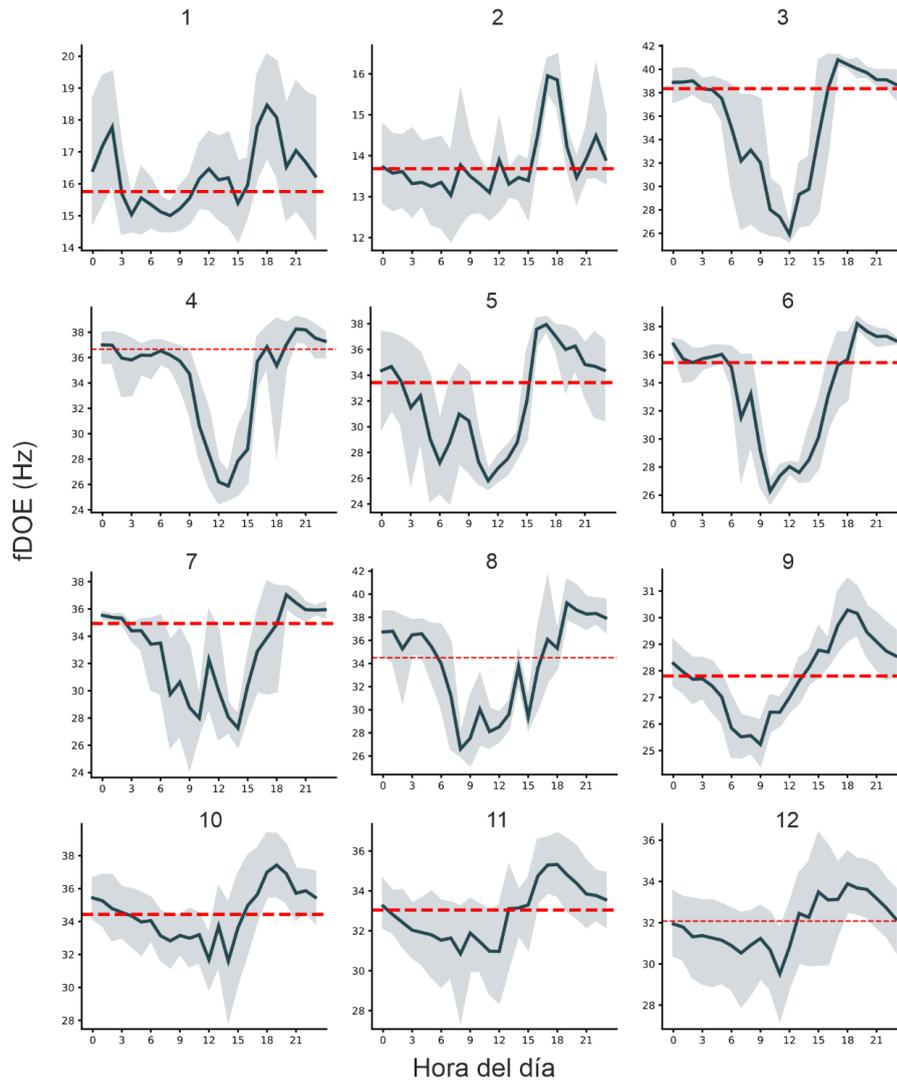
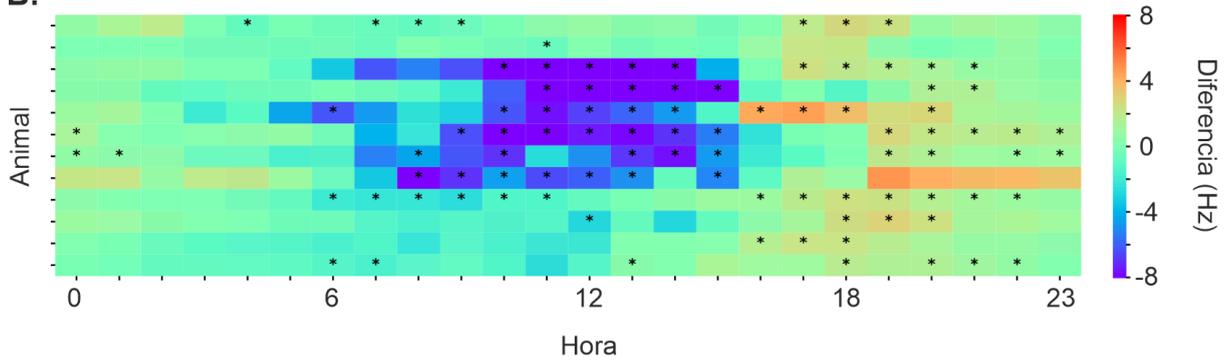
**A.****B.**

Figura 4.6: fDOE de todos los animales a diferentes horas del día durante la fase cubierta. **A.** fDOE mediana por hora para cada animal. La zona bandeada representa el intervalo de confianza. La línea roja marca la fDOE mediana global en cada caso. **B.** Mapa de calor mostrando la diferencia entre la fDOE mediana a cada hora y la mediana global. Las columnas marcan las horas del día y cada fila representa un animal. Los asteriscos marcan horas en las que las diferencias son estadísticamente significativas (test U de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ).

Para comparar patrones poblacionales a mayor escala, se optó por segmentar las 24 horas del día en 4 períodos y comparar los niveles de fDOE entre períodos y condiciones. Los períodos definidos fueron: Día (10 a 16 h), Día-noche (16 a 22 h), Noche (22 a 04 h) y Noche-día (04 a 10 h). La figura 4.7 muestra los resultados de esta comparación. Al realizar un modelo de ANOVA, el momento del día fue la variable que explicó la variación en fDOE en mayor medida ( $F_{(3,80)}=41,42$ ;  $p<0,0001$ ). También se observó un efecto más pequeño de la condición experimental sobre la fDOE ( $F_{(1,80)}=7,23$ ;  $p<0,01$ ). Para cuantificar más precisamente donde se encontraron las diferencias se realizó un test *post-hoc* de Tukey. La fDOE fue significativamente mayor en la noche y en la transición día-noche que en el día ( $p<0,0001$  en ambos casos) y que en la transición Noche-Día ( $p<0,0001$  en ambos casos). No se observaron diferencias entre los períodos Noche y Día Noche ( $p=0,54$ ) ni entre los períodos Día y Noche-Día ( $p=0,82$ ). En cuanto a las diferencias entre condiciones, estas solo se observaron durante el período Noche-Día. Durante la condición cubierta se observó una prolongación del aumento nocturno generando niveles de fDOE más altos que la condición descubierta (Descubierto vs. Cubierto,  $p<0,01$ ). No así para los otros períodos (Día,  $p=0,93$ ; Noche,  $p=0,30$ ; Día-Noche,  $p=0,26$ ).

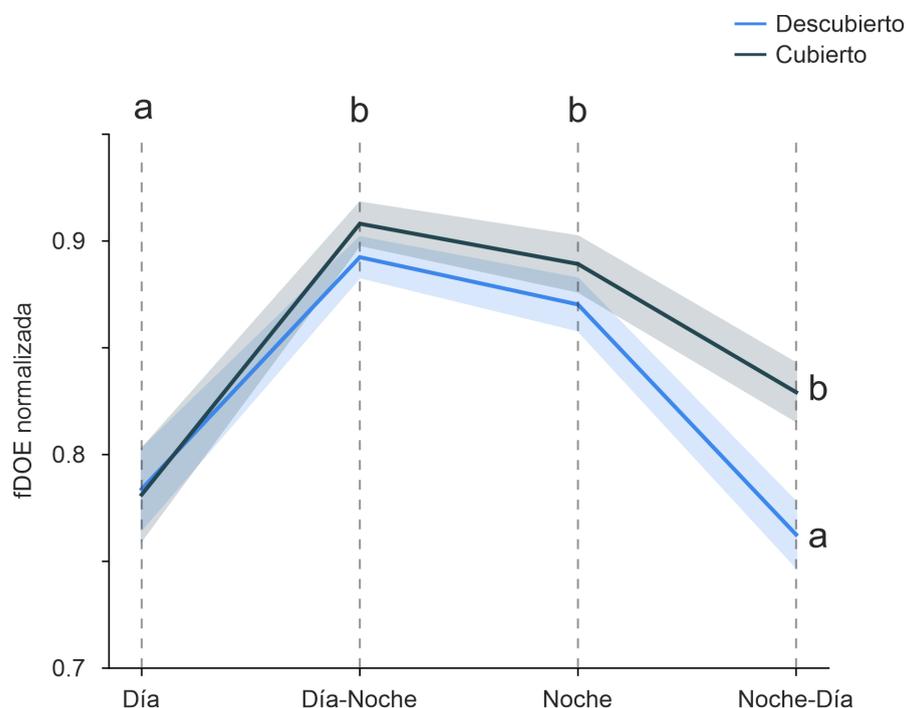


Figura 4.7: fDOE normalizada en cuatro períodos del día para ambas condiciones experimentales. Las 24h del día se subdividieron en Día (10 a 16 h), Día-Noche (16 a 22 h), Noche (22 a 04 h) y Noche-Día (04 a 10 h). Se realizó un Test de ANOVA y se detectó un efecto del momento del día y de la condición experimental (ver texto). Las letras marcan las diferencias estadísticas entre conjuntos de datos (Test post-hoc de Tukey,  $p<0,05$ ).

Para analizar cambios en la ritmicidad ocasionados por la eliminación de la información lumínica se volvieron a construir modelos de cosinor para cada animal con los mismos parámetros (período y n° de componentes). Aún en condiciones de oscuridad absoluta todos los animales ajustaron un modelo con  $p < 0.05$  (Fig. 4.8 y Tabla 4.2).

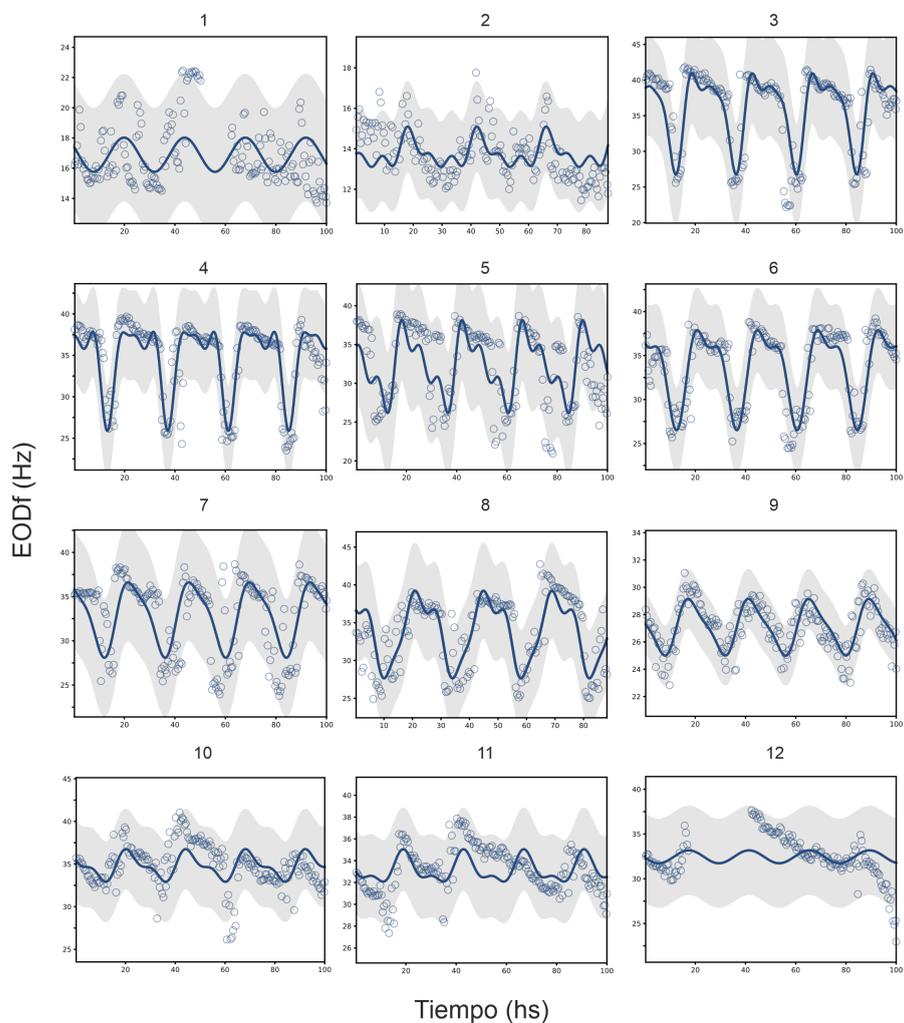


Figura 4.8: Modelos de cosinor de la fDOE de cada animal. Se construyeron modelos con 1, 2 y 3 componentes para cada animal y se conservaron los modelos con mejor ajuste. En la figura se muestran estos modelos óptimos. Las líneas azules muestran el modelo en cada caso y los puntos marcan los datos crudos. El sombreado representa el intervalo de confianza.

Pez	n°	F	p<	R2	Amplitud (Hz)	Acrofase (rad)	Acrofase (hs)	MESOR (Hz)
1	3	23,92	0,0001	0,13	1,55	1,31	18,98	16,27
2	3	22,85	0,0001	0,21	1,00	1,55	18,07	14,10
3	3	156,45	0,0001	0,59	7,11	1,39	18,69	33,95
4	3	198,15	0,0001	0,65	5,95	1,14	19,65	31,81
5	3	89,23	0,0001	0,46	6,00	1,53	18,16	32,16
6	2	240,77	0,0001	0,68	5,57	0,89	20,61	32,30
7	3	75,84	0,0001	0,40	4,03	0,96	20,32	32,94
8	3	129,71	0,0001	0,60	5,79	0,81	20,90	33,44
9	3	199,14	0,0001	0,47	2,32	1,28	19,12	27,73
10	2	36,22	0,0001	0,25	2,21	0,97	20,28	34,58
11	1	33,46	0,0001	0,23	1,76	1,10	19,80	32,86
12	1	24,07	0,0001	0,13	1,48	1,19	19,46	31,97

Tabla 4.2: Parámetros de los modelos de cosinor óptimos para todos los animales durante la condición cubierta. La columna n° marca el número de componentes cosenoidales del modelo.

Además, eliminar la información lumínica no tuvo un efecto significativo sobre el ajuste por cosinor. No se observaron diferencias en el  $R^2$  (Fig 4.9A, test de t pareado:  $p=0,32$ ), ni la amplitud (Fig 4.9B) o el MESOR (Fig. 4.8C) (test de Wilcoxon:  $p=0,11$  y  $p=0,18$  respectivamente). Tampoco en las acrofases de los animales entre condiciones (Fig. 4.9D; Test de Watson Williams para medias circulares,  $p=0,39$ ). La acrofase promedio fue a las 19:40hs durante la condición cubierta y un rango entre las 18:04 h y las 20:54 h. En este caso también las acrofases se encuentran fuertemente direccionadas en el tiempo (test de Rayleigh:  $MRL= 0,77$ ;  $p<0,0001$ ).

Este análisis nos permite determinar que 1) las claves lumínicas no son necesarias para la expresión de los ritmos diarios en fDOE y 2) la eliminación del ritmo luz-oscuridad no afecta en los patrones globales de ritmicidad de *G. omarorum*.

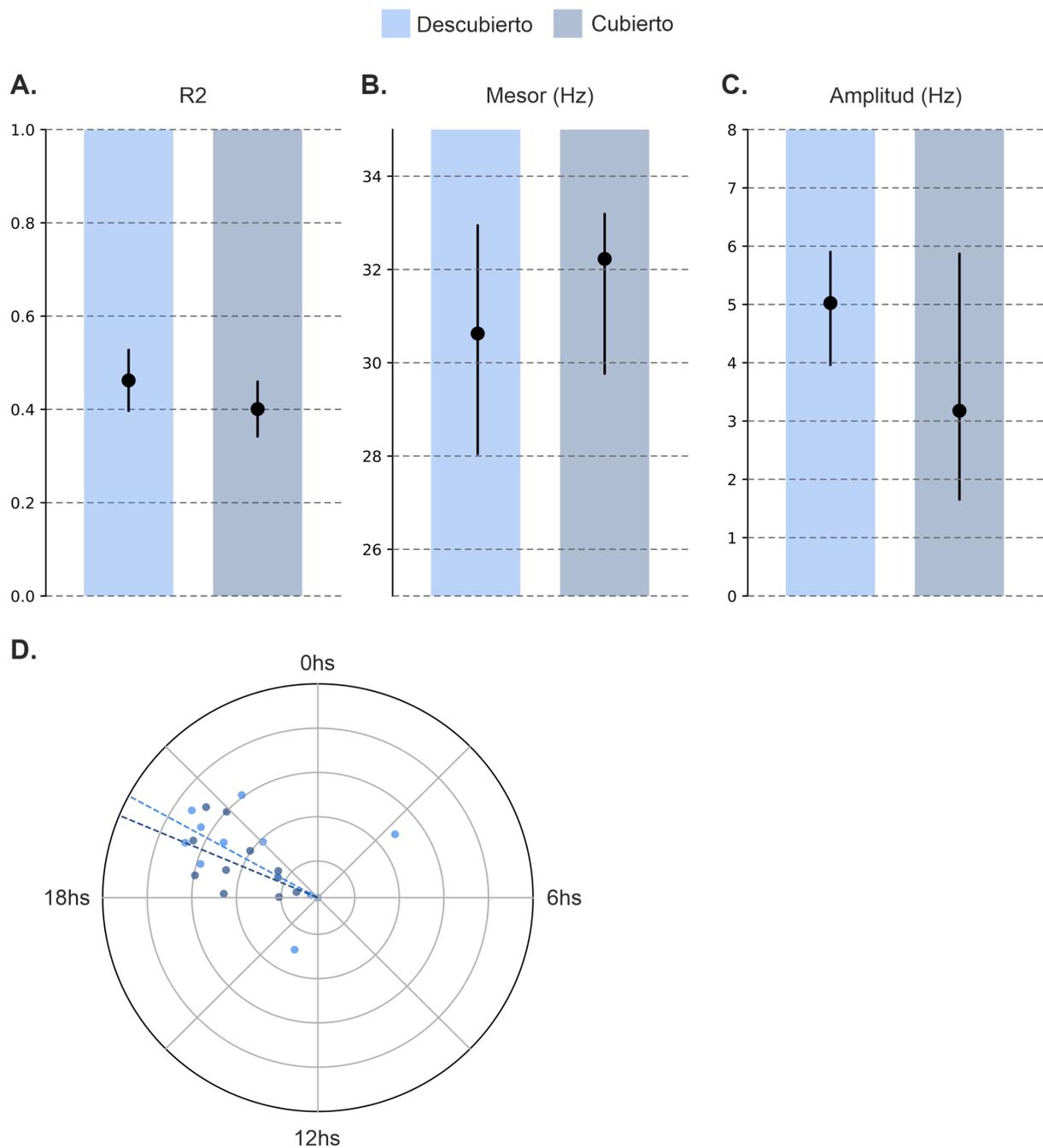


Figura 4.9: Comparación de los parámetros de los modelos de cosinor entre condiciones experimentales. No se observaron diferencias en el  $R^2$  (A), en el mesor (B), ni en la amplitud (C) entre condiciones. D. Acrofasas poblacionales (líneas punteadas) e individuales (puntos) para cada animal en cada condición experimental.

#### *Vínculo entre el ritmo de fDOE y el ritmo de temperatura ambiental.*

Una vez establecida la periodicidad de cada animal en ambas condiciones experimentales, el siguiente paso consistió en estudiar el vínculo entre el ritmo en la fDOE con el termociclo. La figura 4.10 muestra los periodogramas de Lomb-Scargle (PLS) de la temperatura del agua durante ambas

condiciones experimentales. El pico en la densidad espectral corresponde con el máximo componente periódico y por lo tanto se toma como el período dominante del termociclo durante el tiempo estudiado.

Dado que la temperatura ambiente varía naturalmente su ritmo puede contener componentes periódicos adicionales al período circadiano (entre 22 y 26 h). El análisis de PLS nos permitió clasificar los termociclos registrados en dos grandes grupos: termociclos simples (TS), cuando sólo contienen un pico en el rango circadiano y termociclos complejos (TC), cuando aparece un pico adicional en el rango infradiano (Figura 4.10).

Durante la fase descubierta, en 11 de los 12 casos se observaron TSs. En estos casos el período promedio es de 23.84 h con un rango de entre 23.54 y 24.21 h. En el caso restante el TC dió lugar a un periodograma con dos picos: uno en el rango circadiano (22.6 h) y uno con un período infradiano (31 h). Durante la condición cubierta en 7 de los 12 casos registramos un TS (rango: 23.87 a 24.33 h, promedio: 24.11 h) y en los 5 casos restantes registramos TCs, cuyo pico circadiano fue en promedio 23,71 h (rango: 22,07-26,82 h) y su pico infradiano fue en promedio de 33,04 h (rango:28,54-37,44 h).



Para contrastar la ritmicidad en la conducta eléctrica con la del ambiente se construyeron PLS para la fDOE de los animales en ambas condiciones experimentales, que se muestran en la figura 4.11. Durante la condición descubierta 11 de los 12 animales presentaron un único pico en sus periodogramas, que en todos los casos coincidió con el rango circadiano. El período poblacional fue de 24.35 h, con un rango de entre 23.54 y 24.98 h. Un único caso (primer gráfico de la figura 4.11) presentó muy baja densidad espectral y un componente en torno a las 40 h de período solapado a un pico dentro del rango circadiano. Al comparar con los periodogramas del termociclo notamos que este animal, durante la condición descubierta, estuvo sometido a un ritmo de temperatura con dos componentes rítmicos (primer gráfico de la figura 4.10). Durante la fase cubierta, 9 de los 12 individuos presentaron ritmos de fDOE con un único componente. El período de esta subpoblación fue de 23.54 h, con un rango de entre 22.16 y 23.93 h. Los otros 3 animales presentaron ritmos de fDOE con un componente circadiano y uno infradiano. Los componentes circadianos de estos tres estuvieron entre las 23,38 y las 24,04 h y los infradianos entre las 31,94 y las 34,3 h. Cabe destacar que dos de los animales sujetos a un TC presentaron ritmos conductuales con un único componente periódico (Figura 4.11).

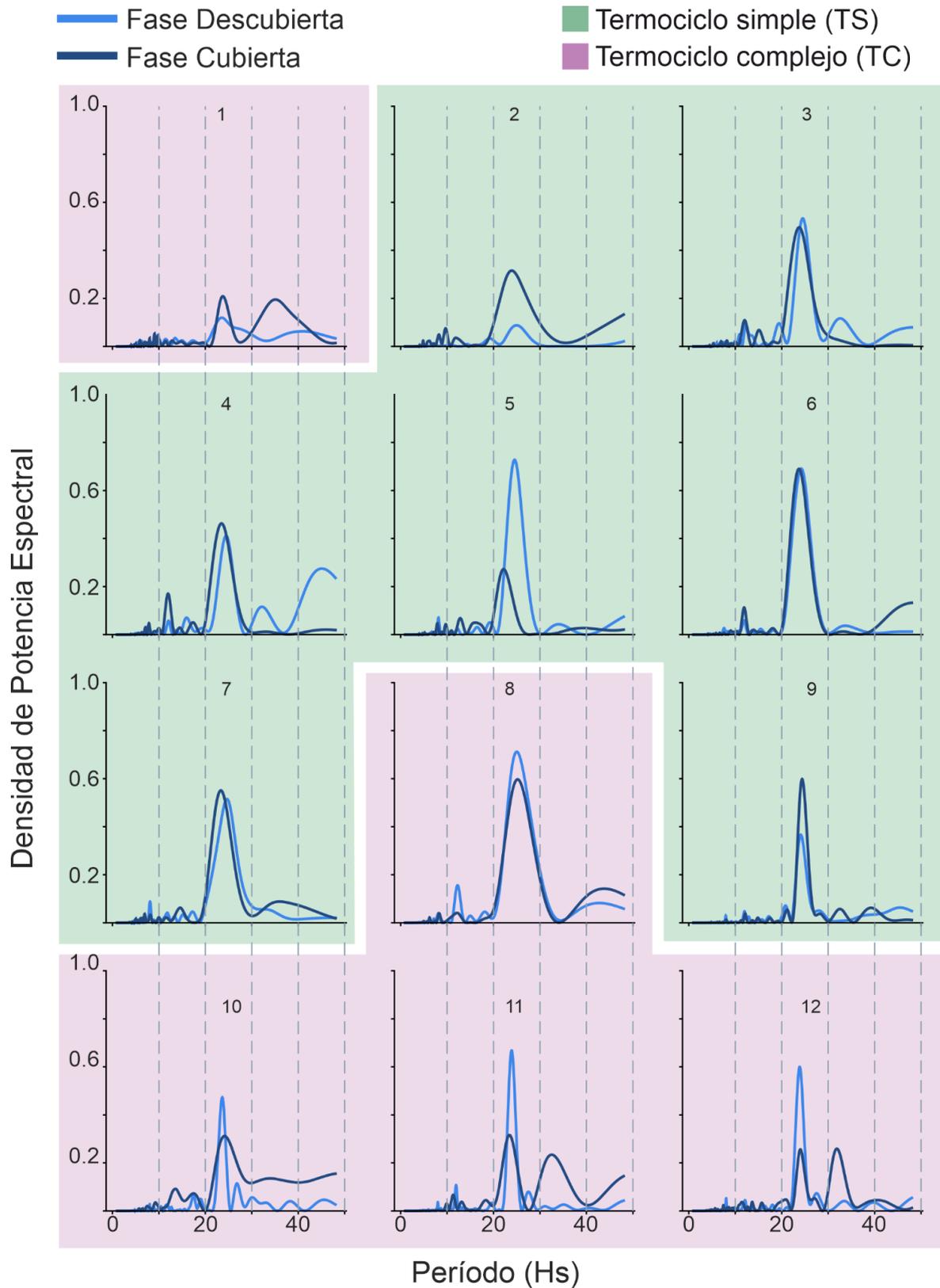


Figura 4.11: Densidad de potencia espectral de la fDOE del agua según análisis de Lomb-Scargle. Cada panel muestra la densidad de potencia de registros de fDOE obtenidos en cada experimento durante la condición descubierta (celeste) y cubierta (azul). Los recuadros verdes indican registros obtenidos bajo termociclos simples (TS) y los recuadros violeta aquellos obtenidos bajo termociclos complejos (TC).

A la luz de los resultados del análisis de la periodicidad tanto del termociclo como de la fDOE, optamos por trabajar con los dos subgrupos (TS y TC) por separado. En el subgrupo TS se calculó la diferencia entre los períodos promedio de la fDOE y el termociclo (Fig. 4.13A). Durante la fase descubierta el período del ritmo de fDOE fue igual de similar al período del ciclo luz/oscuridad que al período del termociclo (Fig 4.12B, test de t pareado:  $p=0,13$ ). En cambio, los períodos de fDOE y temperatura fueron significativamente más cercanos (Test de t pareado,  $p=0,04$ ) durante la condición cubierta que durante la condición descubierta.

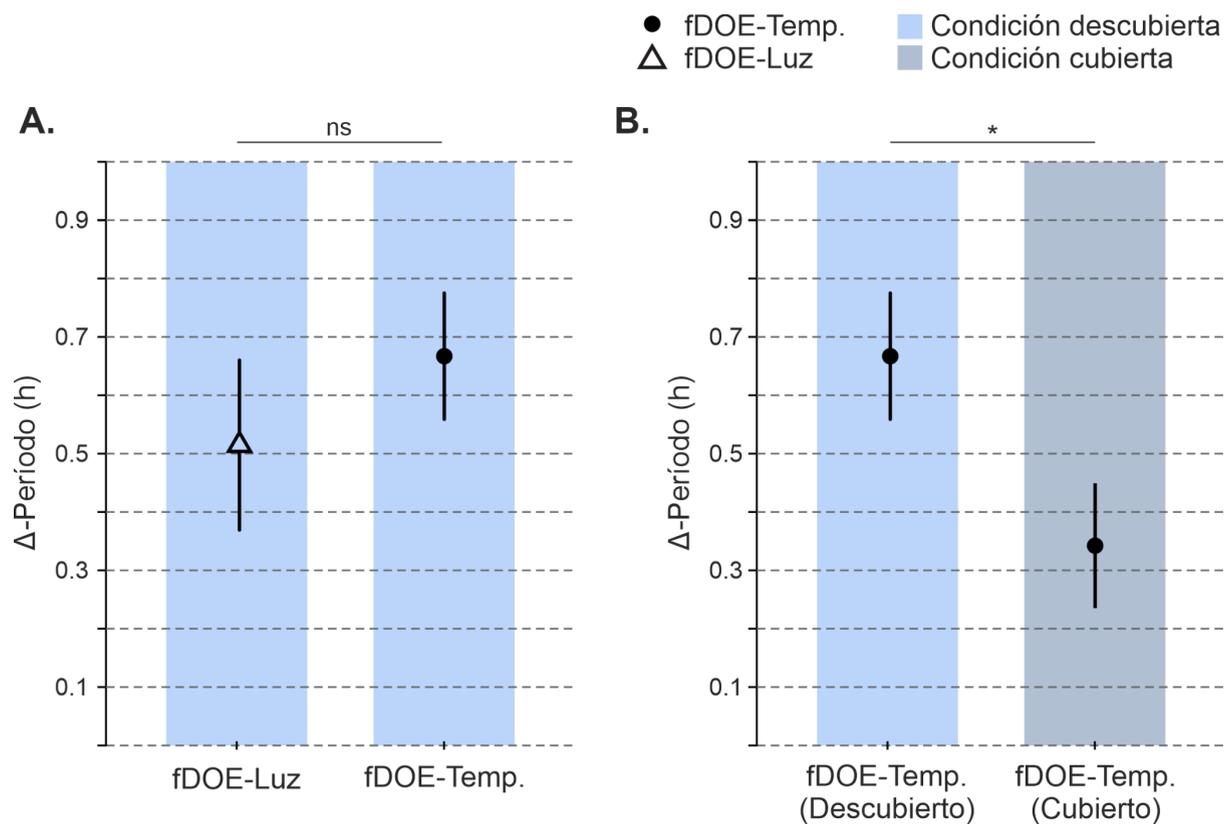


Figura 4.12: Relación entre los periodos de fDOE y de las variables ambientales. Las diferencias se calcularon como el período de la fDOE menos el período de la variable ambiental. Diferencias mayores a 0 significan que el ritmo de fDOE es más largo y viceversa. **A.** Diferencias entre los períodos de fDOE y temperatura en ambas condiciones experimentales. El asterisco marca la significancia  $p<0,05$  (test de t pareado). **B.** Diferencias entre los períodos de fDOE y luz durante la condición descubierta. No se observaron diferencias significativas (test de t pareado,  $p=0,13$ ).

Trabajando con los mismos animales, se utilizaron transformadas de Hilbert para estudiar la relación de fase (es decir, la relación temporal entre los máximos y los mínimos de ambas variables) entre el ritmo de fDOE y temperatura. La figura 4.13 muestra un ejemplo de este procesamiento en un animal. La figura 4.13A muestra el componente real (la señal) e imaginario (la transformada de

la señal) de la señal analítica construida para la fDOE durante la condición descubierta. En la figura 4.13B se muestra lo mismo, en este caso para la temperatura del agua. A partir de esta representación se puede obtener la fase ( $\phi$ ) instantánea de cada variable a lo largo del tiempo. Esta se muestra en las figuras 4.13C. Estos valores son polares y se encuentran envueltos entre  $-\pi$  y  $\pi$ . De estos valores se puede obtener la diferencia de fase ( $\Delta\phi$ ) entre la fDOE y la temperatura, mostrada en la fig. 4.13D. Una diferencia positiva implica un adelanto de la fDOE sobre la temperatura y valores negativos implican que los cambios en la temperatura anteceden a los cambios en la fDOE. En este caso, por ejemplo, podemos observar que los cambios de fase de temperatura siempre anteceden a los de la frecuencia de descarga.

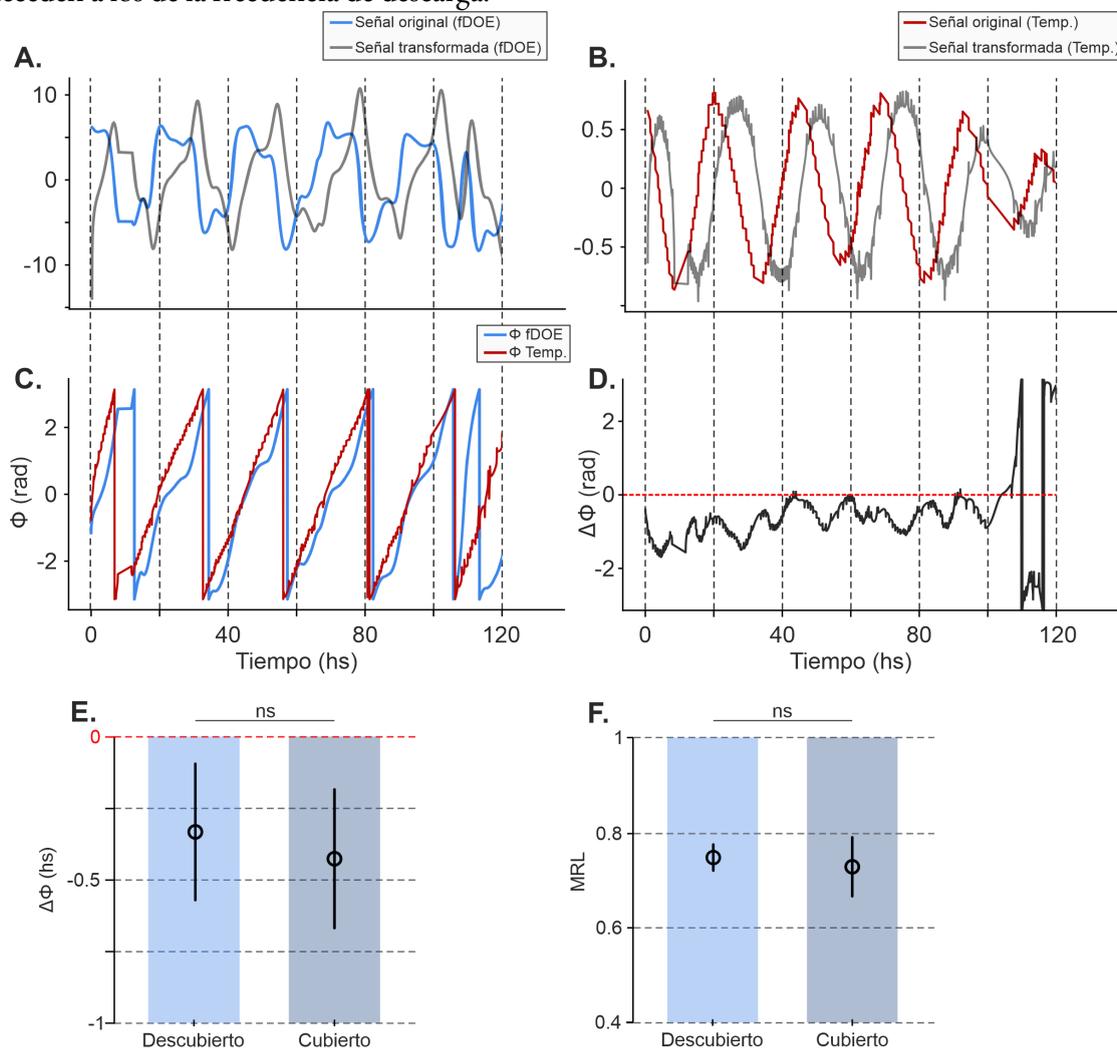


Figura 4.13: Análisis de relación de fase por transformada de Hilbert. **A.** Ejemplo de señal de fDOE y la señal transformada (adelantada  $90^\circ$ ). **B.** Ejemplo de la temperatura en el tiempo y la señal transformada. **C.** Fases instantáneas de la fDOE y la temperatura. **D.** Diferencia entre la fase instantánea de la fDOE y de la temperatura. **E.** Diferencia de fase media entre fDOE y temperatura en ambas condiciones experimentales. **F.** Variabilidad (Mean Resultant Length) media de la relación de fase entre fDOE y temperatura en ambas condiciones experimentales.

La figura 4.13E muestra los resultados poblacionales de este análisis. Los animales mantuvieron una relación de fase constante entre condiciones experimentales (test de t pareado,  $p=0,395$ ). La variabilidad intraindividual medida como la longitud del vector medio resultante o *Mean Resultant Length* (MRL), también se mantuvo constante entre condiciones (fig 4.13F, test de t pareado,  $p=0,802$ ).

En último lugar se analizaron las diferencias en la periodicidad del termociclo y la fDOE entre los subgrupos TS ( $n=7$ ) y TC ( $n=5$ ). Para esto se utilizó un análisis de wavelets que permite observar la potencia relativa de los diferentes componentes de frecuencia a lo largo del tiempo. La figura 4.14 muestra la representación gráfica del análisis para un caso de cada subgrupo. La figura 4.14A y B muestran la potencia relativa de los diferentes períodos (entre 0 y 3000 minutos) para la temperatura a lo largo del tiempo, para un caso TS (Fig. 4.14C) y otro TC (Fig. 4.14D). Podemos observar como, en el segundo caso, la temperatura presenta mayor potencia en valores más altos y de forma más variable que en el primer caso. Las figuras 4.14C y D muestran la potencia de la fDOE a diferentes períodos y de forma similar a lo observado con la temperatura, la fDOE del animal del grupo TC muestra una potencia mayor en períodos más altos y de forma más variable que en el caso del animal del grupo TS. Las subfiguras 4.15E y F muestran el “relieve” o *ridge* del análisis de wavelets, representando el período dominante para la temperatura y la fDOE en cada caso. En el caso TS el período dominante tanto de la fDOE como de la temperatura se mantiene de forma consistente cercano a los 1500 minutos (aproximadamente 24 horas). En el caso TC el animal está sujeto a un termociclo cuyo período dominante varía durante el período de estudio. Durante el primer tramo se encuentra cercano a las 24hs, pero rápidamente aumenta hasta alcanzar los 2500 minutos. Durante los siguientes días el período dominante oscila entre estos dos periodos. El período dominante de la fDOE permanece cercano al de la temperatura, salvo hacia el final del período experimental.

A nivel poblacional, se cuantificó el período dominante promedio y el coeficiente de variación (CV) de la fDOE y el termociclo y se comparó entre TS y TC. El período dominante promedio fue significativamente más alto en TC que en TS, tanto para el termociclo como la fDOE (fig 4.15G, test de t,  $p=0,0046$  y  $p=0,0035$  respectivamente). Si bien el termociclo complejo presentó un mayor CV que el simple (test de t,  $p=0,0288$ ) esto no fue así en el caso de la fDOE, donde los

períodos de animales sujetos a termociclos simples y complejos presentaron similares coeficientes de variabilidad (test de t,  $p=0,5163$ )

En resumen, este capítulo presenta evidencia clara de ritmos diarios en la actividad eléctrica de *Gymnotus omarorum*. Se describen los patrones observados, su consistencia en distintos contextos y su modulación por factores externos como la temperatura, a través de varias aproximaciones analíticas.

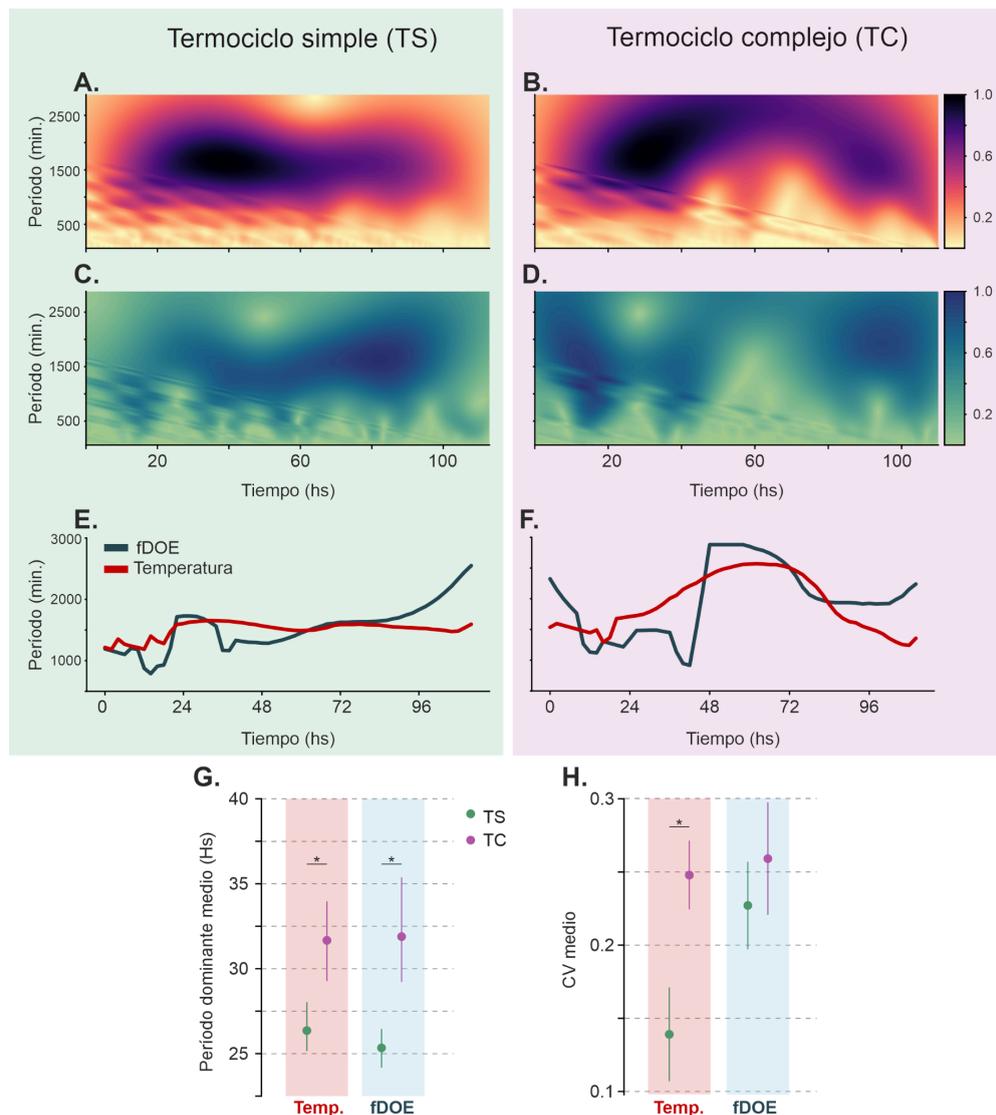


Figura 4.14: Diferencia entre periodicidad de animales sujetos a termociclos simples y complejos. **A. y B.** Potencia relativa de distintos componentes periódicos del termociclo durante un termociclo simple (**A.**) y uno complejo (**B.**). **C. y D.** Potencia relativa de los distintos componentes periódicos del ritmo de fDOE de un animal sujeto a un termociclo simple (**C.**) y complejo (**D.**) de los animales mencionados anteriormente. **E y F.** Períodos dominantes de la temperatura y la fDOE en el caso de un termociclo simple (**E.**) y complejo (**F.**). **G.** Periodo dominante promedio de la fDOE y la temperatura de ambos grupos experimentales **F.** CV promedio de la fDOE y la temperatura de ambos grupos experimentales. En ambos casos, el asterisco marca una diferencia significativa con  $p < 0,05$ .

### 4.3. Discusión

#### *Descripción de las variables ambientales en condiciones seminaturales.*

Este capítulo presenta un diseño seminatural novedoso que resultó efectivo para eliminar la información fótica, los estímulos sociales y la presencia de predadores características del hábitat natural al tiempo que mantiene un termociclo que reproduce las variaciones naturales de temperatura ambiente. Comparado con registros en condiciones naturales, donde se han reportado amplitudes tan bajas como 1 °C (Migliaro y cols. 2018) y de 1 a 4 °C (Migliaro y cols. 2025), nuestros valores durante ambas condiciones experimentales se encuentran dentro del rango natural. Esto sugiere que las condiciones seminaturales reproducen razonablemente la variabilidad térmica del medio y que aunque cubrir las piscinas reduce la amplitud térmica diaria, no lo hace por fuera de los valores esperados en las condiciones naturales.

#### *Descripción de los ritmos diarios en fDOE en condiciones seminaturales.*

Se estudiaron los ritmos diarios de fDOE en individuos aislados de *G. omarorum* utilizando diferentes aproximaciones analíticas para series temporales. En primer lugar, todos los individuos mostraron valores más altos de fDOE durante la noche, afianzando su caracterización como animales nocturnos, algo observado en peces eléctricos tanto en esta especie (Migliaro y cols. 2018; 2025), como en otras (Mucha y cols. 2022, Henninger y cols. 2020, Vázquez y cols. 2023). Este ritmo es similar al registrado en poblaciones naturales (Migliaro y cols. 2018; 2025), con momentos máximos cerca del comienzo del anochecer y una disminución gradual al progresar la noche. Esto sustenta la utilización de este protocolo seminatural. En este diseño experimental los individuos se encuentran expuestos a los ciclos ambientales de temperatura y luz-oscuridad. Además pueden existir otras fluctuaciones derivadas de la alternancia día/noche como variaciones en presión parcial de oxígeno en el agua o ritmos de invertebrados presentes en la vegetación, que son capaces de sincronizar ritmos circadianos en algunas especies (Adamovich y cols. 2017, Botts y cols. 2020, López-Olmeda 2017, Sanchez-Vázquez y cols. 1997). Así, este escenario natural simplificado se consolida como una estrategia experimental válida que permite recrear parte de la complejidad del hábitat de la especie. Dado que cada piscina contenía un solo individuo logramos registrar la conducta eléctrica aislada del contexto social. El contexto social es un fuerte sincronizador de los

ritmos diarios comportamentales (Davidson y Menaker 2003), algo que ya ha sido reportado en esta especie (Migliaro y cols. 2018).

Para estudiar parámetros rítmicos se construyeron modelos de cosinor, un método clásico en el campo de la cronobiología (Reffinetti 2007). Mediante este análisis mostramos que todos los animales presentaron un ritmo diario en su conducta eléctrica. Las acrofases individuales (punto máximo del ajuste del modelo) se ubicaron entre las 18.40 h y las 3.36 h, con una acrofase promedio de 19:54 h. Nuevamente, estos resultados se condicen con los observados para animales aislados en Migliaro y cols. 2018. En la mayoría de los casos ( $n=7$ ) el mejor ajuste requirió un modelo con 3 componentes sinusoidales. En 3 casos el modelo óptimo fue de 2 componentes y en los 2 restantes se utilizó un único componente. Esta diferencia en la cantidad de componentes necesarios refleja la heterogeneidad de la ritmicidad en esta población natural.

A su vez, si bien los modelos fueron significativos en todos los casos, el ajuste tomó valores muy variables. En algunos casos el modelo explicó los datos con alta fidelidad, mientras que en otros casos el  $R^2$  tuvo valores por debajo del 0,1. Estos mismos animales son los que en un primer análisis mostraron ritmos diarios de fDOE de menor amplitud. Estos dos casos fueron obtenidos durante los meses de invierno. Durante estos meses los animales muestran valores de fDOE más bajos que durante el verano (Silva y cols. 2008). Sería interesante en un futuro incorporar más cantidad de animales de invierno para estudiar potenciales cambios estacionales en la expresión de los ritmos biológicos como ocurre en otras especies (Cloudsley-Thompson 1966, Kronfeld-Schor y cols. 2008, Neumann y cols. 2022, Silvério y cols. 2025). La variabilidad del  $R^2$  también demuestra la fortaleza y las limitaciones del Cosinor como técnica analítica. Por un lado, permite detectar y modelar ritmos circadianos de manera sencilla, robusta y cuantificable, lo que la convierte en una herramienta valiosa para estudios cronobiológicos. Sin embargo, su capacidad para ajustarse adecuadamente a los datos depende en gran medida de la forma de la oscilación (cuánto se acerca a una senoide) y la presencia de ruido o variabilidad arrítmica en los valores medios, aspectos más fáciles de ignorar bajo condiciones controladas de laboratorio. Un  $R^2$  bajo no refleja necesariamente la ausencia de un ritmo claro, sino también la inadecuación del modelo cosenoidal para describir dinámicas más complejas o irregulares. Por tanto, la interpretación del  $R^2$  en el contexto del cosinor debe considerar tanto el ajuste estadístico como las características biológicas subyacentes. Es así que

esta técnica se beneficia de la utilización de aproximaciones complementarias como las utilizadas en este trabajo.

#### *Efecto de la eliminación de la luz en la expresión del ritmo de fDOE*

El protocolo de piscinas cubiertas diseñado en este trabajo permite registrar las variaciones diarias de la fDOE sin la influencia temporizadora de la luz y el contexto social. En este marco, mostramos que los ciclos diarios de fDOE mantienen una ritmicidad y amplitud similar tanto para cada individuo como para la población.

En Migliaro 2018 se muestra que individuos aislados y en condiciones constantes de laboratorio (DD y 20°C) mantienen sus ritmos de fDOE por al menos 5 días. Estas evidencias señalan un ritmo endógeno. Esto nos permite plantear que eliminar la información lumínica podría tener, en términos generales, dos escenarios posibles: 1) Si los animales tienen un ritmo endógeno pero solo atienden a claves lumínicas, eliminarlas resultaría en que los animales entren en libre curso y 2) si los animales pueden utilizar ciclos ambientales alternativos, eliminar la luz no generaría una conducta de libre curso. En esta especie, colocar a los animales en libre curso lleva a un corrimiento y defasaje de gran magnitud, obteniendo ritmos de entre 20 y 28 h (Migliaro 2018). Sin embargo, en los experimentos de esta tesis los animales privados de luz mantienen una conducta con período de 24hs y no se observa un corrimiento de fase. Esto es compatible con el segundo escenario mencionado.

Si bien la eliminación de la luz no eliminó el ritmo en fDOE sí llevó a cambios en su expresión. Durante la condición cubierta, los animales mantuvieron su fDOE alta durante más tiempo. Esto nos sugiere que la luz además de tener un efecto sincronizador está modulando la conducta de forma directa. En *G. omarorum* la exposición a la luz promueve una disminución transitoria en la fDOE junto con conductas de evitación, independientemente del momento del día (Camargo y cols. 2023).

#### *Vínculo entre el ritmo de fDOE y el ritmo de temperatura ambiental.*

En este capítulo también se explora el posible rol de la temperatura como clave sincronizadora de los ritmos diarios de fDOE. Para ello, se analizó la periodicidad del termociclo y del ritmo de fDOE en condiciones de seminaturalidad y de oscuridad absoluta. Existe un abanico extenso de técnicas

analíticas para el estudio de la ritmicidad en series temporales, muchas de las cuales ya han sido aplicadas al análisis de ritmos biológicos. Conocer las ventajas, limitaciones y supuestos de cada método es fundamental para una correcta interpretación de los resultados. Por ejemplo, un abordaje clásico para estimar el período de una señal rítmica son los algoritmos de transformadas rápidas de Fourier (FFT), los periodogramas de Enright (y su adaptación: Lomb-Scargle), los periodogramas de chi cuadrado, y las autocorrelaciones (Fossion y cols. 2018, Refinetti y cols. 2007). De todos estos, solo el periodograma de Lomb-Scargle y la autocorrelación toleran datos tomados en intervalos irregulares o series temporales en las cuales se perdieron datos, obligando a imputar datos. Esto nos es relevante, ya que si bien nuestro diseño experimental contemplaba muestreos equidistantes, a lo largo de los experimentos se registraron ausencias puntuales de datos por fallos del equipo. Además se ha visto que los periodogramas de Enright han mostrado mayor precisión que el análisis de FFT y las autocorrelaciones en la estimación de periodos en datos con un único componente oscilatorio (Mourão y cols. 2014). Es así que nosotros optamos trabajar por los periodogramas de Lomb-Scargle, cuyas características lo hacen especialmente útil para series con posibles datos faltantes y espaciados irregulares, sin comprometer la estimación de la periodicidad (Mourão y cols. 2014, Refinetti y cols. 2007, Van Dongen y cols. 1999).

De este análisis de LS se desprende la utilización de la transformada de Hilbert para obtener valores de fase de los ritmos, y el análisis por transformada de wavelets continuas para observar cambios en la periodicidad en el tiempo. Estas técnicas que emergen del procesamiento de señales físicas y han sido aplicadas con éxito más recientemente para el análisis de series temporales con ritmicidad circadiana (Fossion y cols. 2018, Leise y Harrington 2011). En particular, ambas estrategias son increíblemente útiles para el estudio de ritmos que presentan ciertas irregularidades en el tiempo.

Los periodogramas de Lomb-Scargle evidenciaron 2 condiciones experimentales que resultaron de la variabilidad inherente a los procesos climáticos naturales: termociclos simples con un único componente periódico y termociclos complejos con dos componentes periódicos. Esta situación ilustra la complejidad de los ambientes naturales y un posible desafío que podría implicar para los animales la interpretación adecuada de estas señales ambientales. Para cuantificar la relación entre los ritmos de fDOE y temperatura se optó por trabajar inicialmente con los animales sujetos a un termociclo simple. Durante la condición descubierta, el período dominante de los ritmos de fDOE fue igualmente cercano al del termociclo y al del ciclo de luz/oscuridad. Al eliminar la información

lumínica, la diferencia entre los períodos de fDOE y de temperatura disminuyó, mostrando que los animales acercan su ritmicidad a la del termociclo. Esto sugiere un uso oportunista de las diferentes variables ambientales disponibles, lo que toma importancia al considerar el contexto natural en el que viven los animales de esta especie donde el acceso a la luz es reducido pero variable, dependiendo de cuán cerca del agua abierta se encuentran. Tener una mirada cronobiológica sobre el ambiente natural presenta un desafío al intentar desenlazar el efecto de distintas variables ambientales cuando estas están fuertemente asociadas entre sí. Algo que podría estar sucediendo es que durante la condición descubierta, tanto la conducta como la temperatura del agua se encuentren asociadas muy fuertemente con el ciclo de luz-oscuridad. Esto llevaría a una asociación indirecta entre el ritmo de fDOE y temperatura. Si este fuera el caso, esperaríamos observar un aumento en la variabilidad de esta relación al cubrir las piscinas mientras los ritmos de fDOE y temperatura se desfasan de forma gradual. Sin embargo, la relación de fase entre ambas variables se mantuvo constante entre condiciones experimentales y tampoco se observó un aumento en la variabilidad de esta relación. Esta constancia en la relación de fase, aún teniendo períodos levemente diferentes a los del termociclo, implica que los animales han de estar incorporando información térmica y re-enfando su ritmo comportamental de forma continua.

Dado la alta territorialidad y fidelidad de sitio que presenta la especie (Zubizarreta y cols. 2020) así como la preferencia por sitios con vegetación más espesa (Migliaro y cols. 2025), el acceso a la luz podrá depender de la jerarquía social y la densidad poblacional. A su vez, la presencia de otros individuos puede ser una variable sincronizadora por sí misma (Migliaro y cols. 2018). La actividad de los animales más cerca del agua abierta (que reciben más luz) puede estar funcionando como *zeitgeber*, algo que se ha observado en animales donde la cercanía a la puerta de la guarida modifica el acceso a la luz (Marimuthu y cols. 1981, Mellert y cols. 2024).

Cómo vimos antes los ciclos de temperatura ambiente pueden contener componentes rítmicos adicionales y es posible preguntarse si éstos “compiten” por el rol de sincronizadores con el componente de 24 horas. O más aún, si el sistema nervioso de estos animales es capaz de filtrar esa información adicional y mantener un ritmo de 24 horas. Decidimos entonces estudiar el efecto de los termociclos complejos (de periodicidad múltiple) sobre la expresión de los ritmos de fDOE. Utilizando análisis de wavelets, observamos cómo los animales, al cambiar la periodicidad del ritmo de temperatura en el que se ven inmersos, retrasan o adelantan su ritmo de fDOE acercándose al

ritmo ambiental. Este acompasamiento sin embargo tiene limitaciones. En el caso de los animales sujetos a un termociclo complejo, cuando el período dominante toma valores más altos (en algunos casos muy por encima de las 30 h) los animales expresan su ritmo conductual por encima del rango circadiano pero por debajo del período de la temperatura. Esto hace que, al analizar los grupos por separado, los animales sujetos a estos termociclos complejos presenten un período dominante promedio superior al de los sujetos expuestos a termociclos simples.

Al observar la variabilidad en el tiempo de estos ritmos, tanto conductuales como ambientales, en ambos grupos observamos un patrón interesante (figura 4.15H). El ciclo de temperatura complejo es significativamente más variable que el simple. En el caso del ritmo de fDOE, no se observan diferencias de variabilidad entre grupos. Un aumento en la variabilidad ambiental, entonces, no parece estar generando una mayor variabilidad conductual. La periodicidad compleja del ambiente no se manifiesta de forma refleja en la ritmicidad conductual, sugiriendo la existencia de procesos de integración de la información sensorial, y no una mera respuesta refleja a los cambios en la temperatura.

## 5. Descripción de los ritmos de actividad locomotora de *G.*

### *omarorum*:

#### 5.1. Objetivos específicos

1. Describir el ritmo diario de comportamiento locomotor.
2. Comparar la expresión del ritmo diario de actividad locomotora en condiciones seminaturales con y sin acceso al ciclo ambiental de luz y oscuridad.
3. Realizar un estudio preliminar sobre las preferencias en el uso del espacio.

#### 5.2. Resultados

En este capítulo se describe el patrón de ritmos de actividad locomotora de *Gymnotus omarorum* bajo condiciones seminaturales. Para ello, se cuantificó la locomoción de los animales a lo largo del día mediante un análisis basado en ventanas de 5 segundos: en cada ventana se determinó en qué electrodos del arreglo estaba más representada la señal del órgano eléctrico y se evaluó si esta localización variaba entre ventanas consecutivas, como una aproximación al movimiento. Este método permite estimar el movimiento como cambios en la posición del animal por unidad de tiempo y su variación a lo largo del día fue utilizada para analizar la ritmicidad del comportamiento locomotor. En primer lugar, se describen los patrones diarios de locomoción observados durante la condición descubierta, seguidos del análisis de la condición cubierta, en la que se eliminó la información lumínica. Finalmente, se presenta un análisis preliminar del uso del espacio dentro de la arena experimental en relación con el momento del día y la presencia de luz.

#### *Descripción de los ritmos diarios de actividad locomotora bajo condiciones seminaturales.*

En un primer lugar se analizó la cantidad de movimiento de cada individuo a diferentes horas del día a lo largo del experimento. La figura 5.1 muestra un ejemplo con los valores de movimiento medios cada 30 minutos, a lo largo de los 5 días de la condición descubierta. En este animal se observa una clara coincidencia entre los momentos de oscuridad (marcados en gris) y los momentos de alta actividad locomotora. Este aumento nocturno se asemeja más a un cambio de fase que a un aumento gradual, con un momento de actividad locomotora baja y un momento con niveles estables y altos de actividad locomotora.

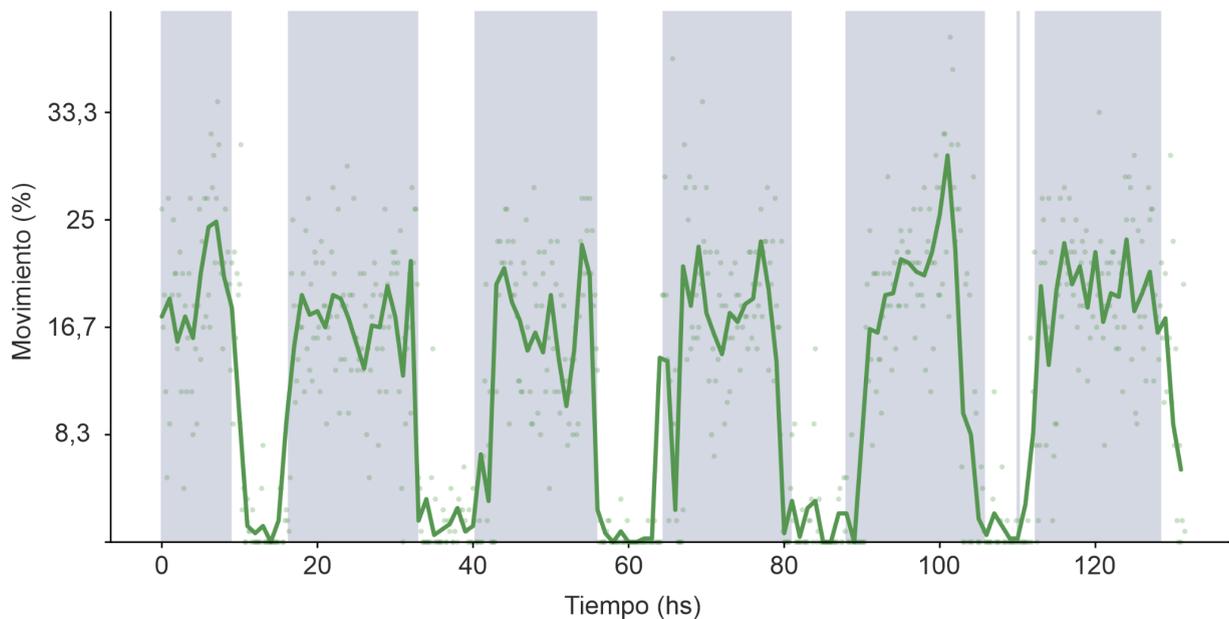


Figura 5.1: Curso temporal de la actividad locomotora de un animal durante la condición descubierta. En blanco se marcan los momentos en el cuál el sensor de luz detectó luz, en gris se marcan los momentos en los que la piscina se encontraba en oscuridad.

De forma similar a lo realizado para analizar los niveles de fDOE a diferentes horas del día, se calculó el promedio entre días de la actividad locomotora a cada hora, para cada individuo (Fig. 5.2A). Podemos observar un claro patrón diario (valores bajos durante el día y altos durante la noche) en la mayoría de los animales. En 4 casos se observaron niveles bajos de locomoción a todas horas. En promedio, la actividad locomotora fue 7,59 veces mayor durante la hora de máxima actividad en comparación con la hora de mínima actividad (test pareado de t,  $p < 0,0001$ ).

Se obtuvo la mediana de actividad locomotora para cada animal y se calculó la diferencia entre este valor y el movimiento mediano a cada hora (Fig. 5.2B). En cuatro de los animales, el valor mediano es cero, lo que implica una muy baja locomoción durante el período de estudio, con momentos puntuales de alta actividad. Estos 4 animales, además presentan cómo máximo una única hora del día en la cuál la cantidad de movimiento se aleja significativamente de la mediana (test U de Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ). Los otros 8 animales, en cambio, parecen mantener transiciones entre movimiento y reposo más estables a lo largo de los días.

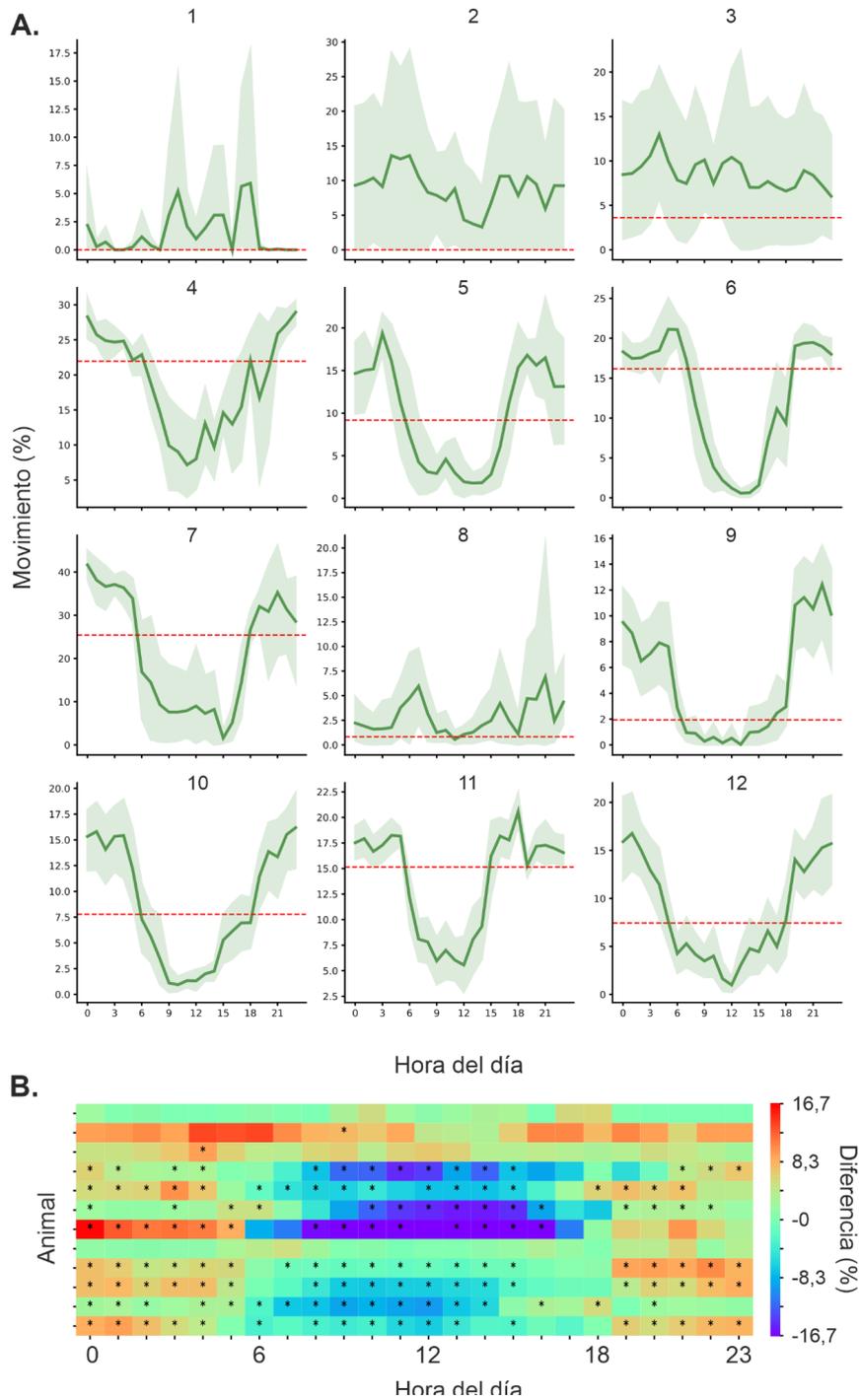


Figura 5.2: Actividad locomotora de todos los animales a diferentes horas del día. **A.** Actividad locomotora mediana por hora para cada animal. La zona bandeada representa el intervalo de confianza. La línea roja marca la locomoción mediana global en cada caso. **B.** Mapa de calor mostrando la diferencia entre la locomoción mediana a cada hora y la mediana global. Las columnas marcan las horas del día y cada fila representa un animal. Los asteriscos marcan horas en las que las diferencias son estadísticamente significativas (test U de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ).

Para analizar la ritmicidad se construyeron modelos de cosinor para la actividad locomotora de los individuos. Los resultados de los ajustes se pueden encontrar en la tabla 5.1. Durante la condición descubierta, en 10 de los 12 animales la actividad se ajustó a un modelo de 24 h. El ajuste de los

modelos fue muy variable como refleja el rango de valores de  $R^2$  (pez 1, =0,03, pez 10,  $R^2= 0,68$ ). La amplitud media fue de  $7,79 \pm 1,5 \%$  y el MESOR de  $10,1 \pm 1,97 \%$ . En comparación con el ritmo de fDOE el ritmo de actividad locomotora presentó acrofases mucho más tardías y más variables entre individuos. La acrofase promedio fue de 00:52 h y las acrofases se encuentran poblacionalmente orientadas hacia la madrugada (test de Rayleigh,; MRL=0,688;  $p<0,05$ ).

<b>Pez</b>	<b>n°</b>	<b>F</b>	<b>p&lt;</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Amplitud (%)</b>	<b>Acrofase (rad)</b>	<b>Acrofase (h)</b>	<b>MESOR (%)</b>
1	1	4,21	0,05	0,03	1,34	2,50	14,46	1,49
<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1,86</b>	<b>0,16</b>	<b>0,01</b>	<b>2,22</b>	<b>-0,79</b>	<b>3,03</b>	<b>8,84</b>
<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1,58</b>	<b>0,21</b>	<b>0,01</b>	<b>1,54</b>	<b>-1,86</b>	<b>7,11</b>	<b>8,71</b>
4	3	116,74	0,0001	0,47	10,22	0,12	23,54	17,93
5	3	129,98	0,0001	0,50	8,14	-0,82	3,12	9,58
6	3	271,32	0,0001	0,68	10,35	-1,41	5,38	10,34
7	3	130,76	0,0001	0,51	18,23	-0,78	2,98	21,97
8	3	10,31	0,01	0,11	2,24	0,56	21,86	2,8
9	3	247,72	0,0001	0,58	7,04	0,60	21,72	6,68
10	3	431,77	0,0001	0,63	8,21	-0,47	1,78	8,85
11	2	202,11	0,0001	0,45	5,67	1,48	18,35	12,1
12	1	122,84	0,0001	0,34	6,54	-0,06	0,24	9,26

Tabla 5.1: Parámetros de los modelos de cosinor para la serie temporal de movimiento de todos los animales. En negrita se marcan los animales cuyo ajuste no fué significativo.

#### *Efecto de la eliminación de la información lumínica en la actividad locomotora.*

La figura 5.3 muestra la actividad locomotora promedio cada 30 minutos del mismo animal que se mostró en la figura 5.1, esta vez durante los 5 días de la condición cubierta. En estas condiciones el animal continúa alternando entre momentos de alta y baja actividad. y se observa una gran concordancia entre las horas de alta y baja actividad entre ambas condiciones experimentales.

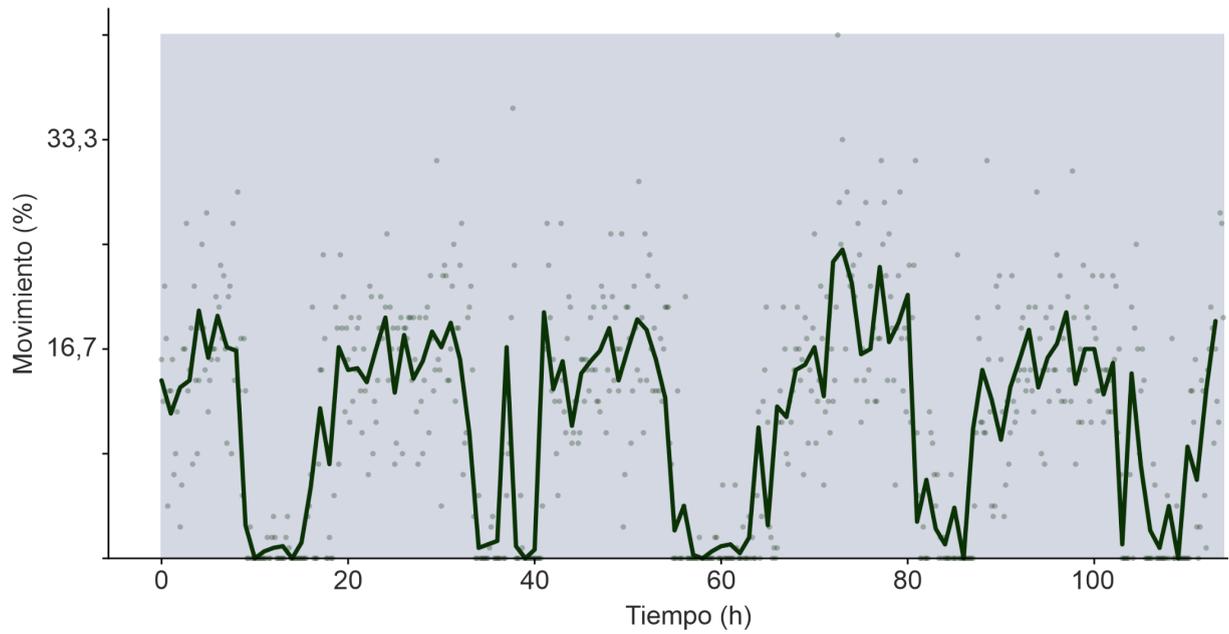


Figura 5.3: Curso temporal de la actividad locomotora de un animal durante la condición cubierta.

La dinámica diaria promedio para todo el grupo se puede observar en la figura 5.4. Únicamente 6 de los 12 animales presentaron una actividad locomotora que se alejó significativamente de su mediana global a alguna horas del día, mientras que en la condición descubierta esto ocurrió en 8 animales.

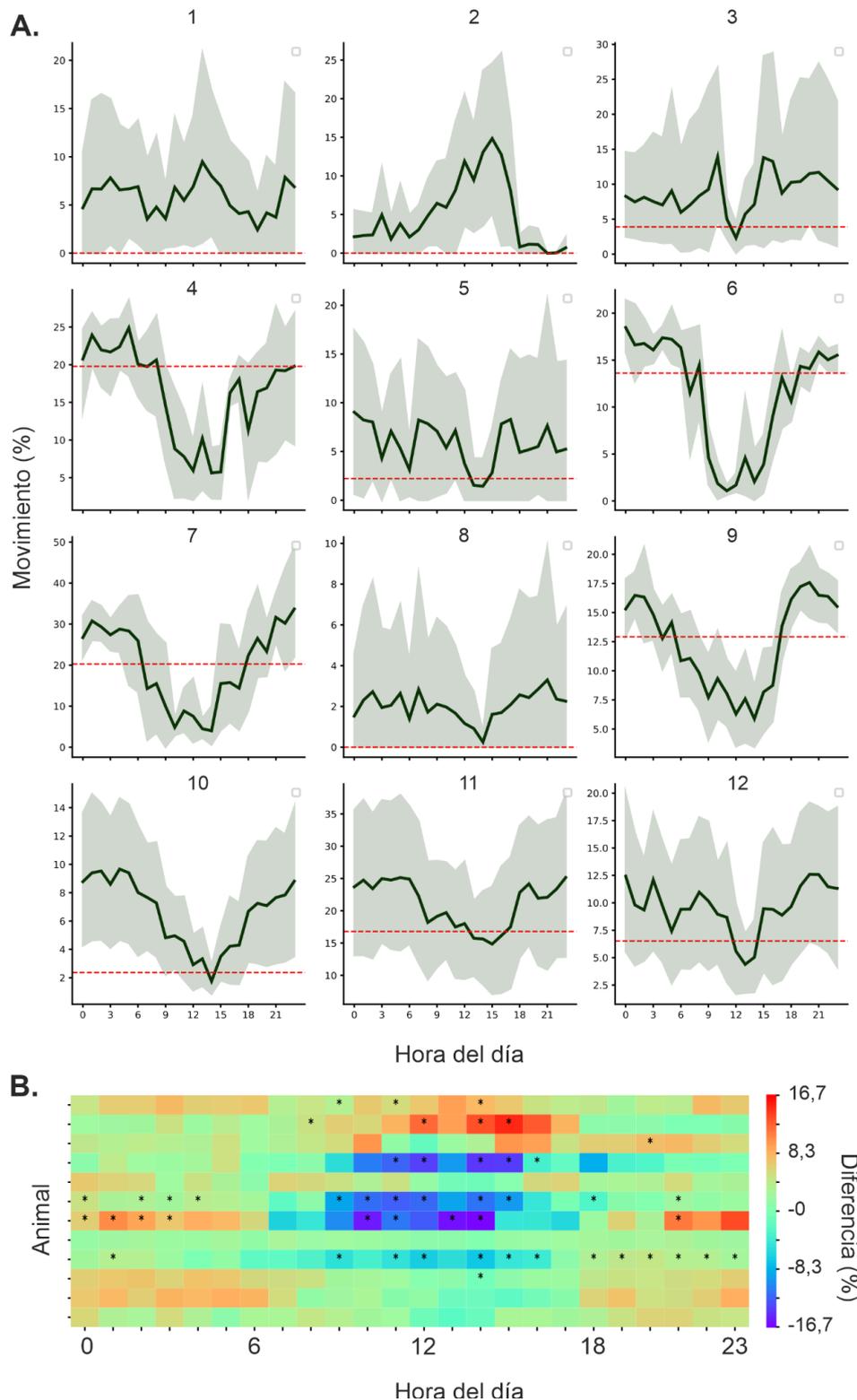


Figura 5.4: Actividad locomotora de todos los animales a diferentes horas del día durante la fase cubierta. **A.** Actividad locomotora mediana por hora para cada animal. La zona bandeada representa el intervalo de confianza. La línea roja marca la locomoción mediana global en cada caso. **B.** Mapa de calor mostrando la diferencia entre la locomoción mediana a cada hora y la mediana global. Las columnas marcan las horas del día y cada fila representa un animal. Los asteriscos marcan horas en las que las diferencias son estadísticamente significativas (test U de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ).

En forma similar al análisis de la fDOE se segmentó el día en 4 períodos: Día, Día-Noche, Noche, Noche-Día. Un análisis de ANOVA mostró un efecto del período ( $F=18,02$ ,  $p<0,0001$ ) pero no de la condición experimental ( $F=0,016$ ;  $p=0,898$ ) sobre la actividad locomotora (Fig. 5.5). Los animales presentaron niveles más bajos de actividad locomotora (test post-hoc de Tukey pareado) durante el día que durante los demás períodos ( $p_{\text{noche}} < 0,0001$ ,  $p_{\text{día-noche}} < 0,05$ ,  $p_{\text{noche-día}} < 0,05$ ). No se observaron diferencias entre el resto de los períodos.

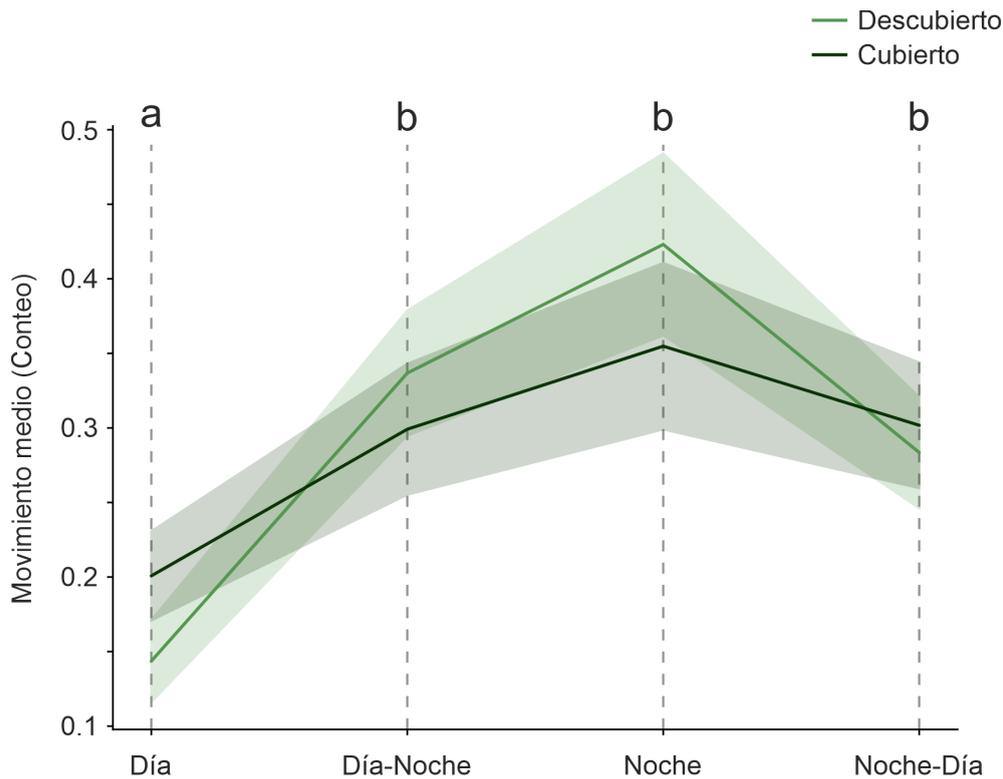


Figura 5.5: Actividad locomotora normalizada en cuatro períodos del día para ambas condiciones experimentales. Las 24 h del día se subdividieron en Día (10 a 16hs), Día-Noche (16 a 22hs), Noche (22 a 04hs) y Noche-Día (04 a 10hs). Se realizó un Test de ANOVA y se detectó un efecto del momento del día, pero no de la condición experimental (ver texto). Las letras marcan las diferencias estadísticas entre conjuntos de datos (Test post-hoc de Tukey,  $p<0.05$ ).

Se realizaron modelos de cosinor durante la condición cubierta (Tabla 5.2). En 9 de los 12 animales se ajustó un modelo de forma significativa (Tabla 5.2). En estos animales el  $R^2$  promedio fue de  $0,28 \pm 0,07$ . El MESOR promedio fue de  $45,43 \pm 5,54$  y la amplitud promedio de  $22,4 \pm 4,63$ .

<b>Pez</b>	<b>n°</b>	<b>F</b>	<b>p</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Amplitud (%)</b>	<b>Acrofase (rad)</b>	<b>Acrofase (hs)</b>	<b>MESOR (%)</b>
<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1,21</b>	<b>0,3</b>	<b>0,01</b>	<b>1,24</b>	<b>-2.10</b>	<b>8,02</b>	<b>6,34</b>
2	2	22,73	< 0,0001	0,21	7,14	2.84	13,17	5,62
<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1,18</b>	<b>0,3</b>	<b>0,01</b>	<b>1,66</b>	<b>1.21</b>	<b>19,36</b>	<b>8,85</b>
4	2	55,41	< 0,0001	0,34	8,44	-1.20	4,56	15,26
5	2	7,03	< 0,001	0,06	3,23	0.62	21,62	5,36
6	2	149,78	< 0,0001	0,57	8,46	-1.06	4,04	9,45
7	1	61,77	< 0,0001	0,36	12,82	-0.15	0,58	19,97
<b>8</b>	<b>1</b>	<b>0,96</b>	<b>0,4</b>	<b>0,01</b>	<b>0,65</b>	<b>-0.10</b>	<b>0,38</b>	<b>2,52</b>
9	3	87,96	< 0,0001	0,28	5,64	0.95	20,37	12,12
10	2	110,77	< 0,0001	0,50	6,36	-0.89	3,41	10,68
11	1	15,48	< 0,0001	0,12	2,95	-0.62	2,35	14,73
12	1	3,29	< 0,05	0,02	1,88	-0.11	0,43	13,42

Tabla 5.2: Parámetros de los modelos de cosinor para la serie temporal de movimiento de todos los animales. En negrita se marcan los animales cuyo ajuste no fué significativo.

Para comparar los parámetros entre condiciones solo se utilizaron los animales que ajustaron al modelo de cosinor en ambas condiciones experimentales (Fig. 5.6, n=8). El R<sup>2</sup> fue significativamente menor en la condición cubierta que en la descubierta (test de t pareado: p< 0,001). El MESOR no varió significativamente entre condiciones (Test de t pareado: p=0,68), pero sí lo hizo la amplitud (test de t pareado, p<0.001) que disminuyó en la condición cubierta. La acrofase promedio durante esta condición fue a las 1:18 h (test de Rayleigh: MRL=0,75; p<0.01). No se observaron diferencias significativas en las acrofases entre condiciones (Test de Watson-Williams: p=0,75).

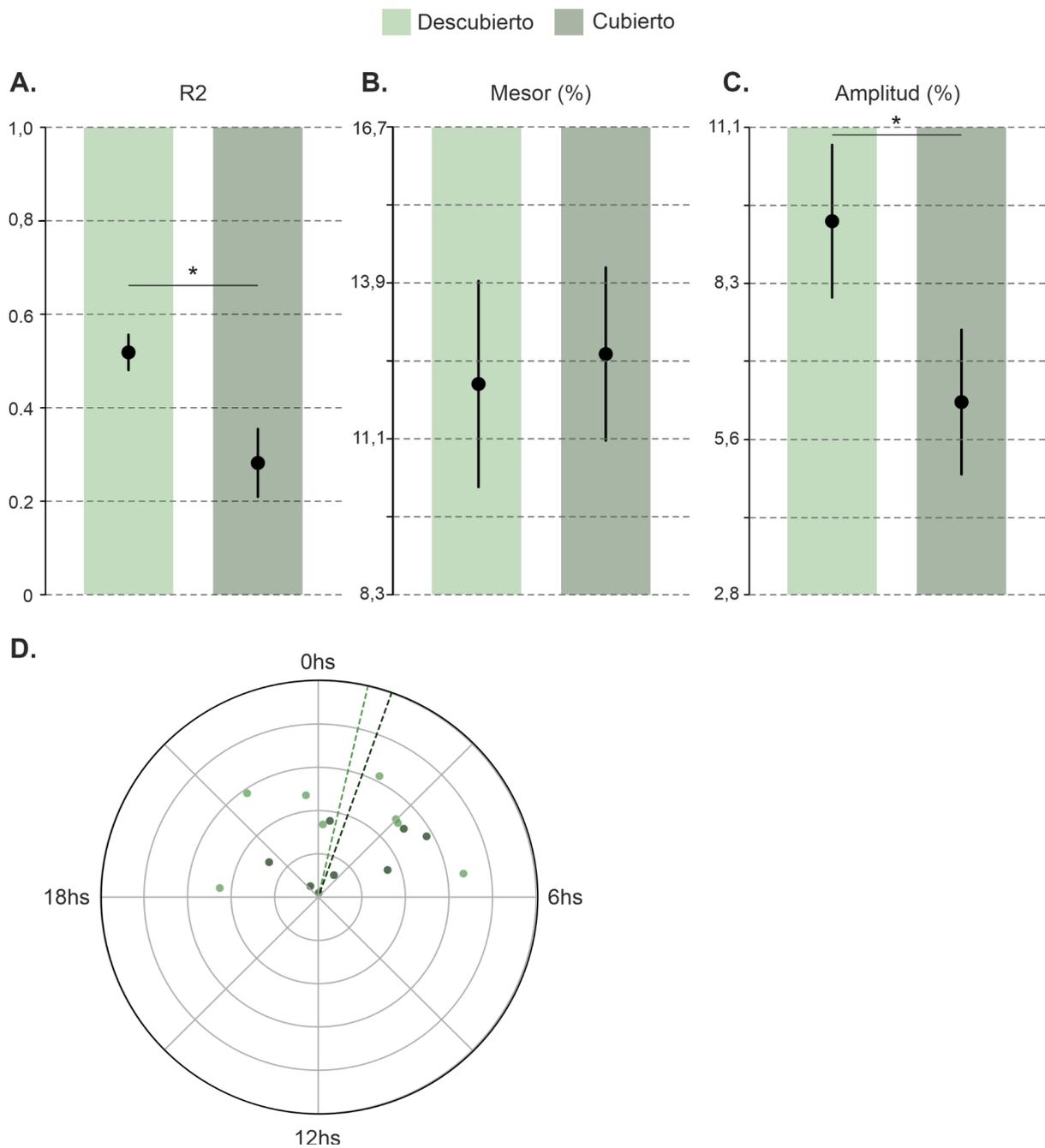


Figura 5.6: Comparación de los parámetros de los modelos de cosinor entre condiciones experimentales. Se observaron diferencias en el  $R^2$  (A) y en la amplitud (C) entre condiciones. No se observaron diferencias en el mesor (B) D. Acrofases poblacionales (líneas punteadas) e individuales (puntos) para cada animal en cada condición experimental.

Tras realizar el análisis de cosinor se optó por continuar la aproximación metodológica utilizada en el capítulo anterior y generar periodogramas de Lomb-Scargle en ambas condiciones. Estos se encuentran en la figura 5.7. De los 12 animales 8 cuentan con un pico en su periodograma en el rango circadiano durante la condición descubierta. Estos picos representan períodos de entre 23,58

h y 24,86 h, con un promedio de 24,06 h. Durante la condición cubierta únicamente 4 presentan ritmicidad diaria clara según este análisis. El resto de los animales no parece presentar ninguna ritmicidad dentro del rango estudiado (12 a 48 h).

La ritmicidad en la actividad locomotora resulta más variable y menos robusta que la observada en la fDOE. Si bien algunos individuos mostraron patrones diarios tanto los modelos de cosinor como los periodogramas de Lomb-Scargle revelaron una menor consistencia y fuerza del ritmo circadiano en la locomoción que en la fDOE, especialmente durante la condición cubierta. Dado que sólo una minoría de los animales presentó ritmicidad significativa según este último análisis, no se continuó con la batería completa de análisis utilizada para fDOE.

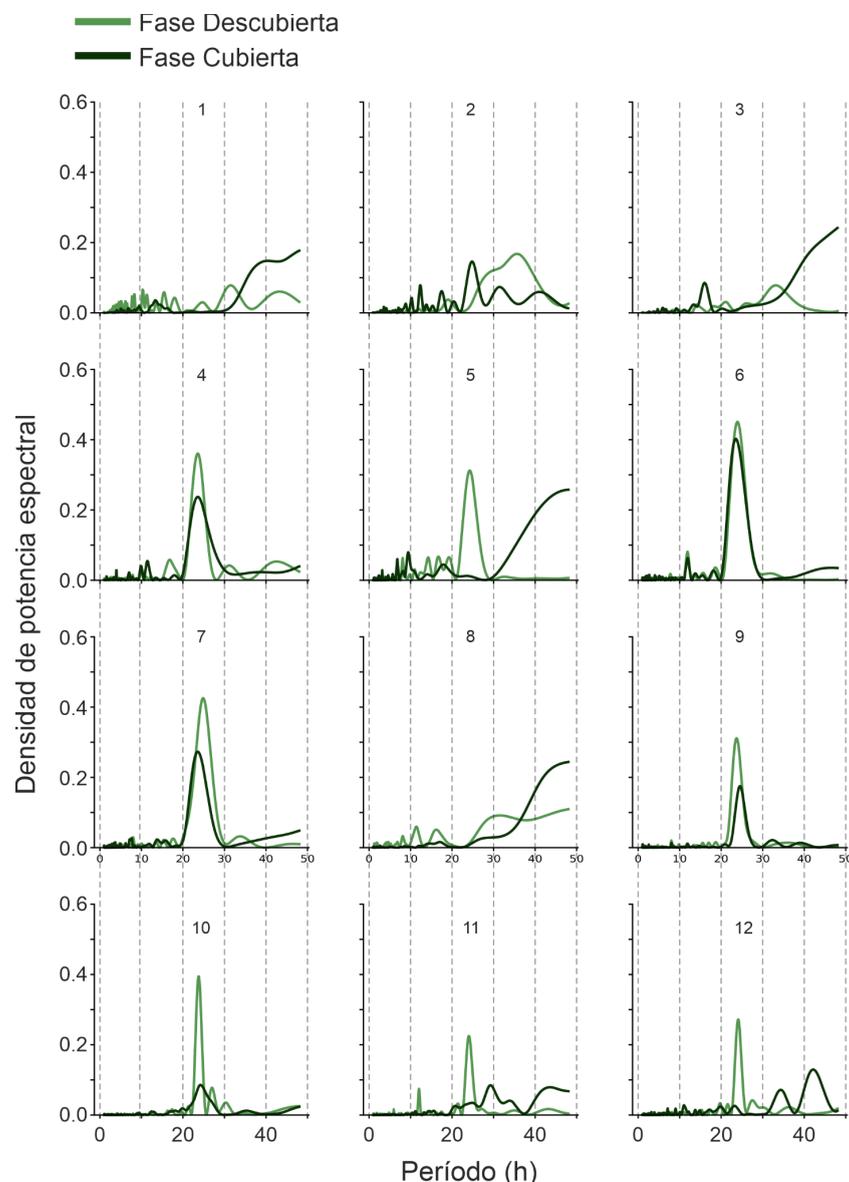


Figura 5.7: Periodogramas de Lomb-Scargle de la actividad locomotora de todos los animales durante ambas condiciones experimentales.

### *Estudio preliminar del uso de espacio en G. omarorum*

Como último punto en la descripción de los patrones locomotores de *G. omarorum*, se construyeron mapas de calor que muestran el tiempo que los animales permanecieron en diferentes regiones de la arena. El día fue dividido en los cuatro períodos horarios utilizados previamente y se analizaron posibles diferencias en el uso del espacio según el momento del día y la presencia o ausencia de luz. Debido a los requisitos de resolución espacial necesarios para este análisis, sólo 6 de los 12 animales registrados cumplieron con los criterios de inclusión. La Figura 5.8 presenta un ejemplo de estos mapas para un individuo donde se destaca una aparente diferencia en el uso del centro de la arena entre las 10 y las 16 h (día) durante la condición cubierta en comparación con el mismo período de la condición descubierta, así como una mayor permanencia en esta región entre las 16 y las 4 h (noche) en la condición descubierta respecto al resto de las horas en la misma condición.

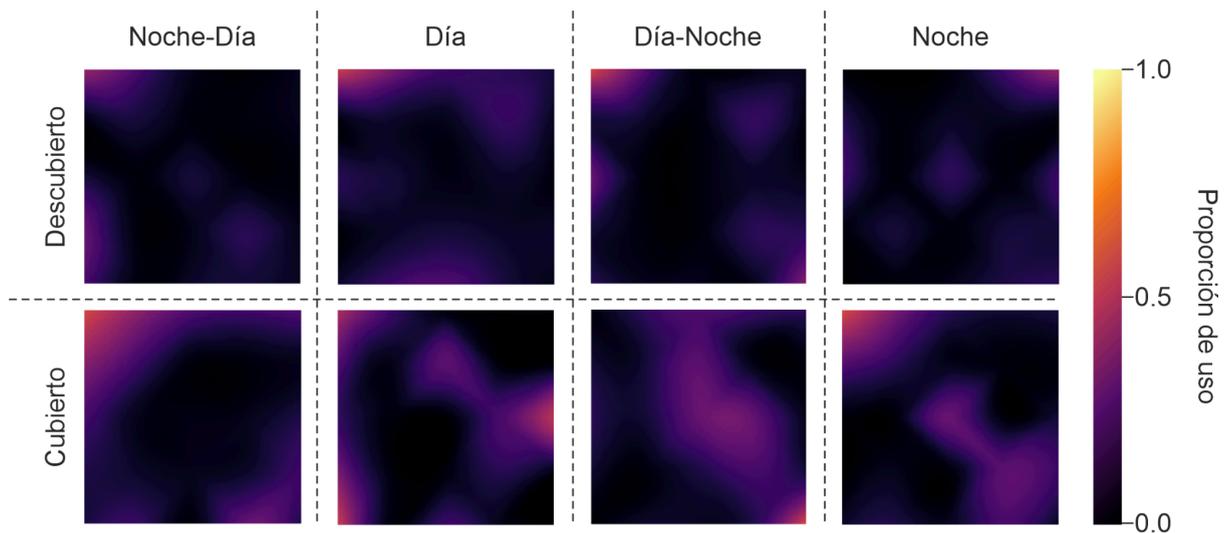


Figura 5.8: Uso diario del espacio en cuatro momentos del día para un animal durante ambas condiciones experimentales.

Se calculó la proporción de tiempo de permanencia en el centro de la arena definido como un área de 60x60 cm centrada en la posición ( $x=45, y=45$ ), así como en la periferia. Al considerar todos los períodos horarios en conjunto los animales mostraron una marcada preferencia por las zonas cercanas a los bordes de la piscina (Fig. 5.9A). Esta preferencia se mantuvo incluso en condiciones de oscuridad absoluta y no se observó un efecto significativo de la condición experimental sobre este patrón. Posteriormente, se desagregaron los datos según los cuatro períodos horarios

previamente definidos y se analizaron las diferencias en el uso del centro de la arena a lo largo del día y en ambas condiciones (Fig. 5.9B). Si bien no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de medidas repetidas,  $p > 0,3$  en todos los casos) entre ninguna de las combinaciones de período y condición, durante el intervalo entre las 10 y las 16 h (período diurno) se registró un mayor número de animales que utilizaron más intensamente el centro de la arena durante la condición cubierta, lo cual se refleja en una distribución más amplia de los valores de permanencia.

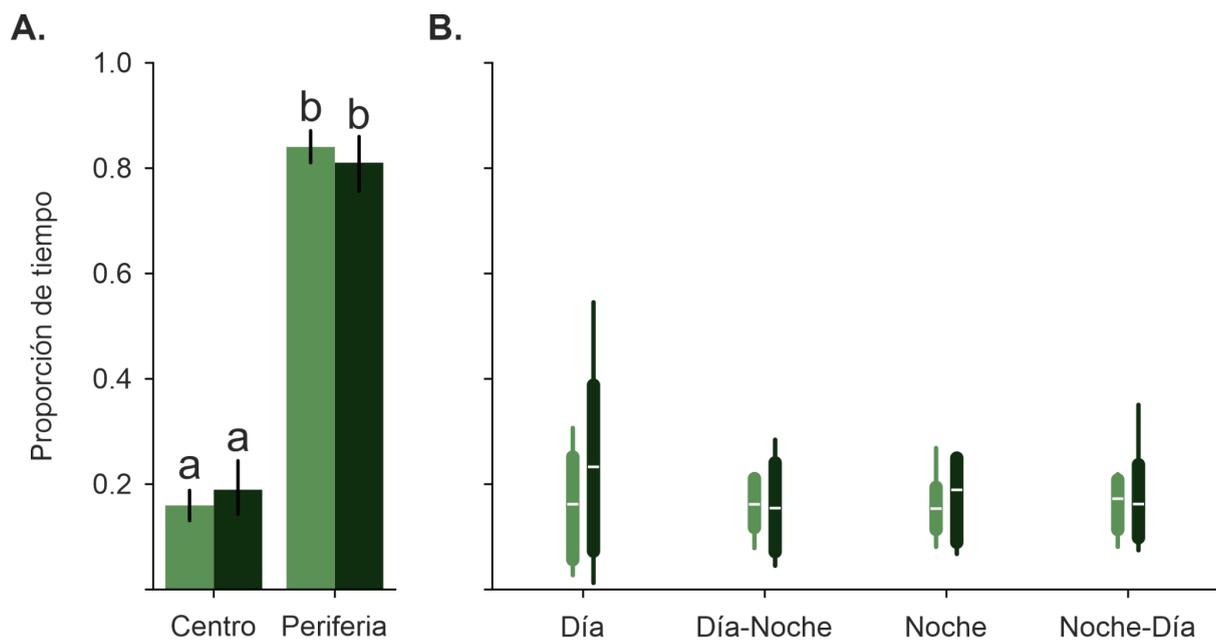


Figura 4.9: Cuantificación de las preferencias del uso de espacio de todos los animales en ambas condiciones experimentales (verde claro: condición descubierta, verde oscuro: condición cubierta). **A.** Proporción de tiempo medio pasado en el centro y en la periferia de la arena. Las letras (a y b) marcan las diferencias estadísticas entre grupos. Los animales pasaron significativamente más tiempo en la periferia que en el centro de la arena y no se encontró un efecto de la condición sobre esto. **B.** Proporción de tiempo medio en el centro de la arena, segmentado por momento del día.

En resumen, este capítulo presenta evidencia de ritmos diarios en la actividad locomotora de *G. omarorum* bajo condiciones seminaturales. Se describen los patrones diarios de locomoción, caracterizados por una mayor actividad durante la noche y una alta variabilidad interindividual. Mediante análisis de cosinor y periodogramas de Lomb-Scargle, se confirma la presencia de ritmicidad circadiana en algunos individuos, aunque de manera menos robusta que en la actividad eléctrica. Se evidencia también una ausencia de efecto al eliminar la información lumínica. Finalmente, se analiza preliminarmente el uso del espacio, revelando una preferencia general por la

periferia y una posible evitación del centro bajo presencia de luz lo que sugiere un componente de evitación que impacta en el uso del territorio.

### 5.3. **Discusión**

*Descripción de los ritmos diarios de actividad locomotora bajo condiciones seminaturales.*

Este trabajo presenta el primer estudio de los patrones diarios de actividad locomotora individual de peces eléctricos fuera del laboratorio. En general los animales mostraron un patrón claro de mayor actividad durante la noche y menor durante el día, con transiciones marcadas entre estos estados, a diferencia de los cambios más graduales observados en la conducta eléctrica. Los períodos de máxima actividad tendieron a acumularse hacia la medianoche, mientras que los mínimos estuvieron en torno al mediodía. Este patrón nocturno de actividad exploratoria se condice con observaciones previas en esta (Migliaro y cols. 2018; 2025) y otras especies (Henninger y cols. 2020, Mucha y cols. 2022) de peces eléctricos.

Dada que la actividad exploratoria tiene asociado un componente de actividad locomotora es interesante considerar el contexto experimental para la expresión de la conducta natural de la especie. En su hábitat natural esta especie presenta una gran fidelidad al sitio y territorios de aproximadamente 1 m<sup>2</sup> (Zubizarreta y cols. 2020). Los animales se desplazan por su territorio e interactúan con coespecíficos vecinos durante la noche (Migliaro y cols. 2025). Nuestro diseño cuenta con dimensiones similares al territorio natural pero sin la presencia de coespecíficos. En condiciones de laboratorio y en un territorio diez veces menor, la cantidad de movimiento en esta especie es mínima (Gascue 2024). Esto refuerza la idea de que la locomoción, al estar estrechamente ligada a un comportamiento motivado como la exploración, es extremadamente sensible a factores individuales y contextuales. Por eso para evaluar su expresión rítmica de forma significativa resulta fundamental estudiarla en un ambiente enriquecido y con valor ecológico para el animal (Reader 2015).

La conducta exploratoria es fundamental para la explotación de los recursos de un territorio y en peces eléctricos el aumento nocturno, tanto de la fDOE como de la actividad locomotora pueden considerarse en conjunto como un aumento nocturno de la actividad exploratoria. El vínculo entre estos dos componentes puede analizarse en distintas escalas temporales. En el laboratorio, la locomoción se ve precedida por un aumento transitorio en la fDOE (Jun y cols. 2014). A su vez,

aumentos en la fDOE están asociados con el reconocimiento espacial y con la búsqueda de alimento o con la exploración predictiva en lugares donde previamente se localizaron estímulos electrosensoriales (Jun y cols. 2016). Por otra parte, el ritmo diario de fDOE es mayoritariamente independiente de la locomoción, ya que animales en reposo presentan este aumento nocturno característico (Migliaro y cols. 2018). En el marco temporal diario que compete a esta tesis observamos que la actividad locomotora alcanza valores máximos más tardíamente que la fDOE. El ritmo de la fDOE antecede al ritmo locomotor en aproximadamente 4 horas.

La exploración de un territorio y la explotación de sus recursos son complementarias: la explotación de recursos conocidos ofrece beneficios predecibles, mientras que la exploración reduce la incertidumbre sobre la disponibilidad de recursos desconocidos en otras zonas del territorio (Mehlhorn y cols. 2015, Petzke y Schomaker 2022, Reader 2015). Desde el punto de vista motor la exploración se caracteriza por el desplazamiento del individuo en el territorio mientras que la explotación implica una permanencia más prolongada en el sitio del recurso con actividad locomotora que no implique desplazamiento (Mehlhorn y cols. 2015). En este sentido es importante considerar que nuestro análisis se restringe a la locomoción con desplazamiento y no puede detectar movimientos cuyas trayectorias sean menores a 20 cm. El aumento nocturno en la fDOE aumenta la información sensorial disponible. Su ritmo presenta un desfase respecto al de la locomoción: la fDOE comienza a incrementarse y alcanza su acrofase antes que la actividad locomotora. Cuando la fDOE llega a su acrofase, la locomoción está en aumento. Podrían existir dos funciones de este aumento nocturno: una primera, independiente del aumento locomotor y posiblemente vinculada a la explotación de recursos cercanos, y una segunda, asociada con el patrullaje y la exploración del territorio.

#### *Efecto de la eliminación de la luz en la actividad locomotora*

Al impedir el acceso al ciclo de luz-oscuridad los animales continuaron alternando entre momentos de alta y baja actividad locomotora, como se observa en la figura 5.3 lo que sugiere una persistencia del patrón diario independientemente del acceso a luz natural.

En la condición cubierta 9 de los 12 animales mostraron un ritmo de 24 h en el modelo de cosinor. Se observó una caída en la amplitud del ritmo y en el ajuste de los modelos. Asumiendo que la

actividad locomotora puede ser modelada como una función de escalón con transiciones de fase, esta caída en el ajuste podría estar indicando una menor robustez del ritmo diario en esta condición. Finalmente, los periodogramas de Lomb-Scargle mostraron que durante la condición descubierta 8 animales presentaban un ritmo diario, mientras que durante la condición cubierta solo 4 lo hicieron. El resto no mostró ritmicidad detectable dentro del rango de períodos analizado (12–48 h). Estos resultados sugieren que, a diferencia del ritmo de la conducta eléctrica, la locomoción muestra una ritmicidad más débil y variable, al menos en estas condiciones seminaturales.

#### *Estudio preliminar del uso de espacio en *G. omarorum**

Por último se intentó explorar el uso del espacio en *G. omarorum* a lo largo del día y bajo ambas condiciones experimentales. Principalmente, nos interesó cuantificar diferencias entre el uso de la periferia y el centro de la arena ya que los animales podrían preferir la periferia durante el día. Entendemos que la periferia podría proveer más protección. Por un lado puede recibir menos luz cuando las paredes de la piscina proyectan sombra. Por otra parte, la superficie plástica genera un efecto amplificador sobre el campo eléctrico del pez favoreciendo la electrolocalización (Pereira y cols. 2005). A su vez, dada la conducta de evitación de la luz los individuos podrían aventurarse hacia el centro del territorio durante la noche. En este sentido, cubrir las piscinas eliminaría esta posible diferencia en el uso del espacio. Los resultados no promueven esta hipótesis. No encontramos diferencias significativas en el tiempo empleado en centro al cubrir las piscinas en ninguno de los períodos establecidos, lo que sugiere que la preferencia por la periferia no se encuentra asociada a la incidencia de luz. Estos resultados son preliminares. Por un lado, el número de individuos es bajo. Por otra parte, se podría refinar la aproximación utilizada para estimar la ubicación de los animales de forma más precisa.

## 6. Reflexiones finales y perspectivas

Esta tesis avanza en el estudio de los ritmos biológicos de los peces eléctricos y su relación con las variables ambientales, utilizando una metodología experimental que combinó un entorno seminatural con registros continuos e individuales para caracterizar los ritmos diarios de conducta en *G. omarorum*. La inclusión de diversas condiciones experimentales y el seguimiento prolongado de la conducta permitieron no solo identificar la ritmicidad, sino también analizar su estabilidad, amplitud y conexión con señales ambientales, apoyados por herramientas estadísticas que enriquecieron los resultados.

Como se mencionó extensamente, los ritmos temporales de la conducta suelen analizarse asociados a los ciclos de luz-oscuridad. Si bien esto sigue la lógica de que este ciclo es ubicuo, hay animales que han conquistado nichos ecológicos donde la luz pierde esta centralidad como variable ambiental. En esta tesis demostramos que la temperatura es capaz de sincronizar ritmos conductuales en una especie que justamente vive en un hábitat en el que la luz es una variable poco representativa del estado del mundo exterior (Migliaro y cols. 2018; 2025).

Hay reportes de estudios de laboratorio que comienzan a dar cuenta de la complejidad de los sistemas circadianos en animales expuestos a diferentes *zeitgebers* a la vez. Recientemente, el estudio de cómo el conflicto sensorial afecta la expresión de los ritmos circadianos ha cobrado relevancia. El conflicto sensorial, en el contexto de la cronobiología, ocurre cuando múltiples claves sensoriales que se encuentran temporalmente desalineadas respecto a su presentación en el hábitat natural. En estas condiciones distintos osciladores pueden seguir distintas variables ambientales (Harper y cols. 2017) causando una desincronización entre sistemas y reduciendo la ritmicidad comportamental (Harper y cols. 2016; 2017). En un sistema sincronizado por un único *zeitgeber* la simple suma de una variable con potencial sincronizador puede provocar un cambio global en el comportamiento. No todos los osciladores del sistema circadiano responden de forma idéntica a las señales del ambiente. Estas señales pueden ejercer efectos de distinta magnitud sobre su ritmicidad. En consecuencia, los ritmos conductuales que controlan pueden sincronizarse preferentemente con ciclos de luz-oscuridad, temperatura, disponibilidad de recursos u otras señales ecológicas relevantes (López-Olmeda y cols. 2009, Wams y cols. 2017). Esto nos tiene que interpelar sobre la complejidad de la integración temporal necesaria para que el sistema nervioso, en un ambiente natural sujeto a

múltiples variables cíclicas (Häfker y Tessmar-Raible 2020), genere patrones rítmicos coherentes y eficientes. No podemos dejar de señalar que nuestro diseño seminatural presenta posibles limitaciones, por ejemplo cubrir las piscinas puede alterar otros parámetros como los niveles de oxígeno disuelto en el agua (Egg y cols. 2013) y los ritmos diarios de los invertebrados y la vegetación presente.

Los resultados de esta tesis también abren una vía de discusión particularmente interesante en torno al fenómeno del enmascaramiento de los ritmos circadianos. Si bien desde la cronobiología clásica suele hacerse un esfuerzo por distinguir entre los efectos de *entrainment* (ajuste del reloj endógeno al ciclo ambiental) y los de enmascaramiento (modulación directa de la conducta por el ambiente), en los escenarios naturales ambos procesos ocurren de forma simultánea y asociada y ambos cumplen funciones adaptativas relevantes para los organismos. Por lo tanto, los ritmos que observamos en la naturaleza deben entenderse como el resultado de la conjunción de procesos endógenos junto con adaptaciones moduladas directamente por factores ambientales. Estos actúan en conjunto optimizando la organización temporal de la conducta y de la fisiología y aumentando la flexibilidad y eficiencia adaptativa frente a un ambiente variable. La tesis también abre preguntas acerca del encarrilamiento de distintos ritmos fisiológicos y comportamentales a diferentes variables ambientales y a la flexibilidad de los distintos osciladores que forman el sistema circadiano. Esta flexibilidad diferencial permite a los organismos mantener una organización temporal coherente incluso bajo condiciones cambiantes, pero también implica que los ritmos pueden desfasarse entre sí, generando fenómenos de desincronización interna cuya relevancia ecológica y funcional aún no se comprende completamente.

Algunos abordajes metodológicos que emergen de esta tesis a futuro:

1. Complementar estos resultados con estudios de la sincronización de los ritmos de fDOE en condiciones controladas de laboratorio. Esto permitirá testear si los ritmos conductuales se encarrilan a los ciclos de temperatura (o si es enmascaramiento), analizar su comportamiento en libre curso y explorar cómo interactúan distintos sincronizadores como la luz y la temperatura cuando se presentan de forma desfasada. Esto a su vez nos arrojará pistas acerca de los circuitos neurales que subyacen a esta sincronización.

2. Investigar cómo se organiza la ritmicidad poblacional en condiciones naturales, integrando variables sociales y ecológicas. Utilizando una grilla de electrodos en la laguna, se podría buscar determinar cómo se expresan los ritmos conductuales en la población natural, si existen individuos clave que actúan como sincronizadores o si los parámetros rítmicos emergen de forma colectiva. Así mismo se podría indagar cómo influyen factores como la distribución espacial o las variaciones ambientales locales y estacionales sobre el comportamiento individual y poblacional.
3. Avanzar en la caracterización molecular de los ritmos y su modulación mediante análisis de expresión génica. Por ejemplo se podría estudiar la expresión de genes reloj y receptores de melatonina en núcleos de interés (POA, NEB, glándula pineal), evaluando la existencia de ritmos circadianos a nivel molecular, su posible variación a lo largo del ciclo anual y su relación con el termociclo.

## 7. Anexo: Material suplementario sobre variables ambientales

Esta tesis se focaliza en la influencia del termociclo sobre la conducta y en ese marco se describe extensamente el patrón de variación de la temperatura del agua en tanto constituye el estímulo que efectivamente alcanza a los individuos. Esto se complementa con reportes de presencia o ausencia de luz. Dado que las condiciones registradas en las piscinas derivan de las condiciones ambientales generales en esta sección se presenta información complementaria que describe: (i) la variabilidad térmica general (medida por la temperatura del aire) y (ii) los periodogramas de la intensidad lumínica medida en las piscinas, que permiten evaluar la presencia y robustez de ritmos diarios en esta variable.

### 7.1. Descripción del termociclo de la temperatura del aire:

Se analizó el patrón diario de temperatura del aire registrado en la estación meteorológica del Aeropuerto de Melilla (estación más cercana, INUMET) durante los meses de febrero y julio (Figura 7.1). Los datos muestran un marcado ciclo diario, con temperaturas que aumentan progresivamente durante el día y descienden durante la noche. La amplitud térmica fue de aproximadamente 9°C en ambos meses, y no se observaron diferencias significativas entre estaciones (test de t:  $p=0,72$ ). Para comparar la estabilidad del ritmo, se calculó el IS en ventanas de 5 días y se obtuvo el IS mediano para ambos meses. El IS fue de 0,62 durante el mes de febrero, y tomó valores con una mediana de 0,59 durante el mes de julio, aunque esta diferencia no fue significativa (test de t:  $p=0,93$ ).

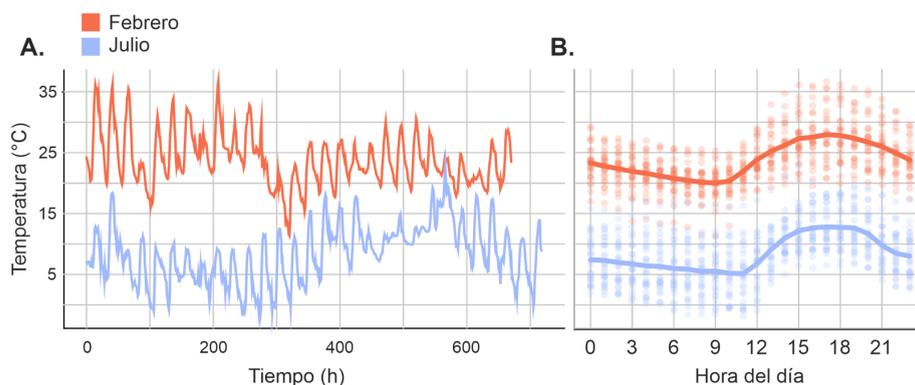


Figura 7.1: Temperatura del aire durante los meses experimentales de febrero y julio. **A.** Temperatura del aire registrada durante un mes en febrero (naranja) y julio (celeste). **B.** Temperatura media por hora del día para cada mes, mostrando los máximos y mínimos diarios característicos.

## 7.2. Periodicidad de la luz en las piscinas experimentales:

Para caracterizar el patrón lumínico presente en las arenas experimentales, se construyeron periodogramas de Lomb-Scargle para los registros de intensidad de luz obtenidos en las piscinas. Este análisis mostró un pico marcado en torno a las 24 horas en todos los casos, así como picos del segundo armónico cercanos a las 12 horas. Este resultado confirma que, incluso con variaciones en la magnitud absoluta de la luz entre días o entre piscinas, el ciclo luz–oscuridad impuesto por el ambiente se mantuvo estable durante el periodo de registro.

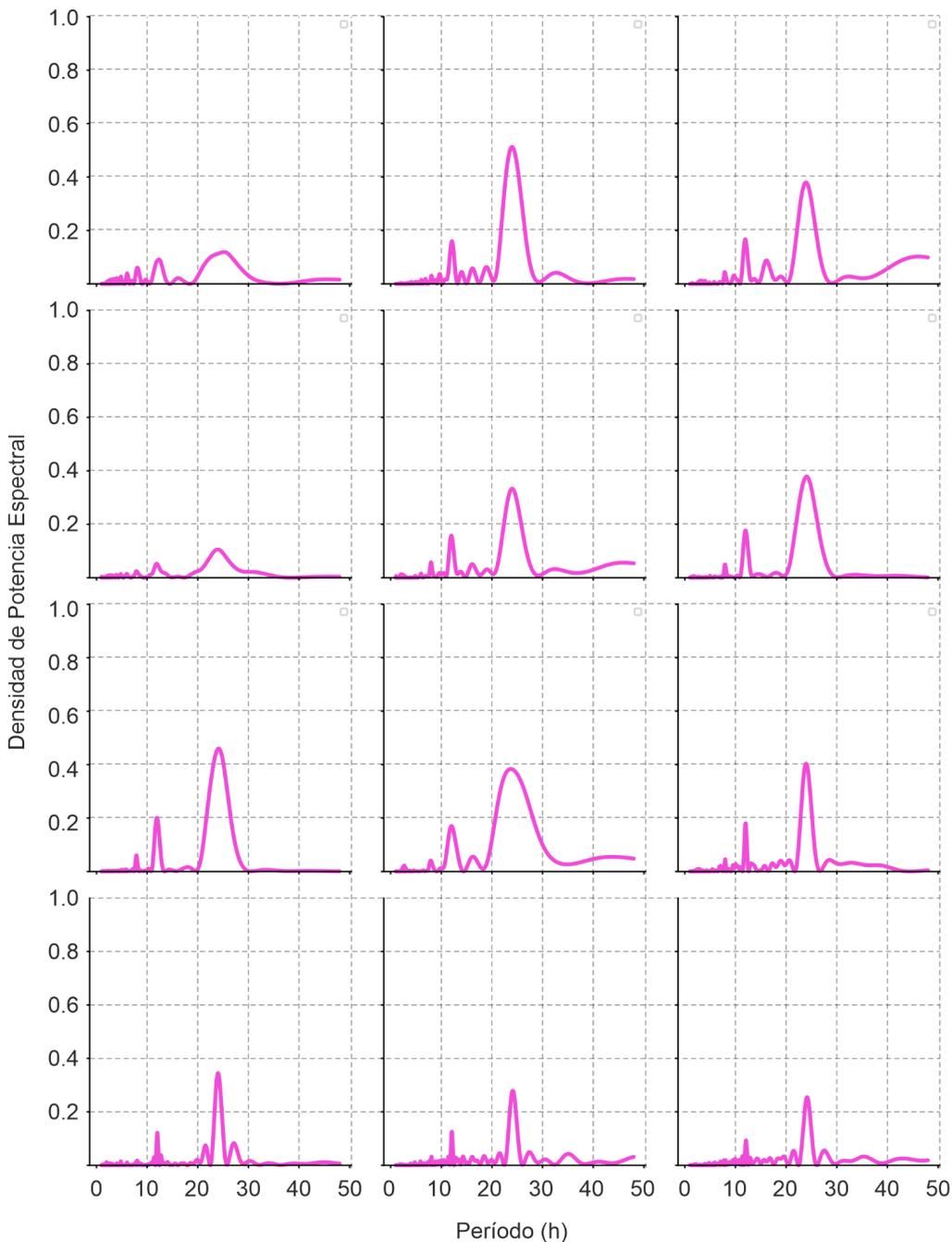


Figura 7.2: Periodogramas de Lomb-Scargle de la intensidad lumínica medida en distintas piscinas experimentales.

## **8. Anexo: Puesta a punto de la cuantificación de genes de la vía melatoninérgica vía qPCR**

Si bien esta tesis está fuertemente planteada desde un marco etológico, resulta interesante un segundo plano de aproximación desde un punto de vista fisiológico. Dicho de otra manera, el estudio de los mecanismos subyacentes que regulan la expresión de patrones diarios. En lo que refiere a el vínculo entre la temperatura y los ritmos circadianos, dos claras vías a explorar son los mecanismos de termorrecepción (i.e.: cómo el cerebro adquiere información de la temperatura ambiental) y la sensibilidad de la vía melatoninérgica a los cambios de la temperatura ambiente, entendiendo a la melatonina como principal mensajero circadiano en teleósteos.

La melatonina actúa uniéndose a receptores que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G. Existen cuatro tipos de receptores: MT1 y MT2 (previamente Mel1A y Mel1B), ubicuos en vertebrados y MT3 y Mel1d, exclusivos de vertebrados no mamíferos (Denker y cols. 2019). Los diferentes subtipos de receptores se expresan de forma diferencial en distintos tejidos. El efecto de la hormona en estos tejidos se va a ver regulado por el subtipo de receptor, la cantidad de receptor expresado y la afinidad de estos por la hormona (Confente y cols 2010, Gaildrat y cols. 1998, López-Patiño y cols. 2008, Muñoz-Pérez y cols. 2016, Shin y cols. 2011).

En cuanto a las vías termorreceptoras, en los últimos años, los canales TRP han ganado relevancia como posible mecanismo por el cual diferentes estructuras oscilatorias adquieren información térmica (Poletini y cols. 2015). La familia de canales iónicos TRP (*Transient Receptor Potential*) consiste en un grupo de canales catiónicos que funcionan como sensores de múltiples tipos de estímulos (Damann y cols. 2008). Forman canales permeables a  $Ca^{2+}$  y diferentes miembros de la familia pueden activarse por estímulos mecánicos, químicos, nociceptivos y, lo que nos interesa en este caso, térmicos (Vay y cols. 2012, Zhang y cols. 2023). Varios miembros de la familia TRP en vertebrados e invertebrados son conocidos por su rol en la transducción de cambios en la temperatura ambiental y un subconjunto de estos canales se activa directamente ante cambios de temperatura como parte de su función sensorial. Estos canales se conocen como termoTRPs (Damann y cols. 2008, Patapoutian y cols. 2003).

La primera evidencia del involucramiento de TRPs en la ritmicidad circadiana fue demostrada por Shen y colaboradores en 2011. Sus experimentos revelaron que la discriminación térmica en larvas

de *Drosophila* depende del canal TRPA1 (Shen y cols. 2011). En el imago, TRPA1 se expresa en un subgrupo de neuronas marcapasos del cerebro y la pérdida de TRPA1 afecta la sincronización inducida por temperatura y la expresión del gen reloj *Per* en algunas de estas neuronas marcapasos (Lee y Montell 2013, Roessingh y cols. 2019). En tejidos periféricos, los canales Pyx-TRP ubicados en órganos sensoriales son responsables del acoplamiento a termociclos bajos de entre 16 y 20 °C (Wolfgang y cols. 2013). La sensibilidad de los distintos termoTRPs a la temperatura parece variar entre especies (Laursen y cols. 2015, Nisembaum y cols. 2015; 2022) y su expresión parece variar con las estaciones del año (Nisembaum y cols. 2015).

Cómo una primera aproximación al estudio de estos mecanismos, se llevó a cabo la puesta a punto de la cuantificación génica mediante PCR de componentes del sistema melatoninérgico en dos áreas clave: el cerebro anterior, implicado en la integración de señales relevantes para la organización de la conducta y el núcleo electromotor bulbar (NEB). El desarrollo de estas herramientas moleculares en esta especie permitirá avanzar hacia un análisis cuantitativo que vincule cambios en el sistema melatoninérgico con variaciones en la temperatura ambiental y con los cambios conductuales observados.

En el presente anexo se detalla el trabajo de puesta a punto de herramientas moleculares para el estudio del sistema melatoninérgico en *Gymnotus omarorum*. Este sistema comprende las estructuras de transducción de señales ambientales, los sitios de síntesis de melatonina y los circuitos que expresan sus receptores. Nos propusimos optimizar la identificación y cuantificación génica de los receptores de melatonina MT1, MT2 y MT3, así como de la enzima arilalquilamina N-acetiltransferasa (AANAT), clave en la vía de síntesis de melatonina. Además, se incluyó en este abordaje al receptor TRPv1, dada su sensibilidad a la temperatura, variable ambiental de interés en este trabajo. Este trabajo contó con el apoyo de PEDECIBA mediante una pasantía de investigación en el Departamento de Biología Molecular del IIBCE, con la Dra. Astrid Agorio.

### **8.1. Objetivo específico**

1. Obtener un protocolo eficiente para la cuantificación de la expresión de genes asociados a la vía melatoninérgica mediante RT-qPCR.

### **8.2. Materiales y métodos**

Se disecaron cerebros de *G. omarorum* que fueron inmediatamente congelados y almacenados a -80 °C. Los cerebros fueron cortados con criostato para obtener regiones de interés: el área preóptica

anterior (POA) y la región supra-commissural del telencéfalo ventral (Vs), homólogo del núcleo del lecho de la estría terminal (BnST) en mamíferos (Ogawa y cols. 2021) y el NEB. Para ello los cerebros fueron recubiertos en Tissue-Tek® O.C.T. Compound y se realizaron cortes coronales comenzando por el extremo rostral. Se realizaron cortes de 50  $\mu\text{m}$  para aproximarse a los sitios de interés y al acercarnos a éstos se realizaron cortes de 100  $\mu\text{m}$  hasta llegar a la comisura anterior. Una vez identificada esta referencia anatómica, se cortaron rodajas de 200  $\mu\text{m}$  hasta visualizarse el quiasma óptico. El POA se extiende dentro de la sección entre la comisura anterior hasta el quiasma óptico, abarcando una longitud rostro-caudal de aproximadamente 800  $\mu\text{m}$ , por lo cual se colectaron 6 rodajas de 200  $\mu\text{m}$  para el muestreo de esta área. Las secciones contienen además el Vs. Una vez extraído el POA y los otros núcleos de interés se siguió cortando a 100  $\mu\text{m}$  hasta observar la aparición de las neuronas de relevo del NEB. Se obtuvieron 4 rodajas de 200  $\mu\text{m}$  que contienen la totalidad del NEB. En una primera aproximación se utilizaron micro-disecciones (bocados) de 500  $\mu\text{m}$  de diámetro para individualizar cada núcleo. En cada rodaja conteniendo al POA (estructura bilateral) se extrajeron 2 bocados y en de las que contenían al NEB (estructura única medial) se extrajo 1 bocado. Por lo tanto para cada animal se obtuvieron una muestra de POA compuesta por 12 bocados y una de NEB compuesta por 4 bocados.

Para la detección y cuantificación de ARN mensajeros se realizó la extracción de ARN de las muestras y su retrotranscripción a ADN copia, para luego realizar la qPCR que amplifica las secuencias de ADN utilizando cebadores específicos y finalmente permite obtener la cuantificación de los transcriptos originales de ARN. Para extraer el ARN de las muestras de tejido se utilizó el kit de extracción Ambion® RNAqueous®-Micro Kit (Thermo Fisher Scientific), diseñado para aislar ARN total a partir de muestras de poco tejido ( $\leq 10$  mg). La retrotranscripción del ARN fue realizada utilizando la enzima SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Se siguió el protocolo explicitado en el kit. Se utilizó un volumen total de 20  $\mu\text{L}$  por muestra y se utilizaron oligo(dT) como cebadores. El ADN copia (ADNc) obtenido fue conservado a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su posterior uso en qPCR.

Una vez seleccionados los genes de interés, se procedió al diseño de cebadores utilizando herramientas bioinformáticas. En primer lugar, se buscaron secuencias de referencia de los genes seleccionados en teleósteos a través del BLAST del NCBI. Las secuencias obtenidas fueron luego ingresadas en la plataforma EFISH Genomics (<https://www.efishgenomics.com>), donde se

compararon con los transcriptomas disponibles de *Gymnotus omarorum* (Eastman y cols. 2020) y del gymnotiforme simpátrico *Brachyhyppopomus gauderio* (Tian y cols. 2017). A partir de estas comparaciones se seleccionaron las secuencias con mayor grado de identidad para cada gen: MT2, AANAT y TRPV1 mostraron coincidencias con el transcriptoma de *G. omarorum*, mientras que MT1 y MT3 solo se identificaron en el transcriptoma de *B. gauderio*.

Las secuencias seleccionadas fueron utilizadas como molde para el diseño de cebadores mediante la herramienta PrimerQuest (Integrated DNA Technologies). El diseño de estos cebadores (además de ser específicos al gen de interés) debe cumplir ciertos criterios para asegurar una eficiencia óptima (>95%). Los oligonucleótidos se diseñaron manteniendo una longitud de entre 18 y 22 nucleótidos, un contenido de GC entre 50 % y 55 %, una temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) entre 60 °C y 65 °C y una T<sub>m</sub> para estructuras secundarias (horquillas) inferior a 32 °C. Los cebadores utilizados se detallan en la Tabla 3.1.

Las reacciones de qPCR fueron realizadas utilizando SYBR™ Green como agente intercalante (SYBR Green Master Mix 2X, Bio-Rad). Para cada reacción se preparó una solución de reacción premezclada con el siguiente contenido por muestra: 10 µL de SYBR Green 2X, 0.8 µL de primer forward (10 µM), 0.8 µL de primer reverse (10 µM), 6.4 µL de agua miliQ y 2 µL de ADNc, alcanzando un volumen final de 20 µL por tubo. En el caso del control negativo (CN), el ADNc fue reemplazado por agua miliQ.

Gen	Especie	Fuente	N°	Secuencia	Largo	Contenido GC	Temp. Melt. (°C)
MT2 (Mel1B)	<i>G. omarorum</i>	Eastman y cols. 2020	1	L ATCCTGCTGTCACCTGCAA	20	50	60.5
				R GATAGTCGCTGCCTTTTGCT	20	50	58.8
			2	L GGTGGTGTATGGACTGCTCA	20	55	63.6
				R CCCTTGATGTTTCCTGCAGG	20	55	62.9
MT1 (Mel1A)	<i>B. gauderio</i>	Tian y cols. 2017	2	L CATTGTGTGTGAGCCTGGCC	20	55	63.9
				R CCACGACACTCAGACCCATC	20	60	63.8
MT3 (Mel1C)	<i>B. gauderio</i>	Tian y cols. 2017	2	L GGTGTGTGTGGTTGCCATC	20	55	63.9
				R CGTGGTGAGTACAAGCGGAT	20	55	64
AANAT	<i>G. omarorum</i>	Eastman y cols. 2020	1	L TTGTAGAATGGCAGGAGACG	20	50	59.1
				R TTCTGGCTGTACATCGAACG	20	50	59.1
			2	L GGACAGAGGCTCAGGAAATG	20	55	62
				R GCTTCACGAGTTCGGTGTAT	20	50	62
TRPV1	<i>G. omarorum</i>	Eastman y cols. 2020	2	L ACATGACTCCAACAGCTCCA	20	50	60.5

Tabla 8.1: Cebadores diseñados para utilizar en RT-qPCR. La columna N° indica si se utilizaron con el primer o segundo protocolo de la puesta a punto.

### 8.3. Resultados

A partir de este protocolo y utilizando 3 individuos (Sabrina Pose, comunicación personal) se logró extraer una concentración promedio de ARN de 11,49 ng/ $\mu$ L por muestra de POA y 6,33 ng/ $\mu$ L por muestra de NEB. Se realizaron qPCRs para tres genes:  $\beta$ -actina como gen de referencia, AANAT y MT2 y se obtuvieron los valores de ciclo umbral sobre el cuál la fluorescencia del agente intercalante comenzaba a aumentar (*Threshold cycle*, Ct) y la temperatura en la cuál el 50% de los cebadores se desasocian de su amplicón (*Melting Temperature*, Tm). En ambos tejidos la  $\beta$ -actina, tuvo un Ct promedio de 22,87 y 24,04 respectivamente, lo que se condice con los resultados obtenidos previamente (Guillermo Valiño, comunicación personal). AANAT y MT2 mostraron valores de Ct elevados, ubicándose el gen AANAT alrededor del ciclo 31,5 y MT2 en el ciclo 33,7. Este ciclo umbral indica que el termociclador realizó > 30 ciclos antes de que los valores de fluorescencia (que indican la cantidad de producto amplificado) superaran el umbral. Valores por encima de los 30 indican un producto en muy bajas concentraciones y dificultan la cuantificación precisa ya que a esa altura comienzan a aparecer interacciones inespecíficas en el sistema. En todos los casos, la curva de disociación dió un único pico a la temperatura esperada para el gen (Figura 8.1B y D). Como paso inequívoco para afirmar que los productos amplificados son de los genes de interés, las muestras fueron enviadas a secuenciar (Macrogen), donde se confirmó la especificidad (Tabla 8.2). No obstante, las curvas de amplificación no alcanzaban una fase de saturación clara, lo cual sugería una eficiencia subóptima del diseño de cebadores.

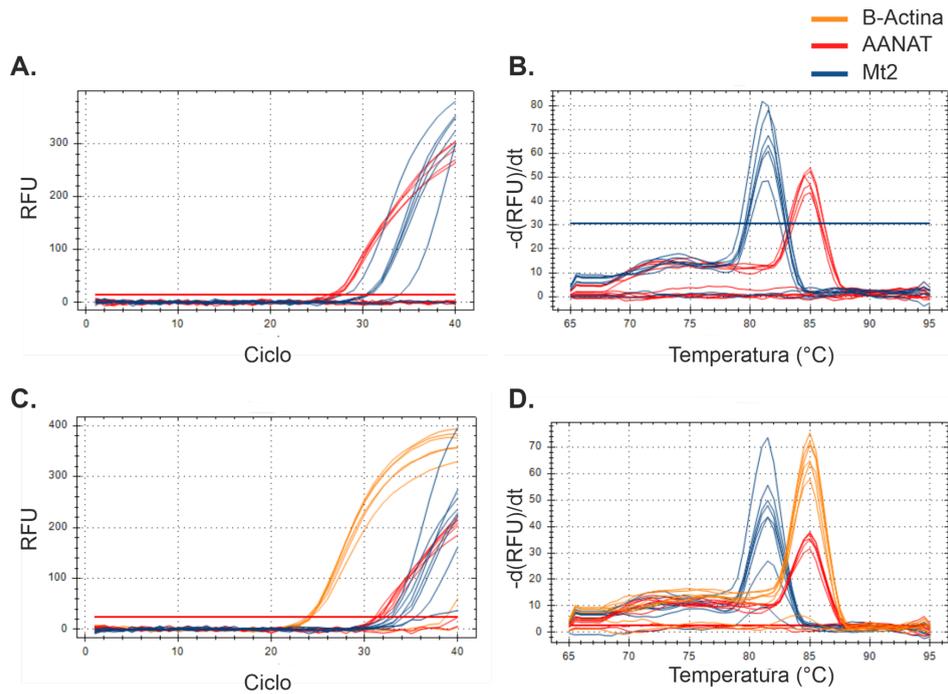


Figura 8.1: Resultados de RT-qPCR utilizando micro-disecciones de 500  $\mu\text{m}$ . **A.** Curva de amplificación para los genes *MT2* y *AANAT* en una muestra de micro-disecciones del POA. **B.** Curva de desnaturalización para A. **C.** Curva de amplificación para los genes *β-Actina*, *MT2* y *AANAT* en una muestra de micro-disecciones del NEB. **D.** Curva de desnaturalización para C.

Gen	Nº	Sec. de productos obtenidos	Mayor similitud	Especie	Valor E	Porcentaje de cobertura
MT2 (Mel1B)	1	L CTTTCCTGCGGAAGCTCAAGGGGGGGCCAGAAACAGTAAACAGTACACCT GGCAATAACAATGAGCAGCAAAGGCCAGCCACTATAAGA	melatonin receptor type 1B-A	<i>Electrophorus electricus</i>	2.00E-06	94.00%
		R CTTTTGCAAGGTGCTGTTTATTACTACGTTCTGTGCCCCCTTGAATGTTCTCG CAGGAAGAGGTGGGGCTTGACAGATGACAGCAGGATCGAAAAACCCGCCAAT CACA	melatonin receptor type 1B-A-like	<i>Sinocyclocheilus grabami</i>	6.00E-08	86.00%
	2	L AATCGCGAGAGTACCGCGCATCTGCTGTCACCTCTGCAAGCCCACTCTTC CTGCAGGAAACATCAAGGGA	melatonin receptor type 1B-A-like	<i>Carassius auratus</i>	8.00E-05	90.00%
		R GGTGTTAATGGGCTCGAGTGAAGCAGGATGCGGGTACTCTCTGCGA AAGTTCTGGTTGAGCAGTCCATACACCACCCG	melatonin receptor type 1B-A	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	0.004	70.00%
AANAT	1	L GATGAGCTGCGCGGACCCAGTGGAGCAAGCAGTGAATACTGCAAGTAGGG CCACATCAGAGGGTCTTTTCCTCTGCTGCGAAGCCTGCAATGATGACAGCCA GAAA	Serotonin N-acetyltransferase	<i>Collichthys lucidus</i>	3.00E-12	90.00%
		R CTGGTAGGACGCTCTGTGATGTTGGGCTACTTGCAGTATTACACTGCTTGCCTC ACGTGCGTGGCGACTGCTCATGTGGGAAGACCCTCTCTGTCACATTTACAAA	serotonin N-acetyltransferase	<i>Salmo salar</i>	2.00E-56	47.00%
	2	L GGGGTCAGAGCAGTGGCGGACGCTGAGGGCAAGCAGTGAATACTGCAAG TAGCGCCACATCAGAGCGGCTTTTCCTGCTGCGAAGCCTGCGAATGATGACA GCCAGAAAACGCTCTGATTTGGGCAACAGCAGTGAATTTATATGGCTCCG GCTGGGCCCTCTGCTGGCTGTTGGCACTGGGAAGATATAGGGTGTCTGTGG TGGCGCCACTGTGTTGGCGATCTCGATGTGTGATCGCGCACAGTACATAC ATCTTGAGTGTGACAAAGCGTGTGGTGCAGCGGTGCCATGTCATAGGTCGG TGATCGTACATCAACAAGCGCTACGCCCCGATGTGGTTATATGCTTAC AG	serotonin N-acetyltransferase-like	<i>Nematolebias whitei</i>	6.00E-11	29.00%
		R CCAGTAAGGACGCTCTGTGATGTTGGGCTACTTGCAGTATTACACTGCTTGC CTCACGTGCTGGGCACTGCTCATGTGGGAAGCCGCTCTGCTGCCATTTAC AAAGAGACATCAGAGGACCTATGGAACGTACTTTATGGTCTGCTCCCGG AGAGCCCTTCCCGGTGGAAGGACCTGGACAGATATAGGAAGTTTGTATC CTGCCCGCCCTCCCGCTTACCTTGTGGATTTGTCCCAACACTTAGCTCT CATCCGACAGCTTACCAGTCAATAAAGCGGCTGGGCTGGTACGCTCTC GTCAGTCCGGCTACCGGAGCGTTCAGGCTATGCTGGGCTTTGGCGG GAGAGCTAGGCTACGTCGGTATGCAATACGCCAAGTCTTACAGATCCGC CTTTTAGGTACGGCTGTGTAGTGTACGAGGCTCAAGTTTAACTAGC CGCTTCTGAACTCTTAAGCATAGGGTGTGCTAGTCCGGACAGTTATAGGT GAACATAGGGCACTATCTGTTAGTACCGAAAAACATTAAGTTTGAAGGC CAAACCTTGTTCGCTCTCACTACTTGTCTATTGCCAGAGGTTAAGATT CGGTTGCGAGTCACTA	serotonin N-acetyltransferase	<i>Oncorhynchus nerka</i>	3.00E-09	50.00%

Tabla 8.2: Resultados de la secuenciación de los amplicones obtenidos por RT-qPCR. Para obtener la identidad de los amplicones obtenidos se utilizó la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) de NCBI. La columna Nº indica si se obtuvieron utilizando el 1er o 2do protocolo de la puesta a punto. La columna de mayor similitud implica cuál fue el gen en la base de datos que más se acercaba a la secuencia obtenida, ordenado según el valor E (un menor valor E indica menor probabilidad de que la alineación entre la secuencia del amplicón y del gen de referencia se de por azar). El porcentaje de cobertura indica cuánto de la secuencia del amplicón está realmente alineado con la secuencia de referencia.

Con el objetivo de optimizar la cantidad del ARN, así como la eficiencia de amplificación, se modificó el protocolo de la siguiente forma. En un primer lugar, se siguió la estrategia descrita en Eastman y cols. 2020 y se emplearon 6 rodajas completas de 200 µm de mesencéfalo conteniendo el POA y otras estructuras de la red del cerebro social para maximizar la cantidad de ARN extraído. Debido a la naturaleza del tejido, más resistente a la homogeneización que otros, se optó por añadir un paso adicional de triturado de tejido, paso clave inicial para extraer ARN. Para ello se utilizó un homogeneizador mecánico acoplado a un taladro eléctrico durante 1 min. Por otro lado, al ser el

cerebro un tejido muy graso, la cantidad de etanol recomendada por el protocolo llevaba a una precipitación de material que disminuía de forma significativa la concentración de ARN obtenido. Así, se utilizó una concentración de 50  $\mu\text{L}$  EtOH/10 mg en vez de la especificada en el protocolo (129  $\mu\text{L}$  EtOH/10 mg). Esto permitió la obtención de una concentración de ARN de 150 ng/ $\mu\text{L}$ , aproximadamente un orden de magnitud más que con el protocolo de extracción de micro muestreo por sacabocados, lo que proporcionó un mejor punto de partida para analizar variaciones en la expresión génica. Además se sintetizaron nuevos cebadores tanto para los genes de interés, como para para otros dos receptores de melatonina (MT1 y MT3) y un canal TRP (TRPV1). Estos cebadores se marcan en la tabla 8.1 con un 2 en la columna de N°.

En este segundo enfoque, los valores de Ct obtenidos fueron notablemente más bajos: AANAT mostró un Ct de 26,54, MT2 un Ct de 27,05 y  $\beta$ -actina un Ct de 19,17, reflejando una mejora en la eficiencia del sistema (Figura 8.2A). Se evaluaron los genes MT1 y MT3, pero en ambos casos no se detectó amplificación específica de estos genes (Figura 8.2C), lo que podría sugerir que estos no están siendo expresados en éste núcleo. Para confirmar esto se necesitaría contar con el genoma de la especie para lograr construir cebadores específicos para *G. omarorum*. Las curvas de disociación correspondientes a esta serie experimental también mostraron un único pico por gen, confirmando la especificidad del producto amplificado (Figura 8.2B y D).

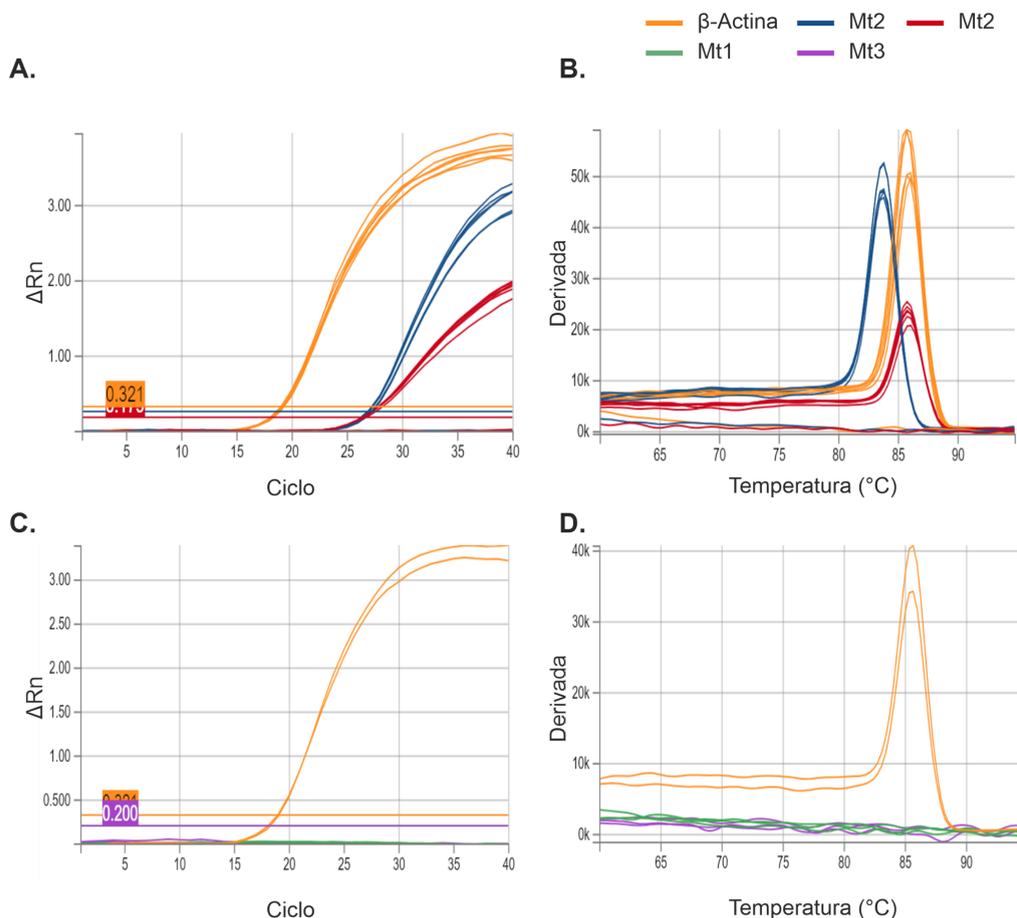


Figura 8.2: Resultados de RT-qPCR utilizando secciones enteras de tejido. **A.** Curvas de amplificación para los genes  $\beta$ -Actina, MT2, AANAT en una muestra de POA. **B.** Curvas de desnaturalización para A. **C.** Curvas de amplificación para los genes  $\beta$ -Actina, MT1 y MT3 en una muestra de POA. **D.** Curvas de desnaturalización para C.

#### 8.4. Discusión

Los resultados aquí presentados representan un avance significativo en la generación de herramientas moleculares para el estudio del sistema melatoninérgico en *Gymnotus omarorum*. La optimización del protocolo de extracción de ARN y el diseño de nuevos cebadores permitió mejorar notablemente la eficiencia de amplificación para los genes AANAT y MT2, lo que constituye un primer paso fundamental para estudiar de forma confiable la dinámica de este sistema en relación a factores ambientales como la temperatura, aunque persisten desafíos metodológicos que deben ser abordados.

En particular, se identificó la necesidad de diseñar cebadores específicos para *G. omarorum* a partir de información genómica propia de la especie, especialmente para los genes MT1 y MT3, dado que los primers diseñados a partir de transcriptomas de especies afines no mostraron resultados concluyentes. Si bien las secuencias de estos genes suelen ser altamente conservadas, lo que en principio permitiría su detección incluso con cebadores no óptimos, la ausencia de amplificación específica impide descartar que esta limitación sea de origen técnico y no biológico. Por otra parte, un paso clave a futuro será la puesta a punto de la cuantificación génica del receptor TRPv1, dada su relevancia como sensor de temperatura. Finalmente, contar con estos recursos permitirá explorar de forma comparativa la expresión de estos genes en diferentes núcleos del cerebro, así como evaluar su variación a lo largo del día y entre estaciones, en particular para intentar vincular estos mecanismos moleculares con el termoperiodo natural.

## 9. Referencias

- Adamovich, Y., Ladeuix, B., Golik, M., Koeners, M. P., & Asher, G. (2017). Rhythmic Oxygen Levels Reset Circadian Clocks through HIF1 $\alpha$ . *Cell Metabolism*, 25(1), 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.09.014>
- Aschoff, J. (1981a). CIRCADIAN SYSTEM PROPERTIES. In F. Obál & G. Benedek (Eds.), *Environmental Physiology* (pp. 1–17). Pergamon. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-027339-6.50006-3>
- Aschoff, J. (1981b). Freerunning and Entrained Circadian Rhythms. In J. Aschoff (Ed.), *Biological Rhythms* (pp. 81–93). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6552-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6552-9_6)
- Ashton, A., Foster, R. G., & Jagannath, A. (2022). Photic Entrainment of the Circadian System. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2). <https://doi.org/10.3390/ijms23020729>
- Baluev, R. v. (2008). Assessing the statistical significance of periodogram peaks. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*, 385(3), 1279–1285. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2966.2008.12689.x>
- Batista, G., Zubizarreta, L., Perrone, R., & Silva, A. (2012). Non-sex-biased Dominance in a Sexually Monomorphic Electric Fish: Fight Structure and Submissive Electric Signalling. *Ethology*, 118(4), 398–410. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2012.02022.x>
- Bellemer, A. (2015). Thermo taxis, circadian rhythms, and TRP channels in *Drosophila*. In *Temperature* (Vol. 2, Issue 2, pp. 227–243). Routledge. <https://doi.org/10.1080/23328940.2015.1004972>
- Bell-Pedersen, D., Cassone, V. M., Earnest, D. J., Golden, S. S., Hardin, P. E., Thomas, T. L., & Zoran, M. J. (2005). Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nature Reviews. Genetics*, 6(7), 544–556. <https://doi.org/10.1038/NRG1633>
- Bennett, M. V. L. (1971). Electric Organs. In W. S. Hoar & D. J. Randall (Eds.), *Fish Physiology* (Vol. 5, pp. 347–491). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60051-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60051-5)
- Bennett, M. v, Pappas, G. D., Giménez, M., & Nakajima, Y. (1967). Physiology and ultrastructure of electrotonic junctions. IV. Medullary electromotor nuclei in gymnotid fish. *Journal of Neurophysiology*, 30(2), 236–300. <https://doi.org/10.1152/jn.1967.30.2.236>
- Ben-Shlomo, R., Ritte, U., & Nevo, E. (1995). Activity pattern and rhythm in the subterranean mole rat superspecies *Spalax ehrenbergi*. *Behavior Genetics*, 25(3), 239–245. <https://doi.org/10.1007/BF02197182>
- Black-Cleworth, P. (1970). The Role of Electrical Discharges in the Non-Reproductive Social Behaviour of *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Pisces). *Animal Behaviour Monographs*, 3, 1-IN1. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0066-1856\(70\)80001-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0066-1856(70)80001-2)
- Blanchong, J. A, McElhinny, T. L, Mahoney, M. M, & Smale, L. (1999). Nocturnal and Diurnal Rhythms in the Unstriped Nile Rat, *Arvicanthus niloticus*. *Journal of Biological Rhythms*, 14(5), 364–377. <https://doi.org/10.1177/074873099129000777>
- Borde, M., Quintana, L., Comas, V., & Silva, A. (2020a). Hormone-mediated modulation of the electromotor CPG in pulse-type weakly electric fish. Commonalities and differences across species. *Developmental Neurobiology*, 80(1–2), 70–80. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/dneu.22732>

- Borde, M., Quintana, L., Comas, V., & Silva, A. C. (2020b). Hormone-mediated modulation of the electromotor CPG in pulse-type weakly electric fish. Commonalities and differences across species. *Developmental Neurobiology*, *80*(1–2), 70–80. <https://doi.org/10.1002/dneu.22732>
- Botts, R. T., Eppert, A. A., Wiegman, T. J., Rodriguez, A., Blankenship, S. R., Asselin, E. M., Garley, W. M., Wagner, A. P., Ullrich, S. E., Allen, G. R., & Mooring, M. S. (2020). Circadian activity patterns of mammalian predators and prey in Costa Rica. *Journal of Mammalogy*, *101*(5), 1313–1331. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyaa103>
- Buhr, E. D., & Takahashi, J. S. (2013). Molecular Components of the Mammalian Circadian Clock. In A. Kramer & M. Meroz (Eds.), *Circadian Clocks* (pp. 3–27). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-25950-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-25950-0_1)
- Busza, A., Murad, A., & Emery, P. (2007). Interactions between circadian neurons control temperature synchronization of *Drosophila* behavior. *Journal of Neuroscience*, *27*(40), 10722–10733. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2479-07.2007>
- Calisi, R. M., & Bentley, G. E. (2009). Lab and field experiments: Are they the same animal? *Hormones and Behavior*, *56*(1), 1–10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.02.010>
- Camargo, A. S., Caputi, A. A., & Aguilera, P. A. (2023). The sensory effects of light on the electric organ discharge rate of *Gymnotus omarorum*. *Journal of Experimental Biology*, *226*(17), jeb245489. <https://doi.org/10.1242/jeb.245489>
- Caputi, A. A., Aguilera, P. A., & Castelló, M. E. (2003). Probability and amplitude of novelty responses as a function of the change in contrast of the reafferent image in *G. carapo*. *Journal of Experimental Biology*, *206*(6), 999–1010. <https://doi.org/10.1242/jeb.00199>
- Caputi, A. A., & Trujillo-Cenóz, O. (1994). The Spiral Cord of *Gymnotus carapo*: The Electromotoneurons and Their Projection Patterns. *Brain, Behavior and Evolution*, *44*(3), 166–174. <https://doi.org/10.1159/000113588>
- Cassone, V. M. (2014). Avian circadian organization: A chorus of clocks. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *35*(1), 76–88. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2013.10.002>
- Cazaméa-Catalan, D., Magnanou, E., Helland, R., Besseau, L., Boeuf, G., Falcón, J., & Jørgensen, E. H. (2013). Unique arylalkylamine N-acetyltransferase-2 polymorphism in salmonids and profound variations in thermal stability and catalytic efficiency conferred by two residues. *Journal of Experimental Biology*, *216*(10), 1938–1948. <https://doi.org/10.1242/jeb.080960>
- Cazaméa-Catalan, D., Magnanou, E., Helland, R., Vanegas, G., Besseau, L., Boeuf, G., Paulin, C. H., Jørgensen, E. H., & Falcón, J. (2012). Functional diversity of Teleost arylalkylamine N-acetyltransferase-2: is the timezyme evolution driven by habitat temperature? *Molecular Ecology*, *21*(20), 5027–5041. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05725.x>
- Cloudsley-Thompson, J. L. (1966). Seasonal changes in the daily rhythms of animals. *International Journal of Biometeorology*, *10*(2), 119–125. <https://doi.org/10.1007/BF01426857>
- Cohen, S. E., & Golden, S. S. (2015). Circadian Rhythms in Cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *79*(4), 373–385. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00036-15>
- Comas, V., & Borde, M. (2010). Neural Substrate of an Increase in Sensory Sampling Triggered by a Motor Command in a Gymnotid Fish. *Journal of Neurophysiology*, *104*(4), 2147–2157. <https://doi.org/10.1152/jn.00076.2010>

- Comas, V., & Borde, M. (2021). Glutamatergic control of a pattern-generating central nucleus in a gymnotiform fish. *Journal of Neurophysiology*, *125*(6), 2339–2355. <https://doi.org/10.1152/jn.00584.2020>
- Comas, V., Langevin, K., Silva, A., & Borde, M. (2019). Distinctive mechanisms underlie the emission of social electric signals of submission in *Gymnotus omarorum*. *Journal of Experimental Biology*, *222*(11), jeb195354. <https://doi.org/10.1242/jeb.195354>
- Confente, F., Rendón, M. C., Besseau, L., Falcón, J., & Muñoz-Cueto, J. A. (2010). Melatonin receptors in a pleuronectiform species, *Solea senegalensis*: Cloning, tissue expression, day–night and seasonal variations. *General and Comparative Endocrinology*, *167*(2), 202–214. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.03.006>
- Cornelissen, G. (2014). Cosinor-based rhythmometry. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, *11*(1), 16. <https://doi.org/10.1186/1742-4682-11-16>
- Crampton, W. G. R. (2019). Electroreception, electrogenesis and electric signal evolution. *Journal of Fish Biology*, *95*(1), 92–134. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfb.13922>
- Creux, N., & Harmer, S. (2019). Circadian rhythms in plants. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *11*(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034611>
- Damann, N., Voets, T., & Nilius, B. (2008). TRPs in Our Senses. In *Current Biology* (Vol. 18, Issue 18). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.07.063>
- Davidson, A. J., & Menaker, M. (2003). Birds of a feather clock together – sometimes: social synchronization of circadian rhythms. *Current Opinion in Neurobiology*, *13*(6), 765–769. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.conb.2003.10.011>
- Deng, T.-S., & Tseng, T.-C. (2000). EVIDENCE OF CIRCADIAN RHYTHM OF ELECTRIC DISCHARGE IN *EIGENMANNIA VIRESCENS* SYSTEM. *Chronobiology International*, *17*(1), 43–48. <https://doi.org/10.1081/CBI-100101030>
- Denker, E., Ebbesson, L. O. E., Hazlerigg, D. G., & Macqueen, D. J. (2019). Phylogenetic reclassification of vertebrate melatonin receptors to include MEL1D. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, *9*(10), 3225–3238. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400170>
- Dunlap, K. D., Pelczar, P. L., & Knapp, R. (2002). Social Interactions and Cortisol Treatment Increase the Production of Aggressive Electrocommunication Signals in Male Electric Fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *Hormones and Behavior*, *42*(2), 97–108. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/hbeh.2002.1807>
- Dunlap, K. D., Smith, G. T., & Yekta, A. (2000). Temperature Dependence of Electrocommunication Signals and Their Underlying Neural Rhythms in the Weakly Electric Fish, *Apteronotus leptorhynchus*. *Brain Behavior and Evolution*, *55*(3), 152–162. <https://doi.org/10.1159/000006649>
- Eastman, G., Valiño, G., Radío, S., Young, R. L., Quintana, L., Zakon, H. H., Hofmann, H. A., Sotelo-Silveira, J., & Silva, A. (2020). Brain transcriptomics of agonistic behaviour in the weakly electric fish *Gymnotus omarorum*, a wild teleost model of non-breeding aggression. *Scientific Reports*, *10*(1), 9496. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66494-9>
- Egg, M., Louise, K., Jun, H., Thorsten, S., Clemens, F., Antje, K., Birgit, F., Markus, M., Willi, S., Paolo, S.-C., & Pelster, B. (2013). Linking Oxygen to Time: The Bidirectional Interaction Between the Hypoxic Signaling Pathway

- and the Circadian Clock. *Chronobiology International*, 30(4), 510–529.  
<https://doi.org/10.3109/07420528.2012.754447>
- Emens, J. S., Lewy, A. J., Lefler, B. J., & Sack, R. L. (2005). Relative coordination to unknown “weak zeitgebers” in free-running blind individuals. *Journal of Biological Rhythms*, 20(2), 159–167.  
<https://doi.org/10.1177/0748730404273294>
- Evans, K. J. (1966). Responses of the locomotor activity rhythms of lizards to simultaneous light and temperature cycles. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 19(1), 91–103.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0010-406X\(66\)90549-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0010-406X(66)90549-4)
- Falcón, J., Gothilf, Y., Coon, S. L., Boeuf, G., & Klein, D. C. (2003). Genetic, Temporal and Developmental Differences Between Melatonin Rhythm Generating Systems in the Teleost Fish Pineal Organ and Retina. *Journal of Neuroendocrinology*, 15(4), 378–382. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.00993.x>
- Falcón, J., Migaud, H., Muñoz-Cueto, J. A., & Carrillo, M. (2010). Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 469–482.  
<https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2009.04.026>
- Falcón, J., & Muñoz-Cueto, J. A. (2024). The Pineal Gland and Photoperiodism in Fish. In *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-443-21477-6.00164-4>
- Feng, N. Y., & Bass, A. H. (2014). Melatonin action in a midbrain vocal-acoustic network. *Journal of Experimental Biology*, 217(7), 1046–1057. <https://doi.org/10.1242/jeb.096669>
- Feng, N. Y., & Bass, A. H. (2016). “Singing” Fish Rely on Circadian Rhythm and Melatonin for the Timing of Nocturnal Courtship Vocalization. *Current Biology*, 26(19), 2681–2689. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.07.079>
- Feng, N. Y., Marchaterre, M. A., & Bass, A. H. (2019). Melatonin receptor expression in vocal, auditory, and neuroendocrine centers of a highly vocal fish, the plainfin midshipman (*Porichthys notatus*). *Journal of Comparative Neurology*, 527(8), 1362–1377. <https://doi.org/10.1002/cne.24629>
- Flôres, D. E. F. L., Jannetti, M. G., Valentinuzzi, V. S., & Oda, G. A. (2016). Entrainment of circadian rhythms to irregular light/dark cycles: a subterranean perspective. *Scientific Reports*, 6(1), 34264.  
<https://doi.org/10.1038/srep34264>
- Foà, Augusto, & Bertolucci, Cristiano. (2001). Temperature Cycles Induce a Bimodal Activity Pattern in Ruin Lizards: Masking or Clock-Controlled Event? A Seasonal Problem. *Journal of Biological Rhythms*, 16(6), 574–584.  
<https://doi.org/10.1177/074873001129002268>
- Fossion, R., Rivera, A. L., Toledo-Roy, J. C., & Angelova, M. (2018). Quantification of Irregular Rhythms in Chronobiology: A Time-Series Perspective. In M. A. El-Esawi (Ed.), *Circadian Rhythm - Cellular and Molecular Mechanisms*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.74742>
- Fugère, V., Ortega, H., & Krahe, R. (2010). Electrical signalling of dominance in a wild population of electric fish. *Biology Letters*, 7(2), 197–200. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2010.0804>
- Gaildrat, P., Ron, B., & Falcón, J. (1998). Daily and Circadian Variations in 2-[125I]-Iodomelatonin Binding Sites in the Pike Brain (*Esox lucius*). *Journal of Neuroendocrinology*, 10(7), 511–517.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.1998.00240.x>

Gascue, V. (2024). *Caracterización de la conducta exploratoria frente a estímulos de diferentes valencias en peces eléctricos de descarga débil*.

Gau, P., Poon, J., Ufret-Vincenty, C., Snelson, C. D., Gordon, S. E., Raible, D. W., & Dhaka, A. (2013). The zebrafish ortholog of TRPV1 is required for heat-induced locomotion. *Annals of Internal Medicine*, *158*(6), 5249–5260. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5403-12.2013>

Glaser, F. T., & Stanewsky, R. (2005). Temperature synchronization of the *Drosophila* circadian clock. *Current Biology*, *15*(15), 1352–1363. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.06.056>

Golombek, D. A., & Rosenstein, R. E. (2010). Physiology of circadian entrainment. *Physiological Reviews*, *90*(3), 1063–1102. <https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2009>

Häfker, N. S., & Tessmar-Raible, K. (2020). Rhythms of behavior: are the times changin'? *Current Opinion in Neurobiology*, *60*, 55–66. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.10.005>

Hagedorn, M., & Heiligenberg, W. (1985). Court and spark: electric signals in the courtship and mating of gymnotoid fish. *Animal Behaviour*, *33*(1), 254–265. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(85\)80139-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0003-3472(85)80139-1)

Hamanaka, Y., Hasebe, M., & Shiga, S. (2024). Neural mechanism of circadian clock-based photoperiodism in insects and snails. In *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* (Vol. 210, Issue 4, pp. 601–625). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00359-023-01662-6>

Harper, R. E. F., Dayan, P., Albert, J. T., & Stanewsky, R. (2016). Sensory Conflict Disrupts Activity of the *Drosophila* Circadian Network. *Cell Reports*, *17*(7), 1711–1718. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.029>

Harper, Ross E F, Ogueta, Maite, Dayan, Peter, Stanewsky, Ralf, & Albert, Joerg T. (2017). Light Dominates Peripheral Circadian Oscillations in *Drosophila melanogaster* During Sensory Conflict. *Journal of Biological Rhythms*, *32*(5), 423–432. <https://doi.org/10.1177/0748730417724250>

Heiligenberg, W., Finger, T., Matsubara, J., & Carr, C. (1981). Input to the medullary pacemaker nucleus in the weakly electric fish, *Eigenmannia* (sternopygidae, gymnotiformes). *Brain Research*, *211*(2), 418–423. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)90966-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)90966-5)

Helm, B., Visser, M. E., Schwartz, W., Kronfeld-Schor, N., Gerkema, M., Piersma, T., & Bloch, G. (2017). Two sides of a coin: Ecological and chronobiological perspectives of timing in the wild. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 372, Issue 1734). Royal Society Publishing. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0246>

Henninger, J., Krahe, R., Kirschbaum, F., Grewe, J., & Benda, J. (2018). Statistics of Natural Communication Signals Observed in the Wild Identify Important Yet Neglected Stimulus Regimes in Weakly Electric Fish. *The Journal of Neuroscience*, *38*(24), 5456. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0350-18.2018>

Henninger, J., Krahe, R., Sinz, F., & Benda, J. (2020). Tracking activity patterns of a multispecies community of gymnotiform weakly electric fish in their neotropical habitat without tagging. *Journal of Experimental Biology*, *223*(3), jeb206342. <https://doi.org/10.1242/jeb.206342>

Hoffmann, K. (1969). Die relative Wirksamkeit von Zeitgebern (The Relative Effectiveness of Zeitgebers). *Oecologia*, *3*(2), 184–206. <http://www.jstor.org/stable/4214538>

- Hopkins, C. D., Comfort, N. C., Bastian, J., & Bass, A. H. (1990). Functional Analysis of Sexual Dimorphism in an Electric Fish, *Hypopomus pinnicaudatus*, Order Gymnotiformes (Part 2 of 2). *Brain Behavior and Evolution*, *35*(6), 359–367. <https://doi.org/10.1159/000316075>
- Hunt, R. F., Hortopan, G. A., Gillespie, A., & Baraban, S. C. (2012). A novel zebrafish model of hyperthermia-induced seizures reveals a role for TRPV4 channels and NMDA-type glutamate receptors. *Experimental Neurology*, *237*(1), 199–206. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.06.013>
- Ivanova, T. N., & Iuvone, P. M. (2003). Circadian rhythm and photic control of cAMP level in chick retinal cell cultures: a mechanism for coupling the circadian oscillator to the melatonin-synthesizing enzyme, arylalkylamine N-acetyltransferase, in photoreceptor cells. *Brain Research*, *991*(1), 96–103. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.08.003>
- Johnson, S. L. (2004). Factors influencing stream temperatures in small streams: substrate effects and a shading experiment. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *61*(6), 913–923. <https://doi.org/10.1139/f04-040>
- Jun, J. J., Longtin, A., & Maler, L. (2014). Enhanced sensory sampling precedes self-initiated locomotion in an electric fish. *Journal of Experimental Biology*, *217*(20), 3615–3628. <https://doi.org/10.1242/jeb.105502>
- Kavaliers, M. (1989). Day-night rhythms of shoaling behavior in goldfish: Opioid and pineal involvement. *Physiology & Behavior*, *46*(2), 167–172. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384\(89\)90250-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9384(89)90250-3)
- Kawasaki, M., & Heiligenberg, W. (1989). Distinct mechanisms of modulation in a neuronal oscillator generate different social signals in the electric fish *Hypopomus*. *Journal of Comparative Physiology A*, *165*(6), 731–741. <https://doi.org/10.1007/BF00610872>
- Klein, D. C. (2007). Arylalkylamine N-acetyltransferase: “The timezyme.” *Journal of Biological Chemistry*, *282*(7), 4233–4237. <https://doi.org/10.1074/jbc.R600036200>
- Kramer, B. (1990). Taxonomy of Electroreceptive Teleosts. In B. Kramer (Ed.), *Electrocommunication in Teleost Fishes: Behavior and Experiments* (pp. 3–15). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-84026-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-84026-5_2)
- Kronfeld-Schor, N., & Dayan, T. (2008). Activity patterns of rodents: the physiological ecology of biological rhythms. *Biological Rhythm Research*, *39*(3), 193–211. <https://doi.org/10.1080/09291010701683268>
- Kronfeld-Schor, N., Bloch, G., & Schwartz, W. J. (2013). Animal clocks: when science meets nature. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *280*(1765), 20131354. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1354>
- Kronfeld-Schor, N., Visser, M. E., Salis, L., & van Gils, J. A. (2017). Chronobiology of interspecific interactions in a changing world. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *372*(1734). <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0248>
- Lahiri, K., Vallone, D., Gondi, S. B., Santoriello, C., Dickmeis, T., & Foulkes, N. S. (2005). Temperature Regulates Transcription in the Zebrafish Circadian Clock. *PLOS Biology*, *3*(11), e351-. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030351>
- Laursen, W. J., Evan O, A., Lydia J, H., Sviatoslav N, B., & Gracheva, E. O. (2015). Species-specific temperature sensitivity of TRPA1. *Temperature*, *2*(2), 214–226. <https://doi.org/10.1080/23328940.2014.1000702>
- Lee, G., Gommers, R., Waselewski, F., Wohlfahrt, K., & O’Leary, A. (2019). PyWavelets: A Python package for wavelet analysis. *Journal of Open Source Software*, *4*(36), 1237. <https://doi.org/10.21105/joss.01237>

- Lee, Y., & Montell, C. (2013). Drosophila TRPA1 functions in temperature control of circadian rhythm in pacemaker neurons. *Journal of Neuroscience*, *33*(16), 6716–6725. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4237-12.2013>
- Leise, Tanya L., & Harrington, Mary E. (2011). Wavelet-Based Time Series Analysis of Circadian Rhythms. *Journal of Biological Rhythms*, *26*(5), 454–463. <https://doi.org/10.1177/0748730411416330>
- Lima-Cabello, E., Díaz-Casado, M. E., Guerrero, J. A., Ojalora, B. B., Escames, G., López, L. C., Reiter, R. J., & Acuña-Castroviejo, D. (2014). A review of the melatonin functions in zebrafish physiology. *Journal of Pineal Research*, *57*(1), 1–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jpi.12149>
- Lissmann, H. W. (1958). On the Function and Evolution of Electric Organs in Fish. *Journal of Experimental Biology*, *35*(1), 156–191. <https://doi.org/10.1242/jeb.35.1.156>
- Lissmann, H. W., & Schwassmann, H. O. (1965). Activity rhythm of an electric fish, *Gymnorhamphichthys hypostomus*, ellis. *Zeitschrift Für Vergleichende Physiologie*, *51*(3), 153–171. <https://doi.org/10.1007/BF00299291>
- López Patiño, M. A., Alonso-Gómez, A. L., Guijarro, A., Isorna, E., & Delgado, M. J. (2008). Melatonin receptors in brain areas and ocular tissues of the teleost *Tinca tinca*: Characterization and effect of temperature. *General and Comparative Endocrinology*, *155*(3), 847–856. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2007.11.011>
- López-Olmeda, J. F. (2017). Nonphotic entrainment in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *203*, 133–143. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.09.006>
- López-Olmeda, J. F., & Sánchez-Vázquez, F. J. (2009). Zebrafish Temperature Selection and Synchronization of Locomotor Activity Circadian Rhythm to Ahemeral Cycles of Light and Temperature. *Chronobiology International*, *26*(2), 200–218. <https://doi.org/10.1080/07420520902765928>
- López-Olmeda, J. F., Juan A., M., & Sánchez-Vázquez, F. J. (2006). Light and Temperature Cycles as Zeitgebers of Zebrafish (*Danio rerio*) Circadian Activity Rhythms. *Chronobiology International*, *23*(3), 537–550. <https://doi.org/10.1080/07420520600651065>
- López-Olmeda, J. F., Madrid, J. A., & Sánchez-Vázquez, F. J. (2006). Melatonin effects on food intake and activity rhythms in two fish species with different activity patterns: Diurnal (goldfish) and nocturnal (tench). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *144*(2), 180–187. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.031>
- Marimuthu, G., Rajan, S., & Chandrashekar, M. K. (1981). Social Entrainment of the Circadian Rhythm in the Flight Activity of the Microchiropteran Bat *Hipposideros speoris*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *8*(2), 147–150. <http://www.jstor.org/stable/4599371>
- Mehlhorn, K., Newell, B. R., Todd, P. M., Lee, M. D., Morgan, K., Braithwaite, V. A., Hausmann, D., Fiedler, K., & Gonzalez, C. (2015). Unpacking the exploration–exploitation tradeoff: A synthesis of human and animal literatures. *Decision*, *2*(3), 191–215. <https://doi.org/10.1037/dec0000033>
- Mellert, J., Kłos, W., Dormagen, D. M., Wild, B., Zachariae, A., Smith, M. L., Galizia, C. G., & Landgraf, T. (2024). *Collective flow of circadian clock information in honeybee colonies*. <https://doi.org/10.1101/2024.07.29.605620>
- Menaker, M., Moreira, L. F., & Tosini, G. (1997). Evolution of circadian organization in vertebrates. In *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (Vol. 30, Issue 3).
- Migliaro, A. (2018). *Modulación ambiental y hormonal del ritmo circadiano de la conducta eléctrica*.

- Migliaro, A., Moreno, V., Marchal, P., & Silva, A. C. (2018). Daily changes in the electric behavior of weakly electric fish naturally persist in constant darkness and are socially synchronized. *Biology Open*, 7(12). <https://doi.org/10.1242/bio.036319>
- Migliaro, A., Pedraja, F., Mucha, S., Benda, J., & Silva, A. (2025). Tracking spatial patterns and daily modulation of behavior in a natural population of the pulse-type weakly electric fish, *Gymnotus omarorum*. *IScience*, 28(3), 112018. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.isci.2025.112018>
- Migliaro, A., & Silva, A. C. (2016). Melatonin Regulates Daily Variations in Electric Behavior Arousal in Two Species of Weakly Electric Fish with Different Social Structures. *Brain, Behavior and Evolution*, 87(4), 232–241. <https://doi.org/10.1159/000445494>
- Miyasako, Yoko, Umezaki, Yujiro, & Tomioka, Kenji. (2007). Separate Sets of Cerebral Clock Neurons Are Responsible for Light and Temperature Entrainment of *Drosophila* Circadian Locomotor Rhythms. *Journal of Biological Rhythms*, 22(2), 115–126. <https://doi.org/10.1177/0748730407299344>
- Moortgat, K. T., Bullock, T. H., & Sejnowski, T. J. (2000). Precision of the pacemaker nucleus in a weakly electric fish: Network versus cellular influences. *Journal of Neurophysiology*, 83(2), 971–983. <https://doi.org/10.1152/jn.2000.83.2.971>
- Moškon, M. (2020). CosinorPy: a python package for cosinor-based rhythmometry. *BMC Bioinformatics*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12859-020-03830-w>
- Mourão, M., Satin, L., & Schnell, S. (2014). Optimal Experimental Design to Estimate Statistically Significant Periods of Oscillations in Time Course Data. *PLOS ONE*, 9(4), e93826-. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093826>
- Mrosovsky, N. (1999). Masking: History, Definitions, and Measurement. *Chronobiology International*, 16(4), 415–429. <https://doi.org/10.3109/07420529908998717>
- Mucha, S., Oehlert, F., Chapman, L. J., & Krahe, R. (2022). A Spark in the Dark: Uncovering Natural Activity Patterns of Mormyrid Weakly Electric Fish. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.870043>
- Muñoz-Pérez, J. L., López-Patiño, M. A., Álvarez-Otero, R., Gesto, M., Soengas, J. L., & Míguez, J. M. (2016). Characterization of melatonin synthesis in the gastrointestinal tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): distribution, relation with serotonin, daily rhythms and photoperiod regulation. *Journal of Comparative Physiology B*, 186(4), 471–484. <https://doi.org/10.1007/s00360-016-0966-4>
- Neumann, L. K., Davis, C. A., Fuhlendorf, S. D., Andersson, K., Elmore, R. D., & Goodman, L. E. (2022). Understanding how diel and seasonal rhythms affect the movements of a small non-migratory bird. *Ecosphere*, 13(7), e4149. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ecs2.4149>
- Nisembaum, L. G., Besseau, L., Paulin, C. H., Charpantier, A., Martin, P., Magnanou, E., Fuentès, M., Delgado, M. J., & Falcón, J. (2015). In the heat of the night: Thermo-TRPV channels in the salmonid pineal photoreceptors and modulation of melatonin secretion. *Endocrinology (United States)*, 156(12), 4629–4638. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1684>
- Nisembaum, L. G., Loentgen, G., L'Honoré, T., Martin, P., Paulin, C. H., Fuentès, M., Escoubeyrou, K., Delgado, M. J., Besseau, L., & Falcón, J. (2022). Transient Receptor Potential-Vanilloid (TRPV1-TRPV4) Channels in the Atlantic

- Salmon, *Salmo salar*. A Focus on the Pineal Gland and Melatonin Production. *Frontiers in Physiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.784416>
- Ogawa, S., Pfaff, D. W., & Parhar, I. S. (2021). Fish as a model in social neuroscience: conservation and diversity in the social brain network. *Biological Reviews*, 96(3), 999–1020. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/brv.12689>
- Panda, S., Hogenesch, J. B., & Kay, S. A. (2002). Circadian rhythms from flies to human. *Nature*, 417(6886), 329–335. <https://doi.org/10.1038/417329a>
- Paranjpe, D. A., & Sharma, V. K. (2005). Evolution of temporal order in living organisms. *Journal of Circadian Rhythms*, 3(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1740-3391-3-7>
- Patapoutian, A., Peier, A. M., Story, G. M., & Viswanath, V. (2003). ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(7), 529–539. <https://doi.org/10.1038/nrn1141>
- Pereira, A. C., Centurión, V., & 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(5), 961–972. <https://doi.org/10.1242/jeb.01481>
- Pérez, J. H., Tolla, E., Dunn, I. C., Meddle, S. L., & Stevenson, T. J. (2019). A Comparative Perspective on Extra-retinal Photoreception. In *Trends in Endocrinology and Metabolism* (Vol. 30, Issue 1, pp. 39–53). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.10.005>
- Perrone, R., Migliaro, A., Comas, V., Quintana, L., Borde, M., & Silva, A. (2014). Local vasotocin modulation of the pacemaker nucleus resembles distinct electric behaviors in two species of weakly electric fish. *Journal of Physiology-Paris*, 108(2–3), 203–212. <https://doi.org/10.1016/J.JPHYSPARIS.2014.07.007>
- Perrone, R., & Silva, A. C. (2018). Status-dependent vasotocin modulation of dominance and subordination in the weakly electric fish *Gymnotus omarorum*. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00001>
- Petzke, T. M., & Schomaker, J. (2022). A bias toward the unknown: individual and environmental factors influencing exploratory behavior. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1512(1), 61–75. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nyas.14757>
- Poletini, M. O., Moraes, M. N., Ramos, B. C., Jerônimo, R., & Castrucci, A. M. de L. (2015). TRP channels: a missing bond in the entrainment mechanism of peripheral clocks throughout evolution. In *Temperature* (Vol. 2, Issue 4, pp. 522–534). Routledge. <https://doi.org/10.1080/23328940.2015.1115803>
- Pouso, P., Cabana, Á., Francia, V., & Silva, A. (2024). Vasotocin but not isotocin is involved in the emergence of the dominant-subordinate status in males of the weakly electric fish, *Gymnotus omarorum*. *Hormones and Behavior*, 158, 105446. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2023.105446>
- Pouso, P., Radmilovich, M., & Silva, A. (2017). An immunohistochemical study on the distribution of vasotocin neurons in the brain of two weakly electric fish, *Gymnotus omarorum* and *Brachyhypopomus gauderio*. *Tissue and Cell*, 49(2, Part B), 257–269. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tice.2017.02.003>
- Quintana, L., Pouso, P., Fabbiani, G., & Macadar, O. (2011). A central pacemaker that underlies the production of seasonal and sexually dimorphic social signals: Anatomical and electrophysiological aspects. *Journal of Comparative*

*Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 197(1), 75–88.

<https://doi.org/10.1007/s00359-010-0588-3>

Quintana, L., & Salazar, V. (2025). Social behavior in South American electric fishes: Linking neuroendocrine regulation, signal plasticity, and reproductive strategies. *Neuroscience*, 573, 154–166.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2025.03.028>

Rattenborg, N. C., Voirin, B., Vyssotski, A. L., Kays, R. W., Spoelstra, K., Kuemmeth, F., Heidrich, W., & Wikelski, M. (2008). Sleeping outside the box: electroencephalographic measures of sleep in sloths inhabiting a rainforest. *Biology Letters*, 4(4), 402–405. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0203>

Reader, S. M. (2015). Causes of Individual Differences in Animal Exploration and Search. *Topics in Cognitive Science*, 7(3), 451–468. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tops.12148>

Refinetti, R. (2010). Entrainment of circadian rhythm by ambient temperature cycles in mice. *Journal of Biological Rhythms*, 25(4), 247–256. <https://doi.org/10.1177/0748730410372074>

Refinetti, R., Cornélissen, G., & Halberg, F. (2007). Procedures for numerical analysis of circadian rhythms. *Biological Rhythm Research*, 38(4), 275–325. <https://doi.org/10.1080/09291010600903692>

Rensing, L., & Ruoff, P. (2002). Temperature Effect on Entrainment, Phase Shifting, and Amplitude of Circadian Clocks and its Molecular Bases. *Chronobiology International*, 19(5), 807–864.

<https://doi.org/10.1081/CBI-120014569>

Ricklefs, R. E., & Wikelski, M. (2002). The physiology/life-history nexus. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(10), 462–468. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)02578-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02578-8)

Roessingh, S., Rosing, M., Marunova, M., Ogueta, M., George, R., Lamaze, A., & Stanewsky, R. (2019). Temperature synchronization of the *Drosophila* circadian clock protein PERIOD is controlled by the TRPA channel PYREXIA.

*Communications Biology*, 2(1), 246. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0497-0>

Salazar, V. L., Krahe, R., & Lewis, J. E. (2013). The energetics of electric organ discharge generation in gymnotiform weakly electric fish. *Journal of Experimental Biology*, 216(13), 2459–2468. <https://doi.org/10.1242/jeb.082735>

Sánchez-Vázquez, F. J., López-Olmeda, J. F., Vera, L. M., Migaud, H., López-Patiño, M. A., & Míguez, J. M. (2019). Environmental cycles, melatonin, and circadian control of stress response in fish. *Frontiers in Endocrinology*, 10(JUN), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00279>

Sánchez-Vázquez, F. J., Madrid, J. A., Zamora, S., & Tabata, M. (1997). Feeding entrainment of locomotor activity rhythms in the goldfish is mediated by a feeding-entrainable circadian oscillator. *Journal of Comparative Physiology A*, 181(2), 121–132. <https://doi.org/10.1007/s003590050099>

Sanguinetti-Scheck, J. I., & Gálvez, D. (2024). The Agoutis: A Future Model for Ecologically Relevant Neuroscience and Physiology In *Natura*. *Ethology*, 130(12), e13514. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/eth.13514>

Sharma, V. K. (2003). Adaptive significance of circadian clocks. *Chronobiology International*, 20(6), 901–919. <https://doi.org/10.1081/cbi-120026099>

Shemesh, Y., Benjamin, A., Shoshani-Haye, K., Yizhar, O., & Chen, A. (2024). Studying dominance and aggression requires ethologically relevant paradigms. *Current Opinion in Neurobiology*, 86, 102879.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.conb.2024.102879>

- Shen, W. L., Kwon, Y., Adegbola, A. A., Luo, J., Chess, A., & Montell, C. (2011). Function of Rhodopsin in Temperature Discrimination in *Drosophila*. *Science*, *331*(6022), 1333–1336. <https://doi.org/10.1126/science.1198904>
- Shin, H. S., Kim, N. N., Lee, J., Kil, G. S., & Choi, C. Y. (2011). Diurnal and circadian regulations by three melatonin receptors in the brain and retina of olive flounder *Paralichthys olivaceus*: Profiles following exogenous melatonin. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, *44*(4), 223–238. <https://doi.org/10.1080/10236244.2011.619314>
- Siehler, O., Wang, S., & Bloch, G. (2021). Social synchronization of circadian rhythms with a focus on honeybees. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *376*(1835). <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0342>
- Silva, A. C., Perrone, R., & Macadar, O. (2007). Environmental, seasonal, and social modulations of basal activity in a weakly electric fish. *Physiology and Behavior*, *90*(2–3), 525–536. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.11.003>
- Silva, A., Quintana, L., Ardanaz, J. L., & Macadar, O. (2002). Environmental and hormonal influences upon EOD waveform in gymnotiform pulse fish. *Journal of Physiology-Paris*, *96*(5), 473–484. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(03\)00003-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0928-4257(03)00003-2)
- Silva, A., Quintana, L., Perrone, R., & Sierra, F. (2008). Sexual and seasonal plasticity in the emission of social electric signals. Behavioral approach and neural bases. *Journal of Physiology-Paris*, *102*(4), 272–278. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2008.10.016>
- Silvério, J. T., Tachinardi, P., Langrock, R., Kramer-Sunderbrink, A., Oda, G. A., & Valentinuzzi, V. S. (2025). Changes in daily activity patterns throughout the year in a free-living South American subterranean rodent (*Ctenomys coludo*). *Mammalian Biology*, *105*(2), 215–230. <https://doi.org/10.1007/s42991-024-00470-y>
- Stoddard, P. K., Markham, M. R., Salazar, V. L., & Allee, S. (2007). Circadian rhythms in electric waveform structure and rate in the electric fish *Brachyhypopomus pinnicaudatus*. *Physiology and Behavior*, *90*(1), 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.08.013>
- Tataroglu, O., & Emery, P. (2014). Studying circadian rhythms in *Drosophila melanogaster*. *Methods*, *68*(1), 140–150. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.01.001>
- The Astropy Collaboration, Price-Whelan, A. M., Lim, P. L., Earl, N., Starkman, N., Bradley, L., Shupe, D. L., Patil, A. A., Corrales, L., Brasseur, C. E., Nöthe, M., Donath, A., Tollerud, E., Morris, B. M., Ginsburg, A., Vaher, E., Weaver, B. A., Tocknell, J., Jamieson, W., ... Zonca, A. (2022). *The Astropy Project: Sustaining and Growing a Community-oriented Open-source Project and the Latest Major Release (v5.0) of the Core Package*. <https://doi.org/10.3847/1538-4357/ac7c74>
- Tian, R., Losilla, M., Lu, Y., Yang, G., & Zakon, H. (2017). Molecular evolution of globin genes in Gymnotiform electric fishes: relation to hypoxia tolerance. *BMC Evolutionary Biology*, *17*(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-0893-3>
- Tomioka, K., & Yoshii, T. (2006). Entrainment of *Drosophila* circadian rhythms by temperature cycles. In *Sleep and Biological Rhythms* (Vol. 4, Issue 3, pp. 240–247). <https://doi.org/10.1111/j.1479-8425.2006.00227.x>
- Tosini, G., Bertolucci, C., & Foà, A. (2001). The circadian system of reptiles: a multioscillatory and multiphotoreceptive system. *Physiology & Behavior*, *72*(4), 461–471. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(00\)00423-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9384(00)00423-6)

- Urrejola, D., Lacey, E. A., Wiczorek, J. R., & Ebensperger, L. A. (2005). Daily Activity Patterns of Free-Living Cururos (*Spalacopus cyanus*). *Journal of Mammalogy*, *86*(2), 302–308. <http://www.jstor.org/stable/4094349>
- van Dongen, H. P. A., Olofsen, E., van Hartevelt, J. H., & Kruyt, E. W. (1999). A Procedure of Multiple Period Searching in Unequally Spaced Time-Series with the Lomb–Scargle Method. *Biological Rhythm Research*, *30*(2), 149–177. <https://doi.org/10.1076/brhm.30.2.149.1424>
- van Someren, E. J. W., Swaab, D. F., Colenda, C. C., Cohen, W., McCall, W. V., & Rosenquist, P. B. (1999). Bright Light Therapy: Improved Sensitivity to Its Effects on Rest-Activity Rhythms in Alzheimer Patients by Application of Nonparametric Methods. *Chronobiology International*, *16*(4), 505–518. <https://doi.org/10.3109/07420529908998724>
- VanderPlas, J. T. (2018). Understanding the Lomb–Scargle Periodogram. *The Astrophysical Journal Supplement Series*, *236*(1), 16. <https://doi.org/10.3847/1538-4365/aab766>
- Vay, L., Gu, C., & McNaughton, P. A. (2012). The thermo-TRP ion channel family: Properties and therapeutic implications. In *British Journal of Pharmacology* (Vol. 165, Issue 4, pp. 787–801). <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01601.x>
- Vazquez, J. I., Gascue, V., Quintana, L., & Migliaro, A. (2024). Understanding daily rhythms in weakly electric fish: the role of melatonin on the electric behavior of *Brachyhyopomus gauderio*. *Journal of Comparative Physiology A*, *210*(1), 7–18. <https://doi.org/10.1007/s00359-023-01626-w>
- Virtanen, P., Gommers, R., Oliphant, T. E., Haberland, M., Reddy, T., Cournapeau, D., Burovski, E., Peterson, P., Weckesser, W., Bright, J., van der Walt, S. J., Brett, M., Wilson, J., Millman, K. J., Mayorov, N., Nelson, A. R. J., Jones, E., Kern, R., Larson, E., ... Contributors, S. I. O. (2020). SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nature Methods*, *17*(3), 261–272. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0686-2>
- Wams, E. J., Riede, S. J., van der Laan, I., ten Bulte, T., & Hut, R. A. (2017). Mechanisms of Non-photoc Entrainment. In V. Kumar (Ed.), *Biological Timekeeping: Clocks, Rhythms and Behaviour* (pp. 395–404). Springer India. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-3688-7\\_18](https://doi.org/10.1007/978-81-322-3688-7_18)
- Wolfgang, W., Simoni, A., Gentile, C., & Stanewsky, R. (2013). The Pyrexia transient receptor potential channel mediates circadian clock synchronization to low temperature cycles in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *280*(1768), 20130959. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.0959>
- Zhang, M., Ma, Y., Ye, X., Zhang, N., Pan, L., & Wang, B. (2023). TRP (transient receptor potential) ion channel family: structures, biological functions and therapeutic interventions for diseases. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 8, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01464-x>
- Zhdanova, I. v, & Reeb, S. G. (2005). Circadian Rhythms in Fish. In *Fish Physiology* (Vol. 24, pp. 197–238). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(05\)24006-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1546-5098(05)24006-2)
- Zubizarreta, L., Quintana, L., Hernández, D., Teixeira de Mello, F., Meerhoff, M., Massaaki Honji, R., Guimarães Moreira, R., & Silva, A. (2020). Seasonal and social factors associated with spacing in a wild territorial electric fish. *PLOS ONE*, *15*(6), e0228976. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228976>
- Zupanc, M. M., Engler, G., Midson, A., Oxberry, H., Hurst, L. A., Symon, M. R., & Zupanc, G. K. H. (2001). Light–dark-controlled changes in modulations of the electric organ discharge in the teleost *Apteronotus leptorhynchus*. *Animal Behaviour*, *62*(6), 1119–1128. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/anbe.2001.1867>