



Universidad de la República
Licenciatura en Biología Humana
Informe de Pasantía de Grado

**“Caracterización de genes asociados a la regulación
estacional anual en *Gymnotus omarorum* como
modelo de estudio”**

Estudiante: Alessia Romano

Tutor: Dr. Victor Raggio

Orientador de Pasantía: Guillermo Valiño

Co-orientador: Laura Quintana

Lugar de realización: Departamento de Neurofisiología Celular y Molecular del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Agradecimientos

Agradezco inmensamente a mis orientadores, Guillermo Valiño y Laura Quintana, por su dedicación, paciencia y constante disposición. Este trabajo no habría sido posible sin sus aportes, no solo en lo técnico y académico, sino también en lo humano.

También expresar mi gratitud a todo el equipo de Bases Neurales de la Conducta del Departamento de Neurofisiología Celular y Molecular del IIBCE, por hacerme sentir parte de un grupo de trabajo tan cálido y apasionado.

A mis tutores de carrera, Natalia Pi y Víctor Raggio, gracias por su orientación en el recorrido curricular y por estar siempre disponibles cuando los necesité.

Una mención especial para mi tía, Sandra Feder, por su infinita paciencia y por responder cada duda sin importar la hora. También a mi amiga Clara Nieto, con quien compartí desde el liceo hasta la facultad incontables horas de estudio, y que hizo de mi recorrido por la carrera una experiencia mucho más amena.

Finalmente agradecer enormemente al resto de familia y amigos que me acompañan desde el primer día apoyándome de forma incondicional y alentándome a superar cada obstáculo.

Índice

Resumen	4
Introducción y antecedentes	5
Sincronización estacional	5
Fotoperiodo como regulador de la reproducción estacional	6
Vía fotoperiódica y “reloj estacional”	7
Cascada de hormonas tiroideas	8
Regulación estacional en peces.....	10
Modelo experimental	11
Hipótesis	12
Objetivos	12
Objetivo general.....	12
Objetivos específicos	12
Diseño experimental	12
Materiales y Métodos	13
1. Animales.....	13
2. Histología.....	14
3. Disección de tejido en criostato	14
4. Puesta a punto qPCR.....	15
Extracción de ARN de tejido	15
Retrotranscripción	16
qPCR.....	16
5. Análisis cuantitativo de expresión génica	17
Resultados	17
Identificación del SV en el cerebro de <i>G. omarorum</i> : abordaje anatómico e histológico	17
.....	18
Puesta a punto por qPCR	18
Identificación del SV en el cerebro de <i>G. omarorum</i> : abordaje anatómico e histológico	21
Comparación estacional de la expresión de <i>dio2</i> y <i>dio3</i>	22
Discusión	23
Identificación del SV en el cerebro de <i>G. omarorum</i> : abordaje anatómico	24
Identificación del SV en el cerebro de <i>G. omarorum</i> : abordaje histológico	25
Identificación del SV en el cerebro de <i>G. omarorum</i> : abordaje molecular	26
Comparación estacional de la expresión de <i>dio2</i> y <i>dio3</i>	28
Conclusión	29
Bibliografía	30

Resumen

Los organismos que habitan en ambientes estacionales han desarrollado mecanismos para ajustar su fisiología y comportamiento a los cambios circanuales del entorno. En vertebrados, la reproducción estacional está regulada por diversas señales ambientales, siendo el fotoperiodo el principal modulador. Los animales integran señales lumínicas y regulan la actividad del eje hipotalámico-pituitario-gonadal (HPG), sincronizándolo con la época óptima para la reproducción. Para lograr este ajuste estacional, es fundamental que se codifique la duración del día, proceso que, en mamíferos y aves depende del metabolismo tiroideo. La hormona estimulante de la tiroides, producida en la *pars tuberalis* (PT) de la hipófisis, activa localmente las enzimas reguladoras de las hormonas tiroideas (Dio2 y Dio3) en el hipotálamo medio basal, desencadenando una cascada molecular altamente conservada. Si bien este sistema ha sido ampliamente estudiado en mamíferos y aves, su presencia en peces ha sido poco explorada. En este estudio, se investiga la existencia de un mecanismo de regulación estacional en *Gymnotus omarorum*, un pez eléctrico autóctono de Uruguay, mediante la caracterización de la expresión diferencial de los genes asociados a la estacionalidad en dos momentos del año: invierno y verano. Mediante un enfoque integral que combina una revisión bibliográfica, análisis anatómicos, técnicas histológicas y análisis moleculares, se logró identificar y delimitar una región cerebral comparable a la PT de aves y mamíferos, en la que se presume la localización del órgano responsable de la regulación de la reproducción estacional en peces, conocido como *saccus vasculosus*. Paralelamente, se optimizó e implementó la técnica de qPCR para evaluar la expresión de genes asociados a la estacionalidad, específicamente *dio2* y *dio3*. Los resultados obtenidos sugieren un patrón diferencial de expresión entre invierno y verano, aportando evidencia iniciales de la existencia de un mecanismo de regulación local de las hormonas tiroideas, en concordancia con lo descrito para otros grupos. Comprender estos mecanismos en un modelo evolutivamente antiguo permitirá esclarecer la conservación de las vías de sincronización estacional en vertebrados y su impacto en la fisiología y el comportamiento. Dado que en humanos la estacionalidad influye en procesos como la reproducción, la salud mental y los trastornos afectivos estacionales como el SAD, el estudio de modelos animales como *G. omarorum* puede aportar información clave sobre la evolución y funcionalidad de estos sistemas, con potenciales aplicaciones en la comprensión y tratamientos de patologías humanas asociadas a la ritmicidad anual.

Introducción y antecedentes

Sincronización estacional

La mayoría de los organismos que habitan en ambientes con variaciones estacionales han desarrollado sistemas de control que les permiten ajustar su fisiología y comportamiento a los cambios del entorno (Stevenson et al., 2015). Estos procesos adaptativos resultan especialmente relevantes en regiones de alta latitud, donde el contraste entre el invierno y el verano es particularmente marcado (Gwinner, 1986). Dichos procesos permiten mitigar los efectos adversos de las condiciones ambientales extremas, como el frío o el calor, mediante respuestas fisiológicas y conductuales, como la hibernación o la estivación. Asimismo, posibilitan la regulación temporal de procesos esenciales dentro del ciclo anual, como la reproducción, el cuidado parental o el forrajeo, de modo que ocurran en el momento más favorable para maximizar la supervivencia y el éxito reproductivo de los individuos (Jiang et al., 2023; Turbill et al., 2011).

La “sincronización estacional” constituye el proceso biológico que hace posible estos ajustes adaptativos, al permitir que los ritmos internos se alineen con los cambios ambientales. Para lograrlo, los organismos utilizan señales externas que les permiten distinguir el momento del año, integrando esta información en sistemas temporizadores internos que coordinan la respuesta fisiológica y comportamental. Esta capacidad de ajuste representa una ventaja adaptativa clave en la evolución de las especies que habitan en entornos sujetos a fluctuaciones ambientales (Gwinner, 1986).

Para sincronizarse con su entorno, los organismos utilizan diversas señales ambientales, en particular aquellas que son predictivas, es decir, que permiten anticipar cambios estacionales anuales. Entre ellas, se encuentran variables como la temperatura, la humedad y la disponibilidad de recursos, así como ciclos externos más estables como fases lunares, estaciones de lluvias y sequías, mareas y, en particular, el fotoperíodo (Wingfield, 2015). Este último, representa una de las señales más confiables para predecir la estacionalidad debido a su regularidad y alta predictibilidad. La respuesta biológica a sus cambios se conoce como fotoperiodismo (Morgan & Hazlerigg, 2008).

Los seres humanos no somos ajenos a estos procesos. Aunque la industrialización y el desarrollo de las civilizaciones han reducido nuestra exposición a los cambios estacionales (luz artificial, calefacción, producción y almacenamiento de alimentos, entre otros), las estaciones siguen ejerciendo una influencia significativa en nuestra biología (Foster & Roenneberg, 2008; Stevenson et al., 2015). Se ha propuesto que los antiguos homínidos podrían haber sido sensibles a las variaciones del fotoperíodo, lo que les habría permitido anticipar los momentos más propicios para la reproducción (Bronson, 2004). Al día de hoy, diversos estudios en poblaciones humanas actuales han demostrado que los ciclos anuales pueden afectar la incidencia de enfermedades infecciosas (Fisman, 2007), los patrones de natalidad (Cummings, 2007) e incluso distintos procesos psicológicos y cognitivos (Gałecka et al., 2017; Meyer et al., 2016).

En los últimos años, la salud mental y los trastornos depresivos se han convertido en un tema central de análisis. Diversos estudios han demostrado que, en la población general, el estado de ánimo experimenta un deterioro estacional durante el invierno (Meyer et al., 2016). Entre los trastornos del estado de ánimo, el trastorno afectivo estacional (SAD; seasonal affective disorder) corresponde a un patrón estacional de episodios depresivos recurrentes que ocurren generalmente en otoño e invierno, con una remisión espontánea en primavera y verano (Maruani & Geoffroy, 2019). Los pacientes con SAD suelen experimentar un estado de ánimo deprimido, alteraciones en el ritmo circadiano, aislamiento social y cambios en el apetito y el peso corporal. Factores genéticos, la latitud y el fotoperíodo están asociados con la prevalencia de este trastorno, y se ha estudiado que el uso de terapias lumínicas, induce una respuesta terapéutica significativa en personas con SAD (Maruani & Geoffroy, 2019; Rosenthal, 1984). Se ha postulado, que estos efectos beneficiosos se deben tanto al reajuste del reloj biológico, que permite sincronizar los ritmos circadianos con el ambiente, como a efectos directos de la luz sobre el sistema nervioso, incluyendo la modulación de neurotransmisores como la serotonina, que contribuyen a mejorar el estado de ánimo y la vitalidad (Maruani & Geoffroy, 2019). Por lo tanto, para comprender los mecanismos que subyacen a la estacionalidad, resulta fundamental el estudio en modelos animales, ya que permiten analizar cómo las señales estacionales modulan las respuestas fisiológicas y comportamentales en condiciones naturales, e identificar procesos homólogos a los presentes en humanos.

Fotoperíodo como regulador de la reproducción estacional

Uno de los procesos estacionales más estudiados asociados al fotoperíodo es la reproducción. La reproducción estacional ocurre de manera discontinua a lo largo del año, como resultado de la adaptación a las fluctuaciones ambientales derivadas de las estaciones del año. Este comportamiento es común en diversas especies de vertebrados que habitan regiones templadas (Migaud et al., 2010). Los vertebrados regulan su ciclo reproductivo a través del eje hipotalámico-pituitario-gonadal (HPG). Durante la temporada reproductiva, este eje se activa e induce la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por parte del hipotálamo. La GnRH estimula la hipófisis anterior promoviendo la secreción de gonadotropinas, las cuales ingresan en la circulación sistémica y afectan directamente las gónadas. Como consecuencia de esto, hay aumento del tamaño gonadal y en la producción de hormonas sexuales, lo que deriva en cambios fisiológicos y comportamentales asociados a la reproducción (Chen et al., 2020; Dawson, 2015).

El control del eje HPG está mediado por mecanismos sensibles a los cambios en el fotoperíodo, localizados en una región cerebral encargada de integrar la información lumínica y regular la temporalidad de diversos procesos fisiológicos (Michel & Kervezee, 2024). Es así que, denominaremos "reloj estacional", a las regiones cerebrales encargadas de regular el fotoperíodo. Estas señales lumínicas desencadenan una cascada molecular que permite modificar la actividad del eje cuando la luz del día llega o excede un período llamado "fotoperíodo crítico". (Nakane & Yoshimura, 2019).

El sistema de medición del fotoperíodo se compone de tres componentes principales: (1) Una ruta que recibe la información luz-oscuridad externa, (2) Un reloj biológico que mide y reconoce el largo del día y (3) Una ruta que en respuesta a las señales lumínicas que regula aspectos fisiológicos y del comportamiento (Nakane & Yoshimura, 2019).

Vía fotoperiódica y “reloj estacional”

Estudios en mamíferos y aves han demostrado que el reloj estacional que regula los procesos reproductivos se localiza en el sistema neuroendocrino, particularmente en dos estructuras íntimamente relacionadas: la pared ventrolateral del tercer ventrículo, que forma parte del hipotálamo mediobasal (MBH), y la *pars tuberalis* (PT), una subregión de la adenohipófisis adyacente al infundíbulo. Estas estructuras están estrechamente interconectadas: el MBH integra las señales ambientales y transmite la información a la PT, la cual responde mediante la secreción de hormonas que permiten sincronizar la fisiología reproductiva con los cambios estacionales (Fig. 1) (Bentley, 2001; Dardente et al., 2019).

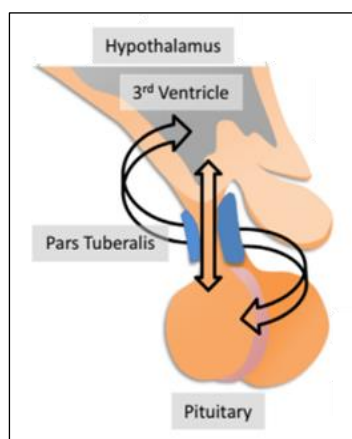


Figura 1

Esquema de la relación anatómica y funcional entre el MBH y la PT

La PT, localizada en la base del tallo hipofisario, ventral al MBH, mantiene contacto directo con las células endimarias del tercer ventrículo y actúa como un sitio clave en la traducción de las señales fotoperiódicas en respuestas endocrinas estacionales

Modificada de West & Wood, 2018

Esta región constituye un sitio fotoperiódico clave, responsable del control de fenómenos estacionales como la gametogénesis, la expresión de caracteres sexuales secundarios y la conducta sexual (Dardente et al., 2019). Aunque la organización general del reloj estacional es similar en aves y mamíferos, existen diferencias marcadas en las vías sensoriales y en los mecanismos de procesamiento de la información lumínica (Nakane & Yoshimura, 2019).

En mamíferos, la luz es percibida por la retina y transmitida al núcleo supraquiasmático y a la glándula pineal, componentes centrales del sistema circadiano. La pineal secreta melatonina, cuya liberación nocturna informa a la PT sobre la duración de la noche, actuando como una señal hormonal esencial para sincronizar la actividad reproductiva con el ciclo anual (Coomans et al., 2015; Matthews et al., 1993) (Fig. 2a). En cambio, en las aves, además de la detección visual a través de la retina que regula los ciclos día-noche, existen fotorreceptores cerebrales profundos capaces de captar directamente la luz. Estos envían señales a la PT sin pasar por el núcleo supraquiasmático, por lo que el control estacional de la reproducción no depende del perfil anual de secreción de melatonina (Bentley, 2001).

Esto sugiere que, aunque la señal ambiental para la sincronización estacional sea la misma, los mecanismos de detección y procesamiento difieren entre especies, reflejando adaptaciones específicas a sus estrategias ecológicas (Fig. 2b).

A pesar de que los órganos receptores de luz difieren entre los grupos, en ambos casos la información lumínica se transmite hacia una misma región cerebral, al reloj estacional. A partir de esta región, se activa una cascada molecular altamente conservada y universal en vertebrados, en la cual el metabolismo local de las hormonas tiroideas desempeña un papel clave en la codificación de la duración del día (O'Brien et al., 2012; Yoshimura, 2013).

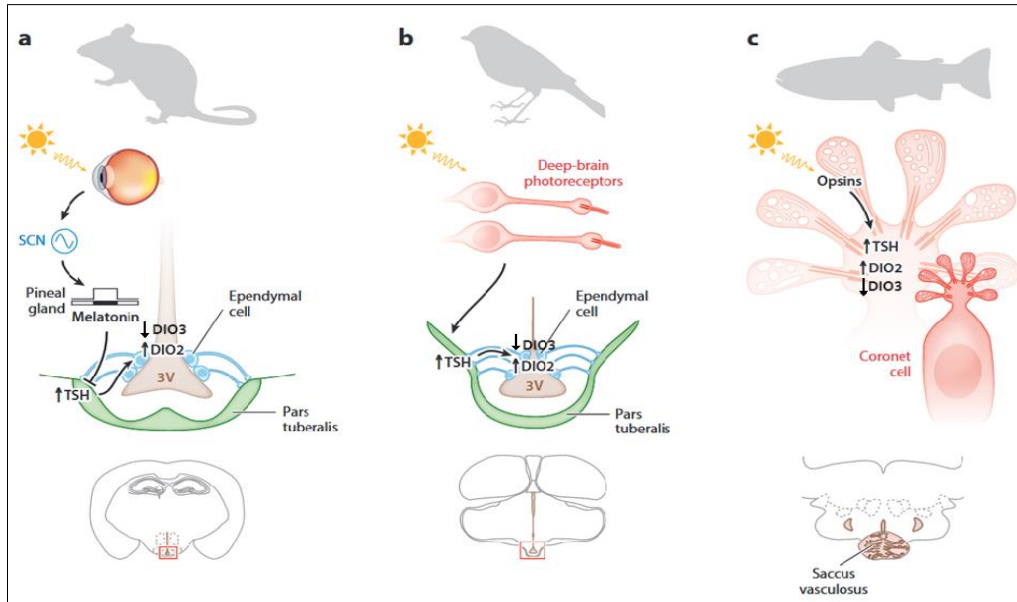


Figura 2

Comparación de la vía de transducción de la señal fotoperiódica en mamíferos, aves y peces. (a) En mamíferos, la información lumínica es detectada a través de los ojos, y transmitida a la glándula pineal mediante el núcleo supraquiasmático. La duración de la señal de melatonina codifica la longitud de la noche y regula la secreción de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) en la PT. (b) En cambio, en las aves, la información lumínica es detectada por fotoreceptores profundos en el cerebro, ubicados en el hipotálamo, desencadenando la secreción de TSH sin el involucramiento de la melatonina. (c) En peces, el *saccus vasculosus* (SV) está compuesto principalmente por células coronadas, las cuales presentan una morfología en forma de corona con cilios terminados en glóbulos que sobresalen de los cuerpos celulares. En estas células, la TSH y varias proteínas de la familia de rodopsinas se localizan en los glóbulos de los cilios, mientras que la DIO2 se encuentra en los cuerpos celulares. Esto sugiere que la información lumínica recibida en los glóbulos controla la expresión de TSH y DIO2. Figura adaptada de (Nakane & Yoshimura, 2019).

Cascada de hormonas tiroideas

La denominada “cascada molecular” de las hormonas tiroideas se compone de una serie de eventos regulados por el fotoperíodo, a través de los cuales distintas enzimas y hormonas modifican su expresión según la duración del día. En términos generales, la llegada de luz al órgano paraventricular del hipotálamo envía señales a la PT, estimulando la liberación de la hormona estimulante de la tiroides (TSH). La TSH actúa sobre las células ependimarias que recubren el tercer ventrículo, promoviendo la regulación local de las hormonas tiroideas: tiroxina (T4) y triyodotironina (T3), siendo la T4 la prohormona y la T3 la forma activa (Yasuo et al., 2005).

Se ha estudiado en aves y mamíferos, que cuando los días son largos (verano), los niveles de TSH en la PT aumentan, lo que induce una mayor expresión de la enzima desyodinasa tipo 2 (Dio2). Esta enzima cataliza la conversión de T4 en T3 dentro del MBH, elevando así la concentración local de hormona activa y promoviendo los procesos fisiológicos asociados a la temporada reproductiva. Simultáneamente, el mismo aumento de TSH induce una disminución en la expresión de la enzima desyodinasas tipo 3 (Dio3), enzima que normalmente degrada T4 y T3 a sus formas inactivas (rT3 y T2, respectivamente) (Dardente et al., 2019; Sabatino et al., 2021; Williams & Bassett, 2011; Yoshimura et al., 2003)

Por el contrario, en condiciones de días cortos (invierno), el proceso se invierte. Los niveles de TSH disminuyen, provocando una reducción en la concentración de Dio2 y un aumento de Dio3. En este contexto, predomina la inactivación de las hormonas tiroideas, reduciendo la disponibilidad de T3 y modulando así la fisiología hacia un estado no reproductivo. (Yoshimura, 2013). El cambio recíproco entre Dio2 y Dio3 asociado al largo del día, parece ajustar finamente la concentración local de hormonas tiroideas. De hecho, estudios en la codorniz japonesa (*Coturnix japonica*), han demostrado que la concentración de T3 en el MBH es aproximadamente diez veces mayor en condiciones de verano que en condiciones de invierno, aunque las concentraciones plasmáticas son similares en ambos fotoperiodos (Yasuo et al., 2005) (Fig 3).

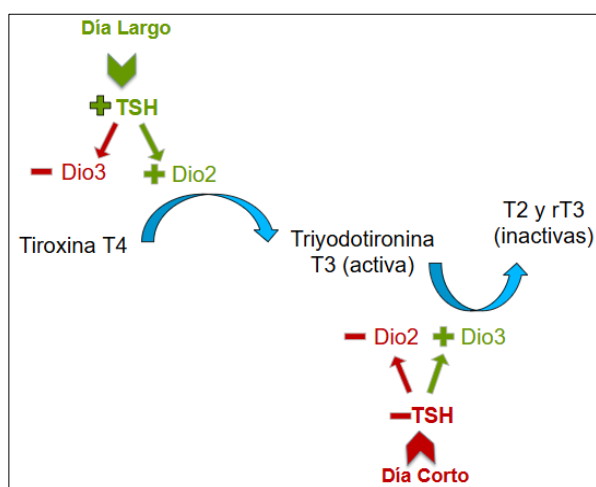


Figura 3

Esquema que resume la vía de regulación fotoperiódica de las hormonas tiroideas:

En condiciones de verano la TSH aumenta la expresión de Dio2 y disminuye la de Dio3. Dio2 se encarga de transformar la tiroxina (T4) en la forma bioactiva triyodotironina (T3).

Por otro lado, en la condición de invierno, la Dio2 disminuye, y la Dio3 aumenta. Esta última, convierte T4 y T3 en formas inactivas: la reversa T3 (rT3) y la 3,3'-diyodotironina (T2), respectivamente.

El cambio recíproco entre Dio2 y Dio3 parece ajustar con precisión la concentración local de hormonas tiroideas dentro del MBH.

La síntesis enzimática diferencial observada entre las condiciones de verano y de invierno tiene como resultado final la regulación del eje HPG. Esto es debido a que el aumento de T3 inducido por el día largo, provoca cambios morfológicos entre las terminales nerviosas que liberan GnRH y los pies terminales de los procesos gliales (Yamamura et al., 2004). Estos cambios en la interacción neuroglial parecen regular la secreción estacional de GnRH desde la eminencia media hacia los capilares porta, y, por lo tanto, la secreción de gonadotropinas desde la glándula pituitaria hacia el torrente sanguíneo (Dawson, 2015; Nakane & Yoshimura, 2019).

Regulación estacional en peces

Los peces representan uno de los linajes más antiguos dentro de los vertebrados, lo que los convierte en modelos excepcionales para estudiar la funcionalidad de los sistemas biológicos, su evolución y las estrategias comunes con otros vertebrados (Bi & Zhang, 2021; Vandepoele et al., 2004). A diferencia de aves y mamíferos, los peces carecen de un centro fotoperiódico anatómicamente homólogo a la PT; sin embargo, exhiben una marcada actividad reproductiva estacional. Diversos estudios han demostrado que, al igual que en otros grupos de vertebrados, el metabolismo de la hormona tiroidea desempeña un papel clave en la regulación estacional, existiendo correlaciones positivas entre distintos índices tiroideos y el estado reproductivo (Cyr & Eales, 1996).

En este contexto, en peces teleósteos se ha identificado un órgano neuroendócrino exclusivo de este grupo, denominado *saccus vasculosus* (SV) (Dorn, 1955; Nakane et al., 2013; Tsuneki, 1992; Watanabe, 1966). El SV es un órgano circunventricular especializado que se presenta como una prolongación o saco en la región ventrocaudal del diencefalo, próximo a la línea media del encéfalo. Este se encuentra inferior al hipotálamo caudal, posterior a la glándula pituitaria y en continuidad con el tercer ventrículo (Nakane et al., 2013; Watanabe, 1966) (Fig. 4). Histológicamente, se caracteriza por su morfología sacular o diverticular y por ser una estructura altamente vascularizada (Chakrabarti & Khatun, 2017). Su estructura varía entre especies, pero en todas está constituido por tres tipos celulares: células coronadas (consideradas los componentes funcionales principales del órgano), neuronas de contacto con líquido cefalorraquídeo y células de soporte (Shimada, 1976) (Fig. 5). Estudios en salmón masu (*Oncorhynchus masou*), han propuesto al SV como el sitio anatómico análogo a la PT, responsable de detectar y responder a las señales estacionales. Esto es debido al hallazgo de que las células coronadas contienen toda la vía fotoperiódica estacional: desde la entrada de luz debido a la presencia de fotorreceptor del cerebro profundo, hasta la salida neuroendocrina (expresión de *dio2*) (Nakane et al., 2013). Cabe destacar que, en los estudios realizados hasta el momento sobre la regulación estacional de la reproducción en peces, únicamente se ha descrito la variación en la expresión de *dio2*, sin haberse confirmado aún el patrón de expresión estacional de *dio3*.

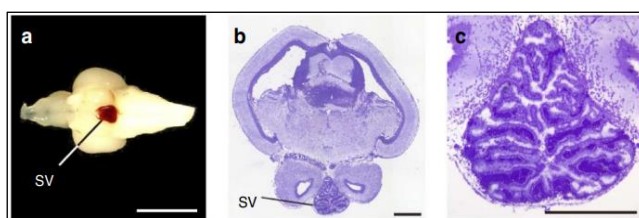


Figura 4

Localización del SV en Salmón masu: (a) Vista ventral del cerebro del salmón masu. Rostral hacia la izquierda. (b,c) Corte coronal del cerebro teñido con Nissl (b) e imagen ampliada del SV (c). Tomado de Nakane et al., (2013)

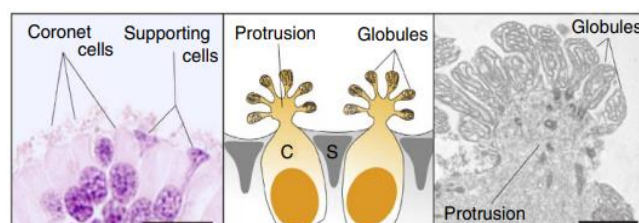


Figura 5

Morfología de las células del SV. Izquierda: tinción con hematoxilina-eosina. Centro: dibujo esquemático (C: célula coronada, S: células de soporte). Derecha: imagen de microscopía electrónica Tomado de Nakane et al., (2013)

Gymnotus omarorum como modelo de estudio

Gymnotus omarorum es un pez eléctrico de descarga débil perteneciente al orden *Gymnotiformes* y la familia *Gymnotidae*, endémico de América del Sur. Habita principalmente cuerpos de agua dulce en Uruguay y regiones adyacentes (Quintana & Salazar, 2025). Esta especie posee un sistema electrosensorial altamente especializado, sustentado en un órgano eléctrico capaz de generar impulsos de baja intensidad que utiliza para orientarse, detectar objetos y comunicarse con otros individuos (Richer-de-Forges et al., 2009). Más allá de su función sensorial, las descargas eléctricas constituyen una herramienta esencial de comunicación social, cuyo patrón varía de acuerdo con el contexto social, el estado fisiológico y la interacción entre individuos (Batista et al., 2012; Perrone et al., 2019).

G. omarorum presenta una marcada estacionalidad reflejada en múltiples aspectos de su biología. Algunos ejemplos son que hacia el verano, el tamaño de las gónadas aumenta significativamente en relación con el tamaño corporal, se produce una redistribución territorial que incrementa la probabilidad de contacto entre individuos de distinto sexo (Zubizarreta et al., 2020) y los alevines solo se observan durante esta estación (Quintana & Salazar, 2025). Asimismo, se registran variaciones estacionales tanto en los niveles hormonales circulantes (Zubizarreta et al., 2023) como en la modulación de la conducta agresiva (Valiño et al., 2024). Gracias a estas características, esta especie se ha consolidado como un modelo para estudios neurofisiológicos y comportamentales ampliamente utilizado durante más de 30 años (Quintana & Salazar, 2025; Richer-de-Forges et al., 2009).

Este proyecto propone avanzar en la comprensión del reloj estacional, un sistema biológico fundamental que ha sido ampliamente caracterizado en mamíferos, aves y en pocas especies de peces, y cuya presencia en muchos otros vertebrados permanece inexplorada. En particular, buscamos indagar su existencia en *G. omarorum*, una especie con un marcado patrón estacional de comportamiento y fisiología. Explorar este mecanismo en un pez teleósteo, un grupo evolutivamente antiguo, ofrece una oportunidad única para identificar elementos moleculares y rutas metabólicas conservadas a lo largo de la evolución. En este marco se incorporará por primera vez en un teleósteo, la búsqueda de los dos genes claves del sistema tiroideo estacional descrito en aves y mamíferos. Detectar similitudes en la regulación de la estacionalidad entre linajes tan diversos podría aportar evidencia clave sobre la antigüedad y universalidad de estos mecanismos de sincronización temporal.

En este contexto, este estudio busca responder interrogantes fundamentales: ¿Posee *G. omarorum* la maquinaria molecular comparable a los descritos en los sistemas regulatorios estacionales en otros vertebrados? ¿Existe en esta especie una estructura anatómica análoga a la PT de mamíferos y aves, y homóloga al SV de otras especies de peces? ¿Se observan diferencias en la expresión génica entre invierno y verano que reflejen ajustes fisiológicos estacionales?

Hipótesis

En el cerebro de *G. omarorum* existe una región que presenta un patrón estacional en la expresión de los genes asociados al metabolismo tiroideo.

Objetivos

Objetivo general

Identificar y caracterizar el posible reloj estacional en el cerebro de *Gymnotus omarorum*, y evaluar si esta región muestra cambios en la expresión de los genes estacionales, entre el verano y el invierno

Objetivos específicos

1. Identificación anatómica del SV en el cerebro de *G. omarorum*
2. Poner a punto la cuantificación por qPCR para los genes vinculados al reloj estacional.
3. Confirmar la expresión de *dio2* y *dio3* en la región cerebral del SV en ambas estaciones.
4. Explorar la potencial estacionalidad de la expresión de estos genes.

Diseño experimental

Para abordar el objetivo general de esta tesis, se diseñó una estrategia experimental integrada que combina abordajes histológicos, comparativos y de biología molecular, orientados a cumplir tres objetivos principales: la puesta a punto de la técnica de qPCR, la localización del SV y la comparación estacional de la expresión de genes *dio2* y *dio3*.

En primera instancia, se realizó la identificación anatómica del sitio cerebral de interés, el SV, con el fin de asegurar que el análisis cuantitativo posterior se realizara sobre la región adecuada, con los circuitos neuroendocrinos involucrados en la estacionalidad. Para ello se aplicaron tres abordajes complementarios: búsqueda bibliográfica, análisis histológico y análisis molecular. La revisión bibliográfica incluyó un estudio exhaustivo de las descripciones anatómicas e histológicas del SV en peces, incorporando trabajos comparativos que abarcan un amplio número de especies. Este análisis permitió definir los principales rasgos morfológicos y las referencias anatómicas asociadas a dicha estructura. En paralelo, se analizaron cortes sagitales del encéfalo de *G. omarorum*, realizados previamente en el Departamento de Histología y Embriología de la Facultad de Medicina, los cuales fueron comparados con las descripciones disponibles en la literatura para establecer posibles correspondencias. Como complemento, se efectuaron procedimientos histológicos para elaborar una guía de referencia anatómica del encéfalo de *G. omarorum*, compuesto por cortes coronales fijados en Paraformaldehído (PFA) y teñidos con azul de toluidina. A su vez se realizó una segunda guía utilizando tejido fresco como complemento. Una vez elaboradas las guías de referencia, se estableció una correlación entre los cortes de distintos planos, apoyada en referencias morfológicas y anatómicas de la literatura, permitiendo delimitar un segmento rostro-caudal de aproximadamente 2500 μm , donde se presumió se encuentra el SV.

Previo a realizar una búsqueda de una subregión dentro del área de interés, se procedió a la puesta a punto de las técnicas de biología molecular necesarias para cuantificar la expresión de genes vinculados a la estacionalidad. Este proceso incluyó el seccionamiento del tejido en criostato, la extracción de ARN, su retrotranscripción y la optimización de la reacción de qPCR, asegurando la eficiencia y especificidad de la técnica.

Con el área de interés definida y la metodología molecular optimizada, se llevó a cabo un abordaje molecular complementario destinado a analizar la presencia de transcritos de interés en una subregión específica correspondiente al SV, que sería utilizada posteriormente para el análisis estacional. Para ello, se analizaron cortes seriados del área previamente identificada en cerebros de dos individuos (uno recolectado en invierno y otro en verano) mediante qPCR de dos genes. Este análisis permitió identificar una subregión de 400 μm en la que la expresión génica alcanzaba su máximo nivel.

Finalmente, utilizando la subregión de máxima expresión, se realizó un análisis comparativo estacional preliminar con el objetivo de evaluar posibles variaciones en la expresión de los genes seleccionados y determinar si *G. omarorum* presenta un patrón de regulación estacional. Para ello se analizaron ocho cerebros de individuos recolectados en el campo (cuatro en invierno y cuatro en verano), los cuales fueron seccionados en criostato y evaluados mediante qPCR, realizando el análisis cuantitativo con el “método $\Delta\Delta\text{Ct}$ ”.

Materiales y Métodos

1. Animales

Los peces fueron colectados en la Laguna del Sauce (34°51'S, 55°07'W), Maldonado, Uruguay, utilizando la técnica descrita por Silva et al. (2003). La colecta de invierno se realizó entre el 17 y 21 de julio de 2024, y la de verano el 30 de noviembre de 2024. Los individuos fueron detectados mediante electrodos acoplados a un amplificador y capturados con un calderín.

Para la búsqueda anatómica del reloj estacional se utilizó una hembra recolectada en invierno, a la cual se le realizó perfusión intracardiaca y fijación con PFA en el laboratorio, según Pouso et al., (2017). Para los análisis moleculares, se utilizaron cerebros de machos, disecados en la estación de campo durante la noche, entre las 22:00 y las 00:00 horas, período de máxima actividad de la especie (Migliaro et al., 2025). Los peces fueron anestesiados y posteriormente decapitados de manera rápida, siguiendo los procedimientos establecidos por Zubizarreta et al., (2023). Los cerebros fueron luego conservados en un freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Todos los procedimientos realizados con animales en este estudio se ajustaron a las pautas y recomendaciones establecidas por la Comisión Nacional Uruguaya de Experimentación Animal (CNEA). El alojamiento y la manipulación de los ejemplares en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) fueron aprobados por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA IIBCE 001/02/2012–003/10/2020). Todas las manipulaciones de animales vivos fueron realizadas por los orientadores de esta tesina.

2. Histología

Se elaboró una guía de referencia anatómica del cerebro de *G. omarorum* con el objetivo de lograr la localización del SV mediante la comparación de su anatomía con la bibliografía existente sobre su localización en otras especies de peces.

A estos efectos se utilizó una hembra recolectada en invierno, que fue anestesiada mediante inmersión en eugenol y posteriormente perfundida intracardiamente, primero con solución salina y luego con PFA al 4% en PBS. Una vez fijado el tejido, se procedió a la disección del cerebro procurando mantener la hipófisis adherida, dado que la bibliografía la señala como una referencia anatómica clave para la localización del SV (Chakrabarti & Khatun, 2017; Shimada, 1976; Tsuneki, 1992). Posteriormente, el cerebro se incluyó en un bloque de gelatina-albúmina para su seccionamiento en vibratomo. Se obtuvieron cortes coronales de 70 µm de espesor, que fueron montados en portaobjetos, teñidos con azul de toluidina y analizados mediante microscopía óptica. Para la búsqueda anatómica, también se emplearon cortes sagitales en parafina de 7 µm, teñidos con hematoxilina-eosina, realizados por técnicos del departamento de Histología y Embriología de la Facultad de Medicina.

3. Disección de tejido en criostato

Para la extracción de ARN, se realizó la disección de los cerebros almacenados a -80 °C utilizando un criostato (SLEE Mainz Cryostat MEV) a -15 °C, método que permite preservar la integridad del ARN en el tejido. Dentro del criostato, los cerebros se colocaron en un molde de papel aluminio y se incluyeron en Tissue-Tek. Posteriormente, la región caudal (correspondiente a la médula) se adhirió con el mismo Tissue-Tek a una platina, la cual se colocó en el criostato para realizar los cortes del tejido.

Como complemento de la primera guía realizada con tejido fijado, se elaboró una segunda guía utilizando tejido fresco. Este paso fue clave para evitar errores al momento de cortar la región de interés, ya que el proceso de fijación puede generar una reducción del tamaño del cerebro. De este modo, se minimizan discrepancias entre lo observado en la guía de tejido fijado y las dimensiones reales del tejido fresco utilizado para los análisis moleculares. Para ello, se efectuaron cortes de 100µm, en sentido rostro-caudal. De manera alternada, un corte se montaba en un portaobjetos para su observación al microscopio y registro, mientras que el siguiente se descartaba. A partir del primer corte donde se observó la presencia de cerebelo, todos los subsiguientes fueron registrados, generandose la segunda guía.

Gracias al muestreo y a la comparación con las referencias anatómicas previamente definidas, se logró estandarizar un método de corte para la obtención de la región de interés. Dicho método comienza con la realización de cortes de 100 µm, desde la región rostral, los cuales se montan en un portaobjetos y se observan al microscopio. Al detectar la presencia de cerebelo se efectúan cortes de 200 µm, que son secuencialmente recolectados en tubos Eppendorf para su posterior análisis.

Abordaje molecular para la identificación del SV

Tras la identificación de una región anatómica de interés, se procedió a delimitar una subregión interna caracterizada por una mayor expresión de *dio2* y *dio3*. Para ello, se utilizaron dos cerebros, uno recolectado en invierno y otro en verano, previamente almacenados a -80°C. Empleando el método de corte estandarizado, se obtuvo de cada cerebro 11 cortes de 200 µm correspondientes al área de interés, junto con dos cortes adicionales utilizados como controles: uno de la región de la comisura anterior como control rostral y otro de la región del lóbulo eléctrico como control caudal.

Análisis comparativos de expresión en las distintas estaciones

Una vez seleccionada una subregión específica de máxima expresión de los genes estacionales, se procedió con el análisis comparativo de expresión de *dio2* y *dio3* entre estaciones. Para ello, se utilizaron seis cerebros de machos adultos: tres recolectados en invierno y tres en verano, los cuales fueron sometidos a criosección. A partir de los resultados obtenidos en el abordaje molecular de la búsqueda anatómica, donde se determinó que los cortes 5 y 6 presentaban los niveles más altos de expresión, se decidió conservar únicamente los tubos correspondientes a dichos cortes. Durante la criosección, luego de procesar los primeros cerebros, se decidió realizar un corte adicional de 100 µm como referencia final. En ese punto se observó que, en algunos individuos, el último corte obtenido no coincidía con el que debería corresponder según la guía de referencia. Por este motivo, en los casos en que ocurrió dicha discrepancia, se efectuaron uno o dos cortes adicionales. Posteriormente, mediante la comparación entre el primer y último corte de cada cerebro y la guía de referencia, se determinó cuáles secciones era más probable que correspondieran a los cortes 5 y 6 para su análisis.

4. Puesta a punto qPCR

Para estudiar la regulación estacional de los procesos reproductivos, se cuantificaron los niveles de transcritos de *dio2* y *dio3* en el cerebro de *G. omarorum* mediante qPCR de genes involucrados en el metabolismo local de las hormonas tiroideas. Para ello, fue necesario optimizar las etapas de extracción de ARN, retrotranscripción y cuantificación por qPCR.

Extracción de ARN de tejido

La extracción de ARN del tejido obtenido por criosección se llevó a cabo utilizando el kit de Invitrogen RNAqueous™-Micro Total RNA Isolation Kit (Part Number AM1931), siguiendo las recomendaciones del fabricante, con la excepción de una reducción en el tiempo de incubación en el buffer de lisis, que se realizó durante 5 minutos en lugar de los 30 minutos indicados en el protocolo. Para asegurar la pureza del ARN y eliminar posibles contaminaciones con ADN genómico, las muestras fueron tratadas posteriormente con DNasa I, provista en el mismo kit, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez realizada la técnica, el ARN se cuantificó y comprobó la pureza de la muestra mediante espectrofotometría con Nanodrop (Thermo scientific NanoDrop 1000 Spectrophotometer).

Retrotranscripción

Después de la extracción, el ARN fue retrotranscrito a ADNc utilizando el kit de Invitrogen SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Part Number 18080051), siguiendo las indicaciones del fabricante.

qPCR

Para la cuantificación de la expresión génica, se realizó la optimización de la reacción de qPCR con el objetivo de garantizar la eficiencia y especificidad de la técnica para los genes seleccionados. En primer lugar, se diseñaron primers específicos para los transcriptos de los genes de interés a partir del transcriptoma de *G. omarorum* disponible en la base de datos eFishGenomics (https://www.efishgenomics.com/blast_search/). Una vez obtenidas las secuencias de los transcriptos, se procedió al diseño de los primers considerando los criterios necesarios para asegurar una amplificación eficiente y específica (Tabla 1). Entre los principales parámetros contemplados se incluyeron: un tamaño óptimo de aproximadamente 20 nucleótidos (ya que secuencias más cortas disminuyen la especificidad y secuencias más largas reducen la eficiencia de hibridación), un contenido de GC moderado, y un tamaño de amplicón adecuado para la amplificación por qPCR. Asimismo, se verificó que los primers no formaran heterodímeros entre sí ni estructuras secundarias por auto-complementariedad. Finalmente, se seleccionaron únicamente los pares de primers cuyas temperaturas de fusión (T_m) se encontraban dentro del rango óptimo (55–65°C), con el fin de evitar uniones inespecíficas al ADN molde.

Tabla 1: Secuencia de los primers			
	Bact	Dio2	Dio3
Right	5'-GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA-3'	5'-GTGTGTGACAGAGTGGCGAT-3'	5'-GCAGCTCCCGAAGTTAAGGA-3'
Left	5'-GTGCCCATCTACGAGGGTTA-3'	5'-ATGCCCATTTCCGACGAGT-3'	5'-ACGGCTCATCTGGGTTTCAC-3'

Una vez sintetizados, los primers fueron evaluados mediante curvas de dilución para verificar que los valores de eficiencia se encontraran dentro del rango óptimo (90–110%). Para ello, se realizaron diluciones seriadas del ADNc en una relación 1:3 (rango $1-10^{-5}$) y se llevaron a cabo reacciones de qPCR en duplicado para cada dilución. Los valores de C_t obtenidos para cada gen se graficaron en función del logaritmo de la concentración relativa de ADNc, y la eficiencia se calculó a partir de la pendiente de la recta obtenida según la ecuación: $Ef = 10^{(-1/pend)} - 1$.

Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo institucional de qPCR del IIBCE, empleando SYBR Green como fluorocromo. Las curvas de amplificación y la T_m fueron analizadas mediante el software Bio-Rad. Posteriormente, los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 2%, para verificar la presencia de bandas únicas del tamaño esperado y descartar amplificaciones inespecíficas o la formación de dímeros de primers. En una primera corrida de qPCR se pudo observar una segunda banda inespecífica de tamaño menor al esperado junto con un segundo pico en las curvas de melting. Por este motivo, se modificó el protocolo, estableciendo la temperatura de annealing en 60 °C para aumentar la especificidad y eliminar la banda inespecífica.

Finalmente, los productos de qPCR fueron enviados al laboratorio Macrogen para su secuenciación mediante el método de Sanger. Las secuencias obtenidas se alinearon con bases de datos públicas (NCBI: National Center for Biotechnology Information y UCSC Genome Browser) para confirmar la identidad de los genes amplificados.

5. Análisis cuantitativo de expresión génica

Para la cuantificación de la expresión génica, se empleó el método de cuantificación relativa. Este enfoque permitió comparar la expresión de los genes de interés con la de un gen de referencia o housekeeping, en este caso la β -actina, seleccionada por su expresión estable en las condiciones experimentales. El análisis de datos se realizó siguiendo el método $\Delta\Delta Ct$ (comparative Ct method), descrito por (Schmittgen & Livak, 2008). Este método compara los valores Ct del gen blanco y del gen de referencia en dos pasos. Primero se calcula para cada muestra, la diferencia de Ct entre el gen de interés y el gen de referencia (en este caso la β -act), obteniendo el ΔCt . Luego, se determina el $\Delta\Delta Ct$ a través de la ecuación:

$(Ct \text{ gen problema verano} - Ct \beta\text{-act verano}) - (Ct \text{ gen problema invierno} - Ct \beta\text{-act invierno}),$

que representa la diferencia entre el ΔCt de la condición experimental y el ΔCt del grupo de referencia (en este caso, las muestras de invierno). Por último, el nivel de expresión de la muestra con respecto al grupo de referencia se calcula aplicando la ecuación: $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$

Resultados

Identificación del SV en el cerebro de *G. omarorum*: abordaje anatómico e histológico

Como resultado de la búsqueda bibliográfica, se identificaron referencias clave que permitieron orientar la localización del SV en *G. omarorum*. En la literatura, esta estructura se describe como una prolongación o saco ubicado en la línea media, en la región ventrocaudal del diencefalo (Watanabe, 1966). A su vez, existen tres referencias anatómicas principales para su identificación: se localiza ventral al hipotálamo caudal, posterior a la glándula pituitaria y en continuidad con el tercer ventrículo. A partir del análisis comparativo entre las referencias anatómicas disponibles en la literatura y los cortes del encéfalo obtenidos en distintos planos y mediante diferentes técnicas histológicas, se delimitó una región anatómica de interés que, por su ubicación y morfología, puede corresponder al SV de *G. omarorum* (Fig. 6). En la Fig. 6a, correspondiente a un corte sagital incluido en parafina (7 μ m) y teñido con hematoxilina-eosina, se observa, tomando como punto de referencia medial el núcleo electromotor bulbar (NEB), una región que contiene dos estructuras con morfología sacular, ubicadas en la región ventrocaudal y posteriores a la hipófisis. Esta disposición concuerda con las descripciones realizadas para otras especies.

Para complementar este análisis, se examinó una guía anatómica de referencia de cortes coronales obtenidos de tejido fijado con PFA al 4 % y teñidos con azul de toluidina. Estos cortes conservan la hipófisis adherida, lo cual facilita la orientación anatómica. En la Fig. 6b, se muestra un corte coronal destacando, dentro del recuadro negro, una región de interés que podría corresponder a la identificada en el corte sagital.

Esta región se ubica en la línea media del encéfalo, inmediatamente dorsal a la hipófisis (Hi) y ventral al tercer ventrículo (IIIIV), cumpliendo con tres referencias anatómicas descriptas para el SV y mostrando una disposición similar a la observada en el corte sagital. Por último, en la Fig. 6c se puede ver esta misma estructura pero en un corte de 100µm de un cerebro congelado sin fijar.

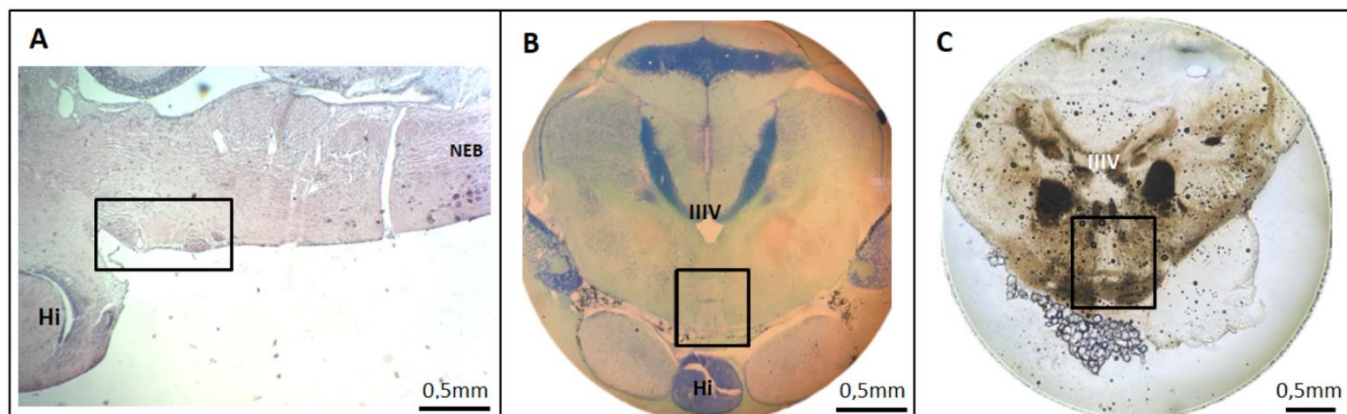


Figura 6: Cortes de cerebro de *G. omarorum* realizados en distintos planos y mediante diferentes técnicas histológicas (4X)
El recuadro muestra la región anatómica de interés. Los cortes A y B incluyen hipófisis. A: corte sagital incluido en parafina de 7 µm. Se utilizó el núcleo electromotor bulbar (NEB) como referencia anatómica medial. B: Corte coronal de tejido fijado con PFA al 4% de 70µm, teñido con azul de Toluidina. C: Corte coronal de tejido fresco de 100µm.

Al observar las estructuras de interés del corte sagital, a mayor aumento (Fig. 7a y 7b), se aprecia que éstas se distinguen claramente del tejido circundante, mostrando una apariencia en forma de grumos, elementos poco compactos, que parecen formar islotes. La tinción revela núcleos violetas, alineados, compatibles con lo que podría ser endotelio de capilares. El espacio podría ser un lumen ya descripto para algunos SV. En la Fig. 10c se muestra de manera comparativa del SV de *Surcocheilichthys variegatus* (Cypriniformes–Cyprinidae), que coincide en su apariencia general, su tejido similar a acinos, y en este caso, un lumen obliterado (Tsuneki, 1992).

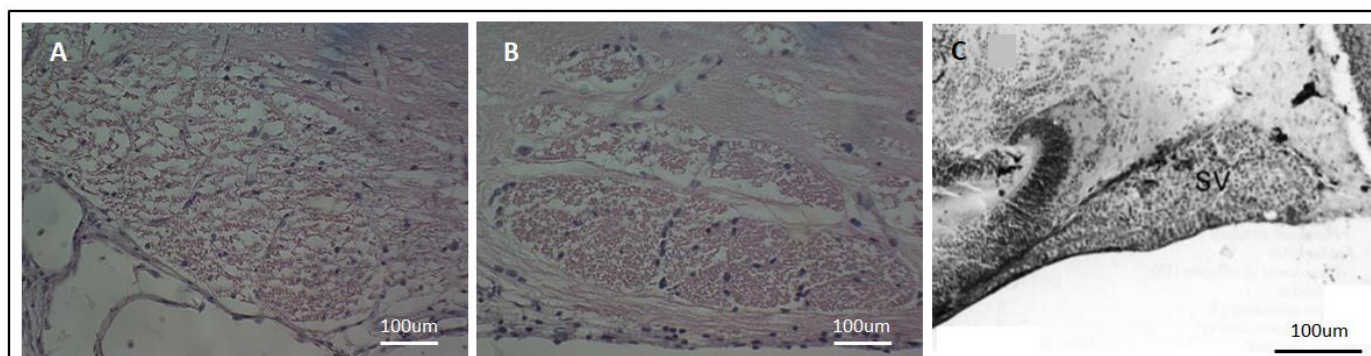


Figura 7. Comparación de corte sagital de la región de interés con un SV de bibliografía de referencia.

A-B: Vista sagital a 40X de las estructuras anatómicas de interés. B: Imagen modificada de Tsuneki (1992), correspondiente a corte sagital del SV de *Surcocheilichthys variegatus* (Cypriniformes: Cyprinidae).

Puesta a punto por qPCR

A partir de tres cerebros seccionados en criostato, se obtuvieron cortes de 200 μm de espesor para la extracción de ARN. Las extracciones de ARN de los cortes de cerebro resultaron exitosas, con concentraciones adecuadas y una pureza dentro de los valores esperados. Para la puesta a punto de la qPCR, se seleccionaron las tres muestras con mayor concentración (Tabla 2).

Tabla 2: Extracción de ARN			
	[] (ng/ μL)	Abs 260/280	Abs 260/230
Muestra 1	158,6	1,86	0,55
Muestra 2	148,3	1,96	1,32
Muestra 3	103,9	1,89	1,64

Luego de la retrotranscripción, el ADNc de la muestra 1 se utilizó en una primera corrida de qPCR para evaluar la amplificación de los primers diseñados. Las muestras se amplificaron dentro del rango de Ct y Tm esperado; sin embargo, se observó un pico inespecífico en las curvas de melting y una banda adicional de menor intensidad en el gel de agarosa (Fig. 8a).

Para mejorar la especificidad, se realizó nuevamente el ensayo utilizando el ADNc de la muestra 2, e incrementando la temperatura de annealing en 2 °C. Bajo estas condiciones, las curvas de melting mostraron un único pico para cada gen y el análisis en gel de agarosa evidenció una única banda correspondiente al amplicón esperado en cada caso (Fig. 8b).

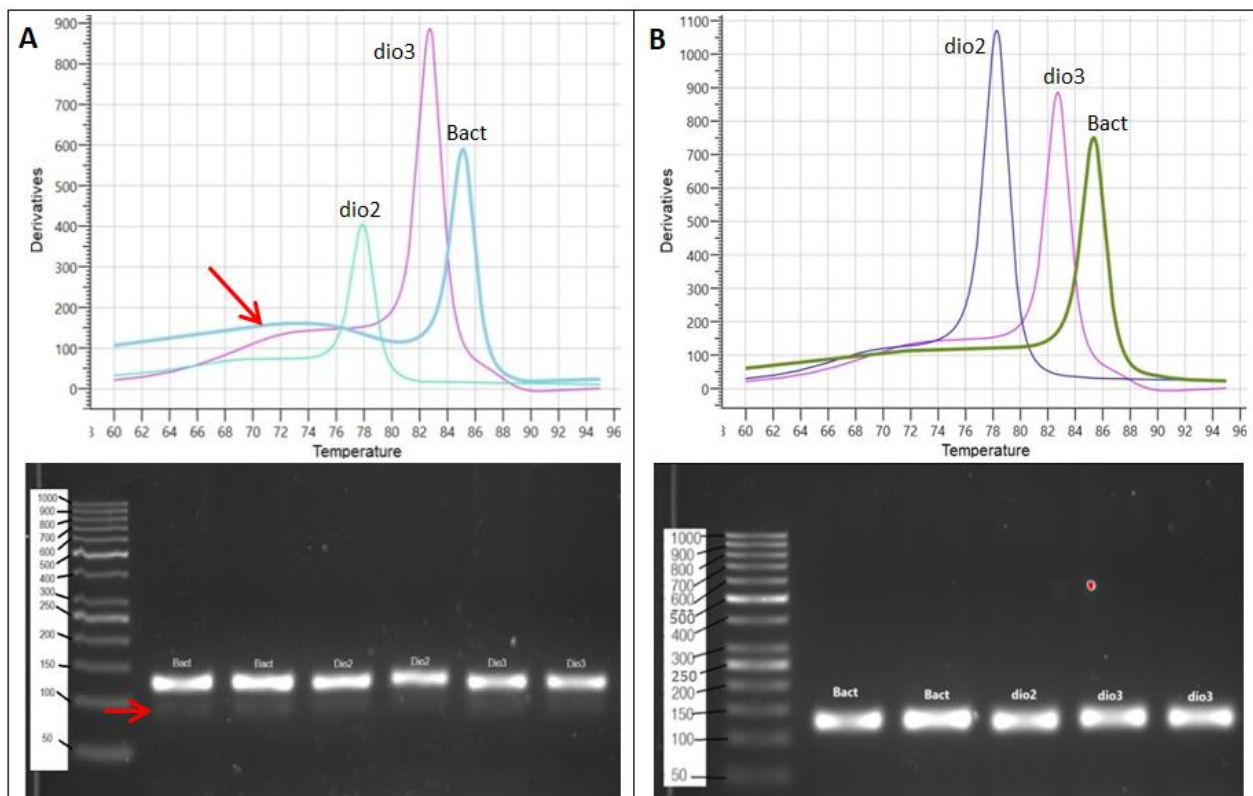


Figura 8: Curvas de melting y electroforesis en gel de agarosa de los productos de qPCR de *Bact*, *dio2* y *dio3*. Cada curva representa la derivada de la fluorescencia en función de la temperatura. A: Primera corrida. Se observa el producto esperado junto con un pico y banda inespecífica, señalados por las flechas rojas. B: Segunda corrida, con un aumento de 2 °C en la temperatura de annealing. Se observa solamente el producto esperado. Un único pico para cada gen (*Bact*: 84,5 °C; *dio2*: 77,5 °C; *dio3*: 82,5 °C) y una única banda.

Posteriormente utilizando el ADNc de la muestra 3, se evaluó la eficiencia de los primers mediante curvas de dilución. Se graficó una curva de eficiencia para cada gen (Fig. 9), y la eficiencia se calculó a partir de la pendiente de la recta según la ecuación $Ef = 10^{(-1/pend)} - 1$. Los resultados mostraron eficiencias óptimas para los tres genes analizados: *β-act* 100%, *dio2* 91% y *dio3* 89%.

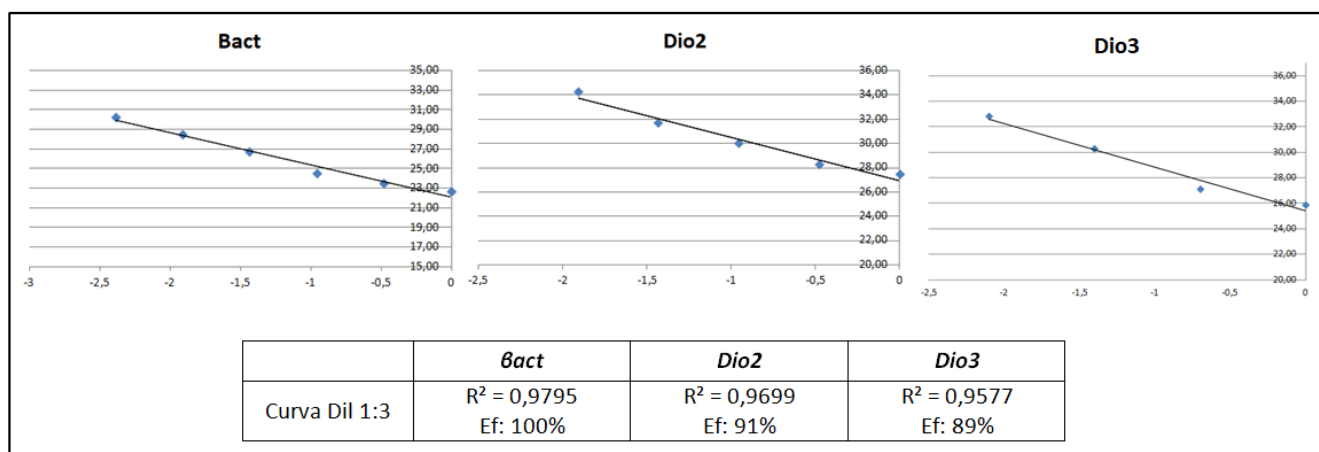
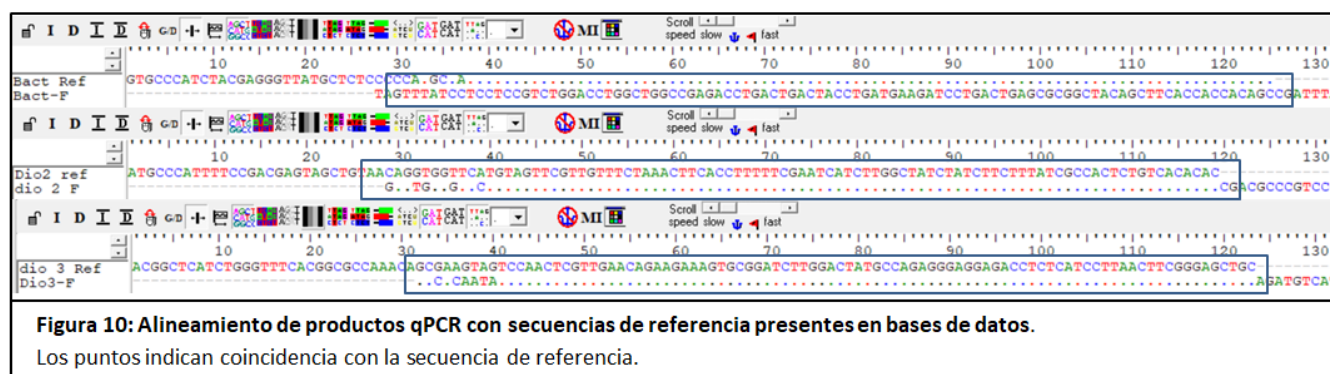


Figura 9. Curvas de eficiencia de qPCR para los genes *β-act*, *dio2* y *dio3*.

Curvas de dilución seriada 1:3 utilizadas para determinar la eficiencia de amplificación de cada par de primers. En cada gráfico se muestra la relación lineal entre el logaritmo de la concentración de ADNc y los valores de Ct. Los coeficientes de determinación (R²) y las eficiencias de amplificación (Ef) se indican en la tabla inferior.

Finalmente, los productos de qPCR de cada gen fueron enviados a secuenciar, y las secuencias obtenidas se alinearon con aquellas disponibles en bases de datos. El análisis mostró un alineamiento casi perfecto (Fig. 10), lo que confirma que se amplificaron los productos específicos esperados.



Identificación del SV en el cerebro de *G. omarorum*: abordaje molecular

Con una región de interés identificada mediante métodos histológicos y comparativos, se realizó una búsqueda molecular de una subregión específica en la que se observe una expresión aumentada de los genes estacionales. Para ello, se obtuvieron 13 cortes de 200µm de tejido fresco, incluyendo un control rostral y uno caudal, provenientes de dos cerebros; uno de invierno y otro de verano. Los cortes fueron analizados mediante qPCR, y los resultados se representaron gráficamente (Fig 11). En las Fig. 11a y 11b se muestra la expresión relativa de *dio2* y *dio3*, respectivamente, a lo largo de las secciones analizadas. El cálculo de la expresión relativa se realizó mediante la ecuación $2^{(-\Delta CT)}$, utilizando *β-act* como gen normalizador. En una primera aproximación a los resultados, se confirma la expresión de los genes *dio2* y *dio3* en el cerebro de *G. omarorum* en ambas estaciones. En invierno, los niveles de expresión son bajos y homogéneos a lo largo de las secciones analizadas, para ambos genes.

En contraste, en la condición de verano, se identifica una región específica en la que se observa un aumento marcado en la actividad transcripcional de *dio2* y *dio3* (a mayor valor de $2^{(-\Delta CT)}$ mayor expresión), en comparación con los valores medidos en invierno.

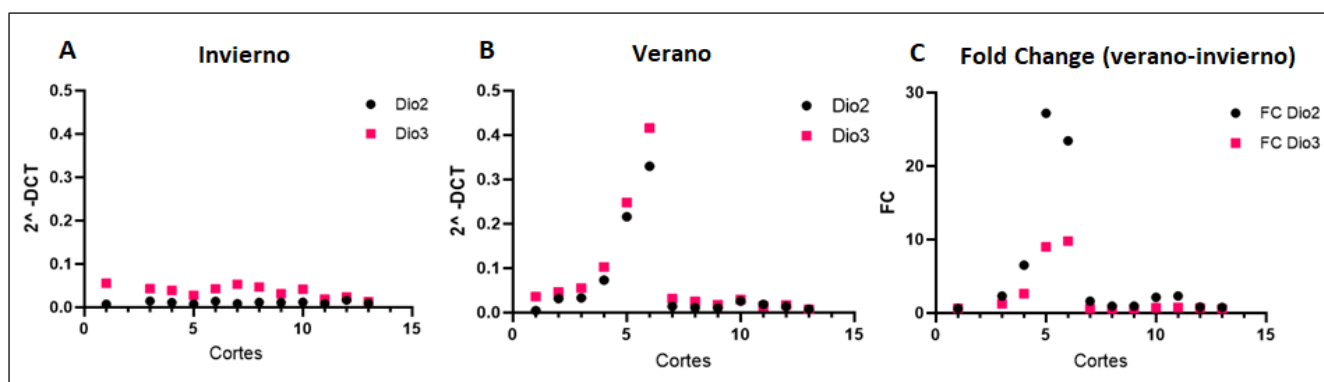
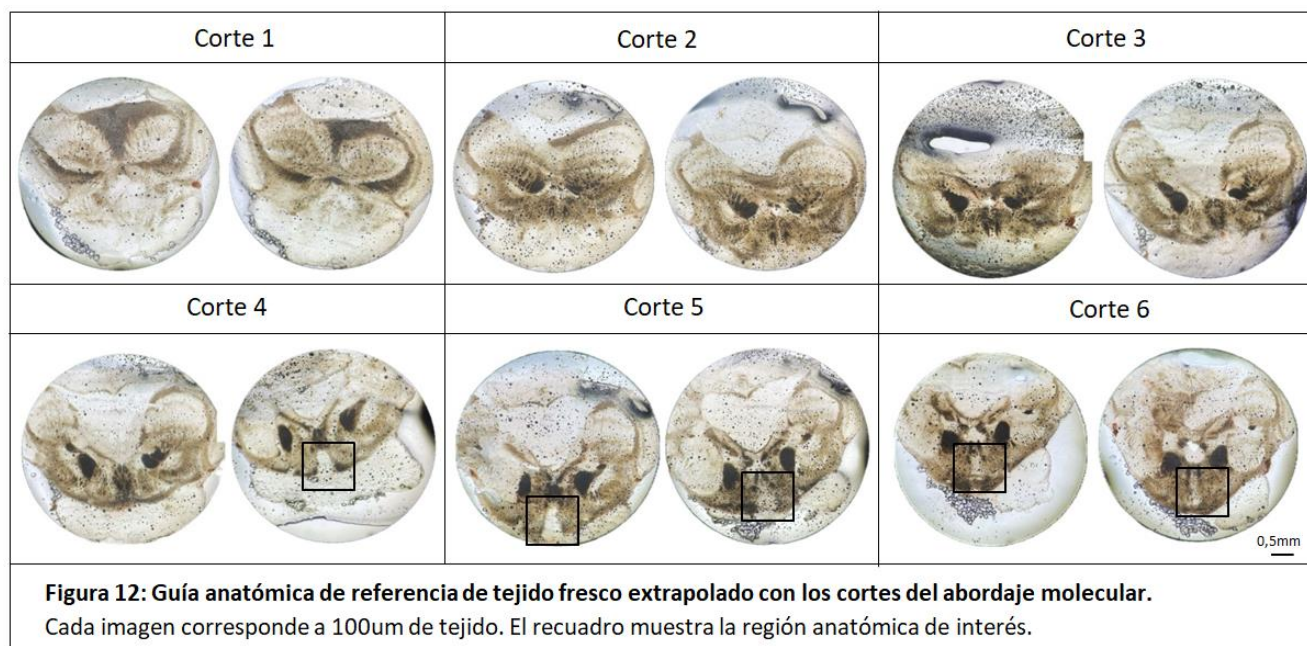


Figura 11: Expresión relativa de *dio2* y *dio3* en cortes seriados del cerebro de *G. omarorum* recolectados en invierno y verano. A-B: expresión relativa ($2^{(-\Delta CT)}$) de *dio2* y *dio3* en cada corte analizado (1–13), incluyendo controles rostral y caudal, utilizando *Bact* como gen normalizador. A: Cerebro de invierno. B: Cerebro de verano. C: Cambio relativo de expresión de *dio2* y *dio3* entre invierno y verano, utilizando el invierno como condición control y el gen *Bact* como referencia interna. Los valores se calcularon mediante el método $2^{(-\Delta\Delta CT)}$.

Esto no solo confirma la existencia de una subregión con expresión aumentada de estos genes correspondiente a los cortes 4, 5 y 6, sino también sugiere la presencia de una expresión diferencial entre ambas estaciones. Como análisis complementario, se calculó el cambio relativo de expresión de *dio2* y *dio3* entre verano e invierno, normalizando los datos respecto al invierno (Fold Change = $2^{(-\Delta\Delta CT)}$) y se graficaron los resultados (Fig. 11c). La interpretación de la gráfica confirma nuevamente un aumento en la expresión de ambos genes durante el verano en los cortes 4, 5 y 6. Cabe destacar que el cambio observado es más pronunciado para *dio2*, pudiendo indicar que este gen presenta la mayor variación estacional entre los dos analizados.



Dado que se sabe que el pico de mayor expresión corresponde a los cortes 4, 5 y 6, es posible extrapolar los resultados utilizando la guía anatómica de referencia elaborada a partir de tejido fresco (Fig. 12). A partir de esta extrapolación, se observa que la región anatómica de interés identificada previamente en los cortes coronales, podría coincidir con los cortes 5 y 6 de este análisis.

Comparación estacional de la expresión de *dio2* y *dio3*

Se realizó un análisis comparativo de la expresión de los genes estacionales en ocho cerebros, cuatro recolectados durante el verano y cuatro durante el invierno. En función de los resultados previos, se seleccionaron los cortes 5 y 6 de cada cerebro para llevar a cabo el análisis de comparación estacional de la expresión de *dio2* y *dio3*. Durante el procedimiento de criosección de los grupos experimentales se agregó al protocolo la observación al microscopio del último corte de la serie de modo de confirmar que su anatomía coincidía con lo esperado. De no ser así se corrigió el muestreo siguiendo la guía anatómica de referencia de la Fig. 12, de modo de asegurarnos de que las muestras siempre incluyan la región de interés. Una vez seleccionados los cortes, se realizó la reacción de qPCR y, a partir de los valores obtenidos, se calculó el $2^{-\Delta Ct}$ para cada uno. Los valores de expresión se compararon entre las dos muestras obtenidas de cada cerebro, con el objetivo de identificar aquella que presentara mayores niveles relativos. Se observó que el corte con mayor expresión mantuvo este patrón de manera consistente para ambos genes analizados. Además, en la mayoría de los individuos, con la excepción de un ejemplar del grupo de invierno, dicho corte correspondió sistemáticamente al número 6 (Tabla 3), por lo que se estableció esta sección como referencia anatómica para los análisis posteriores.

		Δ CT Dio2	Δ CT Dio 3
Verano	P1 C5	3,35	3,02
	P1 C6	2,88	2,33
	P2 C5	2,21	2,01
	P2 C6	1,60	1,27
	P3 C5	2,95	2,93
	P3 C6	1,98	1,96
	P4 C5	2,88	2,58
	P4 C6	2,75	1,83
Invierno	P5 C5	6,98	5,18
	P5 C6	6,15	4,56
	P6 C5	2,78	2,36
	P6 C6	3,52	3,11
	P7 C5	3,27	2,81
	P7 C6	2,91	2,48
	P8 C5	3,78	3,25
	P8 C6	3,42	3,17

Tabla 3: Δ Ct de *dio2* y *dio3* para los cortes 5 y 6 de individuos de verano e invierno. Se utilizó *Bact* como gen de referencia. Los valores resaltados indican los Δ Ct más bajos de cada individuo, correspondientes a una mayor expresión relativa.

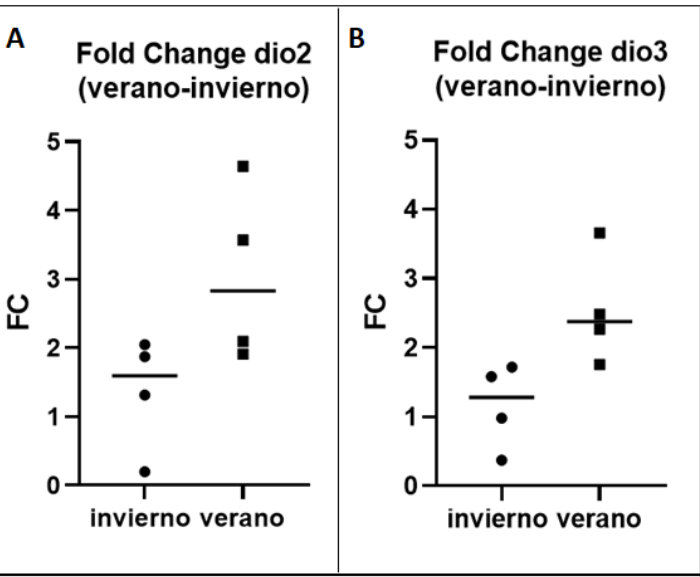


Figura 13: Cambio relativo (fold change) de expresión de *dio2* (A) y *dio3* (B) en el corte que incluye el posible SV, en peces recolectados en invierno y verano. Los valores fueron normalizados respecto al grupo de invierno. Cada punto representa un individuo, y la línea horizontal indica la mediana del grupo

Con estos valores se calculó la variación en la expresión entre invierno y verano para cada gen, utilizando al invierno como grupo control (Fig. 13). En la Figura 13a se observa un incremento en los niveles de *dio2* durante el verano en comparación con el invierno. Los individuos muestreados en invierno presentaron una mediana de FC de 1,6 (MAD = 0.367), mientras que en verano se registró un aumento marcado, alcanzando una mediana de 2,8 (MAD = 0.828). En la Figura 13b, también se aprecia un incremento en la expresión de *dio3* durante el verano. La mediana de FC en invierno fue de 1,3 (MAD = 0.369), mientras que en verano aumentó a 2,4 (MAD = 0.364). Como observación adicional, *dio2* presenta una mayor dispersión de los valores, lo que sugiere una mayor variabilidad interindividual en su expresión respecto a *dio3*.

En conjunto, estos resultados evidencian un aumento estacional en la expresión de ambos genes durante el verano, en la región identificada como posible SV, lo que sugiere que esta región de 200µm correspondiente al corte 6, podría estar involucrado en la modulación de procesos reproductivos, actuando como un sitio sensible a las señales estacionales.

Discusión

El presente trabajo constituye un aporte significativo al estudio sobre la reproducción estacional en *G. omarrorum*, especie modelo para el análisis de los mecanismos neurofisiológicos y comportamentales en vertebrados (Quintana & Salazar, 2025; Richer-de-Forges et al., 2009). A través de un abordaje integral que combinó revisión bibliográfica, comparaciones anatómicas, técnicas histológicas y análisis moleculares, se aportan evidencias que sugieren la presencia de un reloj estacional en el cerebro de esta especie.

En este marco, se logró poner a punto la técnica de qPCR para genes asociados a la estacionalidad, optimizando así el trabajo para futuros estudios que profundicen en este mecanismo. Además, se identificó una región anatómica de interés, análoga a la PT de aves y mamíferos (Coomans et al., 2015; Nakane & Yoshimura, 2019) y homóloga al SV descrito en otras especies de peces (Nakane et al., 2013; Tsuneki, 1992). Este hallazgo fue posible gracias al desarrollo de un procedimiento detallado para su localización, extracción y análisis, que constituye una herramienta metodológica valiosa para investigaciones posteriores. Finalmente, se obtuvieron evidencias preliminares de la estacionalidad en *G. omarorum*, reflejadas en diferencias en la expresión de *dio2* y *dio3* entre invierno y verano. En conjunto, estos resultados no solo contribuyen a la comprensión de los mecanismos neuroendocrinos que subyacen a la reproducción estacional en peces, sino que también proporcionan bases metodológicas y conceptuales para estudios comparativos en otros vertebrados

Identificación del SV en el cerebro de *G. omarorum*: abordaje anatómico

Los análisis comparativos entre cerebros de distintos peces, han revelado una notable variabilidad en la morfología, tamaño y grado de desarrollo del SV entre especies. En algunos casos, este órgano parece ausente, mientras que en otros alcanza dimensiones incluso mayores que las de la glándula pituitaria (Tsuneki, 1992). No obstante, los trabajos que describen el SV son escasos en relación con la gran diversidad de peces existentes. En este contexto, se propuso como primer objetivo del trabajo la identificación anatómica del SV en una especie para la cual no existen descripciones previas en la literatura.

A través de una búsqueda bibliográfica exhaustiva y la comparación de distintos cortes con referencias anatómicas, se logró identificar en el cerebro de *G. omarorum* una región que contiene dos estructuras que, por su posición, morfología y relación con puntos de referencia clave, coinciden con las descripciones del SV en otros teleósteos (Dorn, 1955; Nakane et al., 2013; Tsuneki, 1992; Watanabe, 1966). En la bibliografía, esta estructura se describe como una prolongación o saco ubicado en la línea media, en la región ventrocaudal del diencéfalo (Dorn, 1955; Tsuneki, 1992; Watanabe, 1966). Sabiendo esto, se utilizó el núcleo electromotor bulbar (NEB) como punto de referencia medial, dado que constituye una estructura anatómica única, medial, angosta (de aproximadamente 400µm de extensión lateral) y conservada en todos los Gymnotiformes (Borde et al., 2004).

A su vez, existen tres referencias anatómicas principales para la identificación del SV: se ubica ventral al hipotálamo caudal, caudal y adyacente a la glándula pituitaria y en continuidad con el tercer ventrículo (Dorn, 1955; Nakane et al., 2013; Tsuneki, 1992; Watanabe, 1966). La localización de la región identificada, coincide con estas referencias descriptas en la literatura, respaldando su posible correspondencia con el SV.

Es importante aclarar que, en los cortes sagitales (Fig. 6a), la región identificada presenta dos estructuras candidatas. Con los datos obtenidos mediante los diferentes abordajes, no es posible definir con precisión cuál de ellas corresponde efectivamente al SV. Sin embargo, en los cortes coronales (Fig. 6b) se observa una única estructura, cuya morfología y ubicación permiten proponerla de manera convincente como el SV. Además, cabe destacar, que los tres cortes mostrados en la Fig. 6 fueron obtenidos mediante distintas técnicas histológicas, por lo que el grado de compactación del tejido puede variar entre ellos, impidiendo afirmar con certeza absoluta la correspondencia anatómica completa entre las secciones. No obstante, se logró una gran aproximación a la identificación de una región candidata que, como se mencionó anteriormente, cumple con las relaciones anatómicas clave descritas en la literatura.

Esta coincidencia anatómica adquiere especial relevancia al considerar el papel funcional que estructuras análogas, como la PT, desempeñan en otros vertebrados. En aves y mamíferos, la ubicación anatómica de esta estructura es consistente con su función fisiológica: la regulación del eje HPG. Su localización en estrecha proximidad a la hipófisis resulta funcionalmente relevante, ya que permite una modulación directa de la liberación de gonadotropinas (Chen et al., 2020; Dawson, 2015; Nakane & Yoshimura, 2019).

En aves, se ha reportado que la actividad diferencial de enzimas en la PT entre invierno y verano, genera cambios morfológicos en la interacción entre las terminales nerviosas de las neuronas productoras de GnRH y los pies terminales de las células gliales, modulando así la secreción estacional de gonadotropinas (Yamamura et al., 2004). Como se mencionó anteriormente, en peces teleósteos el SV cumple un rol análogo al de la PT en aves y mamíferos, por lo que su ubicación adyacente a la hipófisis en todos los SV analizados (Tsuneki, 1992) refuerza el vínculo entre la anatomía y la función fisiológica. En *G. omarorum* se identificó una estructura en la región ventral del encéfalo, inmediatamente dorsal a la hipófisis, que coincide con las descripciones del SV en otros teleósteos. Esta correspondencia entre ubicación anatómica y función refuerza su identificación como tal.

Identificación del SV en el cerebro de *G. omarorum*: abordaje histológico

Una forma más precisa de identificar el SV es mediante el análisis histológico. En términos generales, los resultados obtenidos en *G. omarorum* sugieren la presencia de un SV que, según la clasificación propuesta por Tsuneki (1992), correspondería al tipo II. Este tipo se caracteriza por presentar un tamaño menor que el de la pituitaria (considerado moderado o pequeño), una pared epitelial sin pliegues y una vascularización reducida. A pesar de las diferencias en las morfologías generales o grados de desarrollo, la histología de este órgano se encuentra muy conservada entre especies.

En todos los casos, el epitelio del SV está constituido por tres tipos celulares principales: células coronadas, consideradas los componentes funcionales más relevantes del órgano, neuronas de contacto con el líquido cefalorraquídeo y células de sostén (Chakrabarti & Khatun, 2017; Nakane et al., 2013; Shimada, 1976; Watanabe, 1966). Las células coronadas representan el elemento más característico de este epitelio. Son células cilíndricas u ovoides con un núcleo redondo, usualmente ubicado en la región central o basal del citoplasma. Su rasgo distintivo es una prominente protrusión apical que se proyecta hacia la luz del SV, recubierta por múltiples estructuras esféricas o “glóbulos” dispuestos en racimo (Watanabe, 1966). La abundancia de estas proyecciones sugiere una posible función sensorial o secretora, relacionada con la detección de señales químicas o lumínicas en el líquido cefalorraquídeo. Estas características conservadas trazan una hoja de ruta clara para futuros análisis histológicos en *G. omarorum*, que podrían aportar evidencias sólidas de que la región identificada corresponde efectivamente al SV.

Como primer paso dentro de esta línea de trabajo, podría implementarse un abordaje relativamente sencillo, basado en técnicas histológicas y de microscopía clásica, orientado a la identificación de las células coronadas. En una segunda instancia, y con un nivel de complejidad mayor, sería posible realizar un estudio ultraestructural de la región mediante microscopía electrónica de barrido y de transmisión, siguiendo las descripciones de (Chakrabarti & Khatun, 2017; Nakane et al., 2013; Shimada, 1976; Watanabe, 1966). Mediante estas técnicas, se podría terminar de definir cuál de las dos estructuras observadas en el plano sagital, dentro de la región de interés, corresponde al SV.

Mediante análisis inmunohistoquímicos en salmón *masu*, se observó que la enzima *dio2* se expresa en las protrusiones y en las regiones apicales del cuerpo celular, mientras que las opsinas *sws1* y *opn4* se localizan en los glóbulos de las células coronadas (Nakane et al., 2013). Considerando estos antecedentes, y dado que las células coronadas no solo constituyen un rasgo distintivo del SV, sino que también expresan moléculas efectoras clave de la vía fotoperiódica, se propone la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas dirigidas a la detección de proteínas características de dicha vía, como *dio2*, *dio3*, *sws1* y *opn4*. La identificación de estas moléculas en la estructura analizada permitiría confirmar con mayor solidez que la región delimitada corresponde efectivamente al SV de *G. omarorum*.

Identificación del SV en el cerebro de *G. omarorum*: abordaje molecular

Como abordaje complementario para la identificación del SV, se realizaron estudios mediante qPCR, una técnica que permite analizar con alta precisión la expresión génica en regiones muy delimitadas, incluso de apenas unos pocos micrómetros. En las etapas previas del trabajo, se logró identificar una región de aproximadamente 2500 µm de extensión en el eje rostro-caudal que, por su ubicación, morfología y relaciones anatómicas con estructuras de referencia, sugiere incluir el órgano buscado. Sin embargo, para fortalecer esta hipótesis desde un punto de vista funcional, se consideró necesario evaluar la expresión de genes vinculados a la regulación de la reproducción estacional para delimitar de manera más precisa la región que contenga la vía neuroendocrina.

En particular, se analizó la expresión de los genes *dio2* y *dio3*, ambos involucrados en la conversión local de hormonas tiroideas y cuya expresión diferencial entre estaciones, al menos en aves y mamíferos, regula la reproducción estacional.

Este análisis permitió no sólo detectar la expresión de dichos genes en la región de interés, sino también delimitar con mayor precisión su distribución espacial. Al examinar el eje rostro-caudal a partir del estudio de cortes consecutivos, se observó que en los individuos colectados en verano hay un pico bien definido en un sector de aproximadamente 200 µm, donde ambos genes muestran un incremento notable en sus niveles de expresión (Fig. 11). Este aumento localizado sugiere la existencia de un sitio funcionalmente diferenciado, cuya posición y características coinciden con las esperadas para el SV. Resulta particularmente interesante que, fuera de la zona de máxima expresión, los niveles de *dio2* y *dio3* se mantengan relativamente constantes y comparables a los controles rostrales y caudales. Este patrón refuerza la idea de que el aumento observado corresponde a una región específica y bien delimitada, más que a una variación difusa en el tejido circundante. Asimismo, la presencia de una expresión basal a lo largo de toda la región analizada sugiere que ambos genes presentan una actividad constitutiva, posiblemente relacionada con funciones generales del encéfalo, independientes de la regulación estacional o reproductiva (Hochbaum & Sabatini, 2025; Sabatino et al., 2021)

Conociendo el espesor de cada corte y utilizando como punto de referencia el inicio del cerebelo, fue posible determinar qué imagen de la guía se corresponde con el corte 6, donde se observó el mayor nivel de expresión (Fig. 12). Esta coincidencia confirma que la región abarcada por dicho corte incluye la estructura previamente identificada en el abordaje histológico, fortaleciendo la hipótesis de que todos los enfoques empleados describen la misma estructura, presumiblemente el SV. Esto fue posible gracias a la incorporación de un control anatómico de ubicación adicional, que permitió validar la correspondencia entre los cortes analizados y la guía de referencia. Asimismo, durante el análisis estacional, este control se aplicó de manera individual en cada cerebro, incorporando cortes de verificación adicionales con el fin de minimizar posibles errores en la localización del sitio de interés, ya sea por efectos de la técnica o por diferencias en el tamaño de los encéfalos entre individuos.

En conjunto, los resultados obtenidos a partir del abordaje molecular, aportan evidencia sólida sobre la existencia de una región focal con alta actividad transcripcional de *dio2* y *dio3*, compatible con la localización y características esperadas para el SV. No obstante, como última aproximación definitoria, se podría incorporar una hibridación in situ, siguiendo la línea metodológica utilizada por (Nakane et al., 2013; Yoshimura et al., 2003) Este enfoque permitiría visualizar directamente la distribución topográfica de la expresión de estos genes dentro del tejido, aportando una resolución espacial mucho mayor que la obtenida por qPCR. De este modo, se podría confirmar que la región con mayor expresión de *dio2* y *dio3* corresponde efectivamente al área identificada mediante el resto de las técnicas.

Comparación estacional de la expresión de *dio2* y *dio3*

A partir de la comparación entre invierno y verano de la expresión de los genes estacionales mediante qPCR, se obtuvieron resultados preliminares que evidencian una variación estacional diferencial en una región específica del cerebro. Esta región coincide con el corte que, según los análisis anatómicos previos, presumiblemente corresponde al SV. En dicha zona, los genes *dio2* y *dio3* presentan un aumento en sus niveles de expresión durante el verano en comparación con el invierno, sugiriendo que, al igual que en peces salmónidos, aves y mamíferos, estos genes podrían participar en la codificación circanual y en la transducción de señales fotoperiódicas en *G. omarorum*.

De acuerdo con lo descrito en la bibliografía, *dio2* experimenta un marcado aumento en su transcripción durante los días largos, lo que concuerda con su función como enzima responsable de convertir la T4 en su forma activa T3, hormona que estimula la activación del eje gonadal en respuesta a las señales fotoperiódicas (Yoshimura et al., 2003). En peces, los antecedentes sobre variaciones estacionales en la expresión de estos genes son escasos y, hasta el momento, se limitan principalmente a *dio2*, sin estudios comparativos que incluyan a *dio3*. En este sentido, el presente trabajo aporta evidencia novedosa al evaluar ambos genes de forma simultánea. De manera sorprendente, en *G. omarorum* se observó que *dio3* también presenta un aumento en verano.

Este hallazgo resulta particularmente interesante, ya que en aves y mamíferos se ha descrito un patrón de expresión opuesto entre ambos genes: durante los días largos, *dio2* aumenta y *dio3* disminuye, mientras que en los días cortos ocurre lo contrario, con una mayor expresión de *dio3* y una reducción de *dio2* (Nakao et al., 2008; Yasuo et al., 2005; Yoshimura et al., 2003).

Cabe destacar que el tamaño de la muestra es pequeño ($n = 4$ por estación), por lo que estos resultados deben considerarse preliminares y requerirán ser confirmados mediante análisis estadísticos apropiados. Aun así, los datos permiten plantear algunas conjeturas sobre las posibles causas de este patrón. Por un lado, la diferencia observada podría deberse a particularidades propias de la regulación de la vía fotoperiódica en teleósteos o, más específicamente, a adaptaciones de *G. omarorum* a su ambiente natural. Esta especie habita en aguas poco profundas y cubiertas por densa vegetación, donde la intensidad lumínica es prácticamente nula (Migliaro et al., 2025; Silva et al., 2003). En este contexto, es posible que la luz no constituya la señal ambiental predominante para regular los procesos estacionales, y que otras variables, como la temperatura, desempeñen un papel más relevante en la sincronización de su fisiología reproductiva anual (Migliaro et al., 2025).

Como segundo aspecto a considerar, se encuentra el momento del día en que se realizó la toma de muestras. Siguiendo lo reportado por Nakane et al., (2013), los animales fueron sacrificados durante la noche, dado que en el salmón masu las diferencias estacionales en la expresión de *dio2* se manifiestan principalmente en esas horas.

Sin embargo, a diferencia del salmón masu, una especie con actividad diurna, *G. omarorum* presenta actividad predominantemente nocturna, lo que podría implicar un patrón circadiano distinto en la regulación de estos genes, tal como se ha reportado en otros teleósteos (Jones et al., 2013). La expresión de *dio2* y *dio3* varía a lo largo del día, observándose momentos en los que ambos genes presentan una expresión elevada y otros en los que sus niveles difieren notablemente (Jones et al., 2013). En este sentido, sería de gran interés realizar un muestreo circadiano con extracciones en distintos momentos del día y la noche, a fin de evaluar posibles fluctuaciones horarias en la expresión génica y obtener una visión más integral de la dinámica temporal y estacional de esta vía en la especie.

Conclusión

El presente trabajo permitió avanzar en la comprensión de los mecanismos que subyacen a la reproducción estacional en *G. omarorum*, sugiriendo la existencia de un reloj estacional en el cerebro de esta especie.

A través de una combinación de abordajes, incluidas búsquedas bibliográficas, comparaciones anatómicas, técnicas histológicas y análisis moleculares, se delimitó una región cerebral que probablemente corresponde al SV de *G. omarorum*. Además, se desarrolló un protocolo detallado para su localización, extracción y análisis, constituyendo una herramienta metodológica valiosa para trabajos posteriores. Este hallazgo sienta las bases para investigaciones complementarias de tipo histológico, inmunohistoquímico y molecular que permitan confirmar de manera definitiva esta hipótesis y localizar de forma más precisa el SV.

Paralelamente, se logró poner a punto la técnica de qPCR para genes vinculados a la estacionalidad, optimizando un procedimiento que permitirá continuar evaluando la expresión génica en esta especie con mayor precisión y eficiencia. A partir de su aplicación, se obtuvieron evidencias preliminares que respaldan la existencia de un patrón estacional en *G. omarorum*, reflejado en diferencias en la expresión de *dio2* y *dio3* entre invierno y verano. Estos resultados sugieren la presencia de un mecanismo de regulación local de hormonas tiroideas, coherente con lo reportado en otros vertebrados. Sin embargo, a diferencia de lo observado en otras especies, en este primer estudio no se detectó un patrón recíproco entre *dio2* y *dio3*, lo que plantea nuevas interrogantes y abre el camino a futuras investigaciones. Entre ellas, podría explorarse la realización de muestreos en distintos momentos del día para evaluar una posible influencia circadiana, o bien considerar que el fotoperíodo no constituya la principal señal ambiental reguladora en esta especie.

En conjunto, estos resultados amplían la comprensión de los procesos neuroendocrinos que subyacen a la reproducción estacional en peces y proporcionan una base conceptual y metodológica valiosa para estudios comparativos. La sincronización estacional constituye un rasgo ampliamente conservado entre especies, especialmente en vertebrados para los que se asocia estrechamente con variaciones fisiológicas y conductuales significativas (Stevenson et al., 2015). En este marco, los peces, como uno de los linajes más antiguos de vertebrados, constituyen un modelo fundamental para explorar la evolución y conservación de estos procesos (Bi & Zhang, 2021; Vandepoele et al., 2004). Estos estudios en diversos modelos animales ha permitido reconocer procesos biológicos homólogos a los presentes en humanos, contribuyendo al desarrollo de estrategias terapéuticas frente a alteraciones vinculadas con los ritmos estacionales (Gałęcka et al., 2017; Maruani & Geoffroy, 2019; Rosenthal, 1984). Así, los aportes de este trabajo no solo enriquecen el conocimiento sobre la fisiología estacional en peces teleósteos, sino que también establecen un punto de partida para futuras investigaciones que integren la biología comparada y contribuyan a la comprensión de los ritmos estacionales en la salud humana.

Bibliografía

Batista, G., Zubizarreta, L., Perrone, R., & Silva, A. (2012). *Non-sex-biased Dominance in a Sexually Monomorphic Electric Fish: Fight Structure and Submissive Electric Signalling*. *Ethology*, 118(4), 398-410. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2012.02022.x>

Bentley, G. E. (2001). Unraveling the enigma: The role of melatonin in seasonal processes in birds. *Microscopy Research and Technique*, 53(1), 63-71. <https://doi.org/10.1002/jemt.1069>

Bi, X.-P., & Zhang, G.-J. (2021). Ancestral developmental potentials in early bony fish contributed to vertebrate water-to-land transition. *Zoological Research*, 42(2), 135-137. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2021.066>

Borde, M., Curti, S., Comas, V., & Rivero, C. (2004). Modulación central de un sistema sensorial por un comando motor. Una intención con dos resultados. *Revista de Neurología*, 38(03), 253. <https://doi.org/10.33588/rn.3803.2004006>

Bronson, F. H. (2004). Are Humans Seasonally Photoperiodic? *Journal of Biological Rhythms*, 19(3), 180-192. <https://doi.org/10.1177/0748730404264658>

Chakrabarti, P., & Khatun, R. (2017). Histophysiological and surface ultrastructural studies of the saccus vasculosus of *Notopterus chitala* (Hamilton). *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 5(3), 140. <https://doi.org/10.1016/j.jmau.2016.10.001>

Chen, J., Okimura, K., & Yoshimura, T. (2020). Light and Hormones in Seasonal Regulation of Reproduction and Mood. *Endocrinology*, 161(9), bqaa130. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa130>

Coomans, C. P., Ramkisoensing, A., & Meijer, J. H. (2015). The suprachiasmatic nuclei as a seasonal clock. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 37, 29-42. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.11.002>

Cummings, D. R. (2007). ADDITIONAL CONFIRMATION FOR THE EFFECT OF ENVIRONMENTAL LIGHT INTENSITY ON THE SEASONALITY OF HUMAN CONCEPTIONS. *Journal of Biosocial Science*, 39(3), 383-396. <https://doi.org/10.1017/S0021932006001568>

Cyr, Daniel G., & Eales, J. G. (1996). Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 6(2). <https://doi.org/10.1007/BF00182342>

Dardente, H., Wood, S., Ebling, F., & Sáenz De Miera, C. (2019). An integrative view of mammalian seasonal neuroendocrinology. *Journal of Neuroendocrinology*, 31(5), e12729. <https://doi.org/10.1111/jne.12729>

Dawson, A. (2015). Annual gonadal cycles in birds: Modeling the effects of photoperiod on seasonal changes in GnRH-1 secretion. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 37, 52-64. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.08.004>

Dorn, E. (1955). Der Saccus vasculosus. En G. Schaltenbrand & E. Dorn (Eds.), *Plexus und Meningen Saccus Vasculosus: Vol. 4 / 2* (pp. 140-185). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-30597-3_2

Fisman, D. N. (2007). Seasonality of Infectious Diseases. *Annual Review of Public Health*, 28(1), 127-143. <https://doi.org/10.1146/annurev.publhealth.28.021406.144128>

Foster, R. G., & Roenneberg, T. (2008). Human Responses to the Geophysical Daily, Annual and Lunar Cycles. *Current Biology*, 18(17), R784-R794. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.07.003>

Gałecka, E., Kumor-Kisiełowska, A., Orzechowska, A., Maes, M., Górski, P., & Szemraj, J. (2017). Assessment of type 1 and type 3 deiodinase expression levels in depressive disorders. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 77(3), 225-235. <https://doi.org/10.21307/ane-2017-056>

Gwinner, E. (1986). *Circannual Rhythms: Endogenous Annual Clocks in the Organization of Seasonal Processes* (Vol. 18).

Hochbaum, D. R., & Sabatini, B. L. (2025). Thyroid hormone and the brain. *Current Biology*, 35(20), R999-R1004. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2025.08.024>

Jiang, C., Storey, K. B., Yang, H., & Sun, L. (2023). Aestivation in Nature: Physiological Strategies and Evolutionary Adaptations in Hypometabolic States. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18), 14093. <https://doi.org/10.3390/ijms241814093>

Jones, R. A., Cohn, W. B., Miller, T. C., Jaques, J. T., & MacKenzie, D. S. (2013). Cyclic mRNA expression of thyrotropin subunits and deiodinases in red drum, *Sciaenops ocellatus*. *General and Comparative Endocrinology*, 194, 248-256. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.09.017>

Maruani, J. & Geoffroy. (2019). Bright Light as a Personalized Precision Treatment of Mood Disorders. *Frontiers in Psychiatry*, 10, 85. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00085>

Matthews, C. D., Guerin, M. V., & Deed, J. R. (1993). Melatonin and photoperiodic time measurement: Seasonal breeding in the sheep. *Journal of Pineal Research*, 14(3), 105-116. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1993.tb00493.x>

Meyer, C., Muto, V., Jaspar, M., Kussé, C., Lambot, E., Chellappa, S. L., Degueldre, C., Balteau, E., Luxen, A., Middleton, B., Archer, S. N., Collette, F., Dijk, D.-J., Phillips, C., Maquet, P., & Vandewalle, G. (2016). Seasonality in human cognitive brain responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(11), 3066-3071. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518129113>

Michel, S., & Kervezee, L. (2024). One seasonal clock fits all? *Journal of Comparative Physiology A*, 210(4), 641-647. <https://doi.org/10.1007/s00359-023-01680-4>

Migaud, H., Davie, A., & Taylor, J. F. (2010). Current knowledge on the photoneuroendocrine regulation of reproduction in temperate fish species. *Journal of Fish Biology*, 76(1), 27-68. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02500.x>

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/10.1016/j.isci.2025.112018>

Morgan, P. J., & Hazlerigg, D. G. (2008). Photoperiodic Signalling Through the Melatonin Receptor Turns Full Circle. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(6), 820-826. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01724.x>

Nakane, Y., Ikegami, K., Iigo, M., Ono, H., Takeda, K., Takahashi, D., Uesaka, M., Kimijima, M., Hashimoto, R., Arai, N., Suga, T., Kosuge, K., Abe, T., Maeda, R., Senga, T., Amiya, N., Azuma, T., Amano, M., Abe, H., ... Yoshimura, T. (2013). The saccus vasculosus of fish is a sensor of seasonal changes in day length. *Nature Communications*, 4(1), 2108. <https://doi.org/10.1038/ncomms3108>

Nakane, Y., & Yoshimura, T. (2019). Photoperiodic Regulation of Reproduction in Vertebrates. *Annual Review of Animal Biosciences*, 7(1), 173-194. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115216>

Nakao, N., Ono, H., Yamamura, T., Anraku, T., Takagi, T., Higashi, K., Yasuo, S., Katou, Y., Kageyama, S., Uno, Y., Kasukawa, T., Iigo, M., Sharp, P. J., Iwasawa, A., Suzuki, Y., Sugano, S., Niimi, T., Mizutani, M., Namikawa, T., ... Yoshimura, T. (2008). Thyrotrophin in the pars

tuberalis triggers photoperiodic response. *Nature*, 452(7185), 317-322. <https://doi.org/10.1038/nature06738>

O'Brien, C. S., Bourdo, R., Bradshaw, W. E., Holzapfel, C. M., & Cresko, W. A. (2012). Conservation of the photoperiodic neuroendocrine axis among vertebrates: Evidence from the teleost fish, *Gasterosteus aculeatus*. *General and Comparative Endocrinology*, 178(1), 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.03.010>

Pouso, P., Radmilovich, M., & Silva, (2017). An immunohistochemical study on the distribution of vasotocin neurons in the brain of two weakly electric fish, *Gymnotus omarorum* and *Brachyhypopomus gauderio*. *Tissue and Cell*, 49(2), 257-269. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2017.02.003>

Perrone, R., Pedraja, F., Valiño, G., Tassino, B., & Silva, A. (2019). Non-breeding territoriality and the effect of territory size on aggression in the weakly electric fish, *Gymnotus omarorum*. *Acta Ethologica*, 22(2), 79-89. <https://doi.org/10.1007/s10211-019-00309-7>

Quintana, L., & Salazar, V. (2025). *Social Behavior in South American Electric Fishes: Linking Neuroendocrine Regulation, Signal Plasticity, and Reproductive Strategies*.

Richer-de-Forges, M. M., Crampton, W. G. R., & Albert, J. S. (2009). A New Species of *Gymnotus* (Gymnotiformes, Gymnotidae) from Uruguay: Description of a Model Species in Neurophysiological Research. *Copeia*, 2009(3), 538-544. <https://doi.org/10.1643/CI-07-103>

Rosenthal, N. E. (1984). Seasonal Affective Disorder: A Description of the Syndrome and Preliminary Findings With Light Therapy. *Archives of General Psychiatry*, 41(1), 72. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1984.01790120076010>

Sabatino, L., Vassalle, C., Del Seppia, C., & Iervasi, G. (2021). Deiodinases and the Three Types of Thyroid Hormone Deiodination Reactions. *Endocrinology and Metabolism*, 36(5), 952-964. <https://doi.org/10.3803/EnM.2021.1198>

Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101-1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>

Shimada, T. (1976). Scanning Electron Microscopic Study on the Saccus Vasculosus of the Rainbow Trout. *Archivum Histologicum Japonicum*, 39(4), 283-294. <https://doi.org/10.1679/aohc1950.39.283>

Silva, Zubizarreta, L., & Quintana, L. (2020). A Teleost Fish Model to Understand Hormonal Mechanisms of Non-breeding Territorial Behavior. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 468. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00468>

Silva, Quintana, L., Galeano, M., & Errandonea, P. (2003). Biogeography and Breeding in Gymnotiformes from Uruguay. *Environmental Biology of Fishes*, 66(4), 329-338. <https://doi.org/10.1023/A:1023986600069>

Stevenson, T. J., Visser, M. E., Arnold, W., Barrett, P., Biello, S., Dawson, A., Denlinger, D. L., Dominoni, D., Ebling, F. J., Elton, S., Evans, N., Ferguson, H. M., Foster, R. G., Hau, M., Haydon, D. T., Hazlerigg, D. G., Heideman, P., Hopcraft, J. G. C., Jonsson, N. N., ... Helm, B. (2015). Disrupted seasonal biology impacts health, food security and ecosystems. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1817), 20151453. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1453>

Tsuneki, K. (1992). A Systematic Survey of the Occurrence of the Hypothalamic Saccus Vasculosus in Teleost Fish. *Acta Zoologica*, 73(1), 67-77. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.1992.tb00950.x>

Turbill, C., Bieber, C., & Ruf, T. (2011). Hibernation is associated with increased survival and the evolution of slow life histories among mammals. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1723), 3355-3363. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.0190>

Valiño, G., Dunlap, K., & Quintana, L. (2024). Androgen receptors rapidly modulate non-breeding aggression in male and female weakly electric fish (*Gymnotus omarorum*). *Hormones and Behavior*, 159, 105475. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2023.105475>

Vandepoele, K., De Vos, W., Taylor, J. S., Meyer, A., & Van De Peer, Y. (2004). Major events in the genome evolution of vertebrates: Paranome age and size differ considerably between ray-finned fishes and land vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(6), 1638-1643. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307968100>

Watanabe, A. (1966). Light and Electron Microscope Studies on the Saccus Vasculosus of the Ray (*Dasyatis akajei*). *Archivum Histologicum Japonicum*, 27(1-5), 427-449. <https://doi.org/10.1679/aohc1950.27.427>

Williams, G. R., & Bassett, J. H. D. (2011). Local control of thyroid hormone action: Role of type 2 deiodinase. *Journal of Endocrinology*, 209(3), 261-272. <https://doi.org/10.1530/JOE-10-0448>

Wingfield, J. C. (2015). Coping with change: A framework for environmental signals and how neuroendocrine pathways might respond. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 37, 89-96. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.11.005>

Yamamura, T., Hirunagi, K., Ebihara, S., & Yoshimura, T. (2004). Seasonal Morphological Changes in the Neuro-Glial Interaction between Gonadotropin-Releasing Hormone Nerve Terminals and Glial Endfeet in Japanese Quail. *Endocrinology*, 145(9), 4264-4267. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0366>

Yasuo, S., Watanabe, M., Nakao, N., Takagi, T., Follett, B. K., Ebihara, S., & Yoshimura, T. (2005). The Reciprocal Switching of Two Thyroid Hormone-Activating and -Inactivating Enzyme Genes Is Involved in the Photoperiodic Gonadal Response of Japanese Quail. *Endocrinology*, 146(6), 2551-2554. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0057>

Yoshimura, T. (2013). Thyroid hormone and seasonal regulation of reproduction. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 34(3), 157-166. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2013.04.002>

Yoshimura, T., Yasuo, S., Watanabe, M., Iigo, M., Yamamura, T., Hirunagi, K., & Ebihara, S. (2003). Light-induced hormone conversion of T4 to T3 regulates photoperiodic response of gonads in birds. *Nature*, 426(6963), 178-181. <https://doi.org/10.1038/nature02117>

Zubizarreta, L., Jalabert, C., Silva, Soma, K. K., & Quintana, L. (2023). Brain and circulating steroids in an electric fish: Relevance for non-breeding aggression. *PLOS ONE*, 18(10), e0289461. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0289461>

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>